

Tesis Doctoral

Estudio comparado del papel de la epigenética en distintas fases de la memoria de largo término

Federman, María Noel

2010

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

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

Cita tipo APA:

Federman, María Noel. (2010). Estudio comparado del papel de la epigenética en distintas fases de la memoria de largo término. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Federman, María Noel. "Estudio comparado del papel de la epigenética en distintas fases de la memoria de largo término". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Estudio comparado del papel de la *epigenética* en distintas fases de la memoria de largo término

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires, en el
área de Ciencias Biológicas.

Autor: Lic. Noel Federman

Director de tesis y consejero de estudios: Dr. Arturo Romano

Lugar de trabajo: Laboratorio de Neurobiología de la Memoria - Instituto de Fisiología,
Biología Molecular y Neurociencias- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales- UBA-
CONICET

Buenos Aires, Marzo de 2010

Estudio comparado del papel de la epigenética en distintas fases de la memoria de largo término

Resumen

La consolidación de las memorias de largo término (MLT) necesita de la síntesis *de novo* de ARNm y proteínas. Trabajos recientes proponen la existencia de una nueva fase de consolidación en memorias estables y consolidadas, denominada reconsolidación. Esta nueva fase tiene lugar luego de la reactivación de la MLT inducida por la evocación de la MLT. La reconsolidación de la MLT también depende de eventos transcripcionales y traduccionales.

La transcripción génica es controlada por factores de transcripción, cofactores y correpresores. Los cofactores y correpresores regulan la expresión génica mediante su interacción directa con la maquinaria de transcripción basal, remodelando la estructura de la cromatina y/o modificando químicamente las histonas. Una de las modificaciones post-traduccionales de histonas más estudiada es la acetilación. Este proceso es regulado por acetilasas (KATs) y desacetilasas de histonas (KDACs).

En este trabajo de tesis se presentan evidencias acerca del papel fundamental que cumple la acetilación de histonas durante la consolidación y reconsolidación de la memoria contexto-señal en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*, así como también durante la consolidación de la memoria de reconocimiento de objeto novedoso en el ratón *Mus musculus*.

En el cerebro central de *Chasmagnathus* se observó un aumento en los niveles de acetilación de histona H3 durante la consolidación, 1 hora luego de un entrenamiento fuerte. Asimismo, se observó un incremento similar en la acetilación de la histona H3 durante la reconsolidación, 1 hora después de la reactivación de la memoria. En este modelo, el bloqueo farmacológico de la acción de las KDACs mediante la administración del inhibidor butirato de sodio (NaB), durante la consolidación de una memoria débil, induce la facilitación de esta memoria. No se encontró un efecto facilitador de la memoria mediante la administración de esta droga durante la reconsolidación.

Por otro lado, en el hipocampo de *Mus musculus*, se observó un aumento en los niveles de acetilación de histona H3 durante la consolidación, 1 hora luego de un entrenamiento fuerte, no así luego de entrenamientos de menor magnitud. Además, la memoria fue mejorada mediante la administración intra-hipocampal del inhibidor de KDACs NaB.

En conjunto, estos datos sostienen que la acetilación de histonas es un mecanismo fundamental en la consolidación y reconsolidación de la MLT. Este proceso epigenético funcionaría como una característica molecular de memorias fuertes. Este mecanismo molecular regulador de la expresión génica durante la formación de la memoria se encuentra evolutivamente conservado.

Palabras clave: Memoria de Largo Término, Consolidación, Reconsolidación, Transcripción, Epigenética, Acetilación, KATs, KDACs.

Comparative study of the role of the epigenetic in long term memory phases

Abstract

Consolidation of long-term memories (MLT) requires *de novo* synthesis of mRNA and protein. Recent studies suggest the existence of a new consolidation-like phase of stable and already consolidated memories, which is called reconsolidation. This phase occurs by the reactivation of the MLT, induced by memory retrieval. Reconsolidation also depends on transcriptional and translational events.

Transcriptional activation is controlled by transcription factors, their cofactors and repressors. Cofactors and repressors can regulate gene expression by interacting with basal transcription machinery, remodeling chromatin structure and/or chemically modifying histones. The acetylation is the most studied modification of histones related to gene expression regulation. This process is regulated by histone acetylases (KATs) and histone deacetylases (KDACs).

This thesis presents evidences about the critical role of histone acetylation during consolidation and reconsolidation of context-signal memory in the crab *Chasmagnathus granulatus*, as well as during consolidation of novel object recognition memory in the mouse *Mus musculus*.

In *Chasmagnathus*, it is shown an increase in the acetylation level of histone H3 in the central brain during consolidation, 1 hour after a strong training protocol. Moreover, that increased acetylation of histone H3 was also observed during reconsolidation, 1 hour after memory reactivation. In this invertebrate model, pharmacological blockade of the action of KDACs by administration of the inhibitor sodium butyrate during the consolidation of a weak memory, induces memory facilitation. We found no memory enhancement effect by administering the drug during reconsolidation.

Moreover, in the hippocampus of *Mus musculus*, there was an increase in the histone H3 acetylation level during consolidation, 1 hour after a strong training. This change is not observed after weaker training protocols. Furthermore, memory was improved by intra-hippocampal administration of KDACs inhibitor sodium butyrate.

Together, these data argue that acetylation of histones is a key mechanism in the consolidation and reconsolidation of the MLT. This epigenetic process functions as a molecular feature of stronger memories. This mechanism regulating gene expression during memory formation is evolutionarily conserved.

Key words: Long Term Memory, Consolidation, Reconsolidation, Transcription, Epigenetic, Acetylation, KATs, KDACs.

Índice

Capítulo I. Introducción General

I.1 Aprendizaje y memoria.....	2
I.2 Sistema nervioso, plasticidad y memoria.....	3
I. 3 Distintos niveles de análisis del aprendizaje y la memoria.....	6
I.4 Estudio comportamental del aprendizaje y la memoria.....	7
I.5 Estudio mecanístico del aprendizaje y la memoria.....	10
I.6 Consolidación.....	12
I.7 Consolidación versus Reconsolidación.....	13
I.8 Regulación de la expresión génica y su relación con la memoria.....	14
I.9 Cromatina.....	15
I.10 Epigenética.....	18
I.11 Acetilación de histonas y regulación de la expresión génica.....	20
I.12 Epigenética y memoria.....	23
Objetivos e hipótesis.....	26

Capítulo II. Participación de la acetilación de histonas durante la fase de consolidación en el modelo de memoria contexto señal en *Chasmagnathus*

II.1 Introducción.....	29-41
II.1.1 Consolidación de memorias asociativas.....	30
II.1.2 Diferencias en el aprendizaje y tipos de memoria.....	30
II.1.3a Aprendizaje Contexto-Señal en <i>Chasmagnathus granulatus</i> como modelo experimental.....	32
II.1.3b Anatomía del sistema nervioso central de los decápodos.....	37

II.1.4 Acetilación de histonas y la consolidación de la memoria.....	39
II.1.5 KDACs y fármacos inhibidores.....	41
II.2 Materiales y Métodos.....	42-50
II.2.1. Animales.....	42
II.2.2. Dispositivo de Entrenamiento y Evaluación. El actómetro.....	43
II.2.3 Procedimiento experimental.....	44-51
Experimentos de intervención farmacológica y análisis comportamental.....	45
Experimentos de correlación.....	48
Experimentos de intervención farmacológica y análisis mecanístico.....	51
II.3 Resultados.....	52-64
II.3.1 La administración de butirato de sodio durante la consolidación facilita la MCS.....	52
II.3.2 La administración de tricostatina A durante la consolidación facilita la MCS.....	56
II.3.3 La inyección de NaB aumenta los niveles de acetilación de la histona H3 en cerebro de <i>Chasmagnathus</i>	57
II.3.4 Curso temporal de la acetilación de histonas H3 durante la consolidación de la memoria.....	60
II.3.5 El entrenamiento débil concomitante con la administración de NaB induce un aumento de la acetilación de histonas H3.....	63
II.4 Conclusiones y Discusión.....	65-70

Capítulo III. Participación de la acetilación de histonas durante la fase de reconsolidación en el modelo de memoria contexto señal en *Chasmagnathus*

III.1 Introducción.....	71-94
III.1.1 Reconsolidación de memorias asociativas.....	72
III.1.2 Mecanismos moleculares involucrados en la reconsolidación.....	73
III.1.3 La reconsolidación de la MCS en <i>Chasmagnathus</i>	74

III.1.4 Mecanismos epigenéticos y la reconsolidación de la memoria.....	75
III.2 Materiales y Métodos.....	76-80
III.2.1 Procedimiento experimental.....	76
II.2.2 Experimentos de correlación.....	76
II.2.3 Experimentos de intervención farmacológica y análisis mecanístico.....	77
III.3 Resultados.....	81-90
III.3.1 La reconsolidación de la memoria fuerte induce un aumento en la acetilación de histonas H ₃	81
III.3.2 La reconsolidación de una memoria débil que ha sido facilitada por NaB durante su consolidación muestra altos niveles de histona H ₃ acetilada en la reconsolidación.....	82
III.3.3 El inhibidor de KDACs no facilitó la MCS durante la fase de reconsolidación.....	85
III.3.4 El estrés hídrico puede facilitar la MCS durante la reconsolidación pero no involucra acetilación de H ₃	87
III.4 Conclusiones y Discusión.....	90-93

Capítulo IV: Participación de la acetilación de histonas durante la fase de consolidación en vertebrados. Modelo de memoria de reconocimiento de objeto novedoso en *Mus musculus*

IV.1 Introducción.....	94-115
IV.1.1 Tipos de memoria en vertebrados.....	95
IV.1.2 Sistemas de memoria y consolidación sistémica.....	96
IV.1.3 Descripción neuroanatómica del lóbulo temporal medial y sus relaciones con la corteza.....	99
IV.1.4 Memoria de reconocimiento y su sustrato neuroanatómico.....	107
IV.1.5 Paradigma de reconocimiento de objeto novedoso.....	109
IV.1.6 Diferencias en el aprendizaje y tipos de memoria.....	112

IV.1.7 Mecanismos moleculares involucrados en la consolidación de la memoria de reconocimiento.....	113
IV.1.8 Mecanismos epigenéticos y la consolidación de la memoria de reconocimiento.....	114
IV.2 Materiales y Métodos.....	116-130
II.2.1. Animales.....	116
IV.2.2 Dispositivo de entrenamiento y evaluación para el paradigma de reconocimiento de objeto novedoso.....	116
IV.2.3 Procedimiento experimental.....	118
Experimentos de análisis comportamental.....	121
Experimentos de de intervención farmacológica y análisis comportamental	121
Experimentos de correlación.....	128
IV.3 Resultados.....	130-140
IV.3.1 Determinación de parámetros del entrenamiento.....	130
IV.3.2 La actividad de NF- κ B está implicada en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos.....	131
IV.3.3 La actividad de NF- κ B en la consolidación de la memoria de reconocimiento es necesaria en el hipocampo pero no en la corteza insular.....	134
IV.3.4 Un entrenamiento débil concomitante con la inyección del inhibidor de KDACs NaB en hipocampo induce una memoria de reconocimiento de largo término.....	137
IV.3.5 La consolidación de una memoria fuerte implica cambios en los niveles de acetilación de la histona H3.....	139
IV.4 Conclusiones y Discusión.....	140-142
Capítulo V. Discusión final.....	143-158
V.1 Los mecanismos epigenéticos como “caracteres” moleculares de la fuerza de la memoria.....	145
V.2 Posible rol de las KDACs como reguladores negativos de la consolidación de la memoria.....	148

V.3 Rol de la acetilación de histonas durante la reconsolidación. ¿Qué es la fuerza de una memoria?.....	149
V.4 El mecanismo epigenético reversible de acetilación – desacetilación de histonas posee una función evolutivamente conservada en el proceso de formación de la memoria, ¿Cuál?.....	152
V. 5 La utilización de distintos abordajes experimentales para el acercamiento a procesos biológicos complejos.....	157
Bibliografía.....	159-180

Agradecimientos:

Agradezco especialmente a Artur, por otorgarme la oportunidad de trabajar con él y de aprender de su sabiduría, por su enorme paciencia y su amistosa comprensión.

A Sol por su continua ayuda en los experimentos, el arreglo de horarios, del uso de los universales y de las lupas, por los domingos de experimentos y tardes de Sol y extracción.

A Rami, a Marian y a Emi, por enseñarme las rutinas de los cangrejeros y las prácticas de los biólogos moleculares. Y fundamentalmente, gracias por acudir a mis repentinos pedidos de auxilio.

A Vero por compartir el pequeño espacio bioteril conmigo, por enseñarme y ayudarme con los quehaceres ratoniles.

A Gise por las ganas de trabajar conmigo y... por su energía positiva!

Agradezco especialmente a la Laurilla, por ser mi compañera de labo, por estar siempre de mi lado, por compartir conmigo la adicción a las gomitas y las charlas breves, pero inolvidables, en los pasillos.

Agradezco especialmente a la Chanil, por la sana convivencia que construimos día a día, pero esencialmente, por darme la oportunidad de tener una hermana menor.

A Lía por el apoyo científico y no científico, y sobre todo, por las risas en sintonía.

A Viole por la creación de los 5 demonios y por cuidarme, siempre.

Agradezco a Tincho por los debates en el marco de la tesis, y aquellos que se dan en otros marcos.

A Eingel, Carbón, Gaby, La pedette, Martincito, Eugenie, Juli M, Beatricce, Verococo, Héctor, Pepo, Luis PC, Mache, Luis S, Ceci F, Laura R, Mechí, Daniel, Damián, Ale y Marga, por los martes de seminario, viernes de torta y el resto de la semana en un clima de trabajo y alegría compartida.

Dedico esta tesis a mi mamá

Introducción general

I.1 Aprendizaje y memoria

Desde una perspectiva puramente comportamental, el *aprendizaje* puede definirse como un proceso que se manifiesta a través de cambios adaptativos en el comportamiento individual resultantes de la experiencia (Thorpe 1963). Si disecamos los términos fundamentales de esta definición, notamos que, en primer lugar, hace referencia a un *cambio*: es decir, mediante el aprendizaje se flexibiliza la conducta de un individuo ante una determinada circunstancia. A nivel experimental, este cambio se evidencia comparando el *comportamiento* en dos momentos diferentes: durante (t1) y después (t2) de que el aprendizaje haya tenido lugar. En segundo lugar, el término “*adaptativo*” pone énfasis en el hecho de que el tipo de cambio generado representa un beneficio para el individuo, permitiéndole adaptarse a las condiciones de un ambiente cambiante y contribuyendo así a incrementar su aptitud darwiniana (en inglés, *fitness*) (Dukas 2008). Finalmente, el aprendizaje se adquiere a través de una determinada *experiencia*, que incluye eventos de naturaleza sensorial, emocional, cognitiva o motora. Ahora bien, para que los cambios de t1 a t2 puedan expresarse, el aprendizaje necesariamente debe perdurar en el tiempo. Se define a la *memoria* como la retención del cambio comportamental adquirido a través del aprendizaje.

Si bien estas definiciones operacionales de aprendizaje y memoria pueden resultar prácticas e intuitivas, dejan fuera aspectos fundamentales de estos procesos, como por ejemplo su sustento físico. Desde una perspectiva neurobiológica, consideramos a la memoria como una representación interna de una experiencia comportamental, la cual tiene lugar en el sistema nervioso del individuo generando una *traza mnésica* (Maldonado 2008). Es decir, la representación interna es la *codificación* de propiedades del mundo exterior y/o de

un evento, tales como sonido, olores, imágenes, en *lenguaje neuronal*. El almacenamiento en el tiempo de la información aprendida, es decir la *memoria*, en forma de representaciones internas dependientes de la experiencia, puede guiar el comportamiento en eventos posteriores más allá del presente perceptivo o cognitivo, gracias a la potencial capacidad de reactivar tales representaciones (Dudai 2002b). Sin embargo, no todas las representaciones internas que guían el comportamiento son memorias. Construcciones innatas, codificadas genéticamente y establecidas por programas internos durante el desarrollo, aún en ausencia de aprendizaje, pueden ser también representaciones internas. Lo que diferencia a la memoria de otros tipos de representaciones internas es que es generada por un proceso de aprendizaje. La búsqueda de esta representación ha constituido la esencia de la investigación en el campo de la neurobiología de la memoria. En la actualidad, se asume que las memorias o *representaciones internas están codificadas espacio-temporalmente en los circuitos neuronales e implican cambios en las propiedades reactivas de las neuronas que los integran* (Dudai 2002b). Llegado este punto, podemos redefinir al aprendizaje, aludiendo a sus mecanismos, como el proceso a través del cual una experiencia se codifica en circuitos neuronales, expresándose en un cambio del comportamiento. Resulta evidente que el aprendizaje y la memoria están unidos indisolublemente. En ocasiones, se utiliza el término “aprendizaje” para referirse a aprendizaje seguido de memoria y el término “memoria” indicando implícitamente que ésta vino precedida por un aprendizaje.

I.2 Sistema nervioso, plasticidad y memoria

El sistema nervioso de todos los seres vivos está formado por dos tipos de células: las neuronas y las células de la glía. Las neuronas poseen propiedades que otorgan al sistema nervioso la capacidad de ser *plástico*, es decir, un sistema con la

potencialidad de ser modificado. A su vez, estas modificaciones pueden perdurar en el sistema nervioso, otorgando al sistema la capacidad de tener *memoria* (Kandel 2000, Kandel, Schwartz y Jessell 1995). El cerebro debe ambas características a ciertas particularidades de las neuronas. ¿A cuáles?

Por un lado, una neurona posee *polaridad*, es decir, dentro de ella existen regiones anatómica y funcionalmente definidas, tales como el cuerpo celular, dendritas y axón, de manera tal que la información fluye en cierta dirección, de manera polarizada. Básicamente, el cuerpo celular o *soma* contiene al núcleo y al citoplasma con sus organelas, y es el sitio donde transcurren los procesos de transcripción génica (dentro del núcleo) y traducción (fuera del núcleo). Las dendritas y el axón forman extensiones o arborizaciones del citoplasma de una neurona que la conectan a otras neuronas, localmente (dendritas) o a distancia (axón). Típicamente, las dendritas de una neurona constituyen la región receptiva o de entrada de la información, desde dónde la misma fluye hasta el soma, de ahí hacia el axón y se propaga por éste hasta llegar a su porción terminal que constituye usualmente la región de salida de la información.

Por otro lado, las neuronas son células *excitables*. Todas las células poseen una membrana celular que separa el citoplasma del medio extracelular. Ambos espacios poseen composición química diferente, por ejemplo se diferencian en la concentración de moléculas con carga. Esta diferencia de cargas genera una diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana de la célula. Si una porción de la membrana es perturbada de alguna manera, esta diferencia de potencial eléctrico puede variar. Cuando las neuronas sufren cambios rápidos en su potencial eléctrico de membrana, éstos no necesariamente se disipan sino que pueden propagarse a lo largo de la membrana, gracias a su *excitabilidad*. Esta propiedad emerge de la forma y polaridad de las neuronas y de la existencia de proteínas ancladas en la membrana de estas células que funcionan como canales iónicos. Estos canales proteicos dejan pasar o no iones hacia dentro o hacia fuera de la neurona. Algunos de ellos, los *canales dependientes de voltaje*, cuya apertura

es inducida por cambios en el potencial eléctrico de membrana, promueven el inicio y la auto-propagación de una señal eléctrica regenerativa hacia porciones contiguas de la membrana de una misma neurona o, inclusive, a neuronas vecinas conectadas a aquélla. De este modo, un circuito neuronal tiene la capacidad de transmitir información de un sitio a otro. La diferencia de potencial eléctrico que se propaga activamente llevando información de una región a otra de la misma neurona se denomina *potencial de acción*, una señal todo-o-nada de gran amplitud, que se inicia en el *cono axónico* y se auto-perpetúa invariablemente.

Además, las neuronas también tienen otra manera de transmitir la información, de una a otra, cuya señal es graduada y modificable: el *potencial sináptico*. Cada neurona posee la capacidad de generar muchos sitios especializados para la comunicación con otras neuronas, llamados *sinapsis*. Cada sinapsis es una zona de unión entre dos neuronas donde la información puede transmitirse mediante una sinapsis *eléctrica* o una sinapsis *química*. En este último caso, la transmisión implica la liberación de moléculas señalizadoras o *neurotransmisores*, que son liberados desde la pre-sinapsis a la hendidura sináptica y difunden hasta llegar a las proteínas de membrana receptoras o *receptores* de estas moléculas en la post-sinapsis. Al ser ocupados por el neurotransmisor, los receptores pueden 1) activar vías de señalización intracelular; 2) afectar directamente la apertura o cierre de canales, promoviendo cambios en el potencial de membrana de la neurona post sináptica. Esta sinapsis es más lenta que la sinapsis eléctrica. Pero, a diferencia de aquélla, es *plástica*. Es decir, la sinapsis química puede ser reforzada o debilitada y ello permite que la comunicación entre las neuronas componentes no sea fija, sino modificable. Por ejemplo, la actividad frecuentemente evocada en una sinapsis induce a que ésta se refuerce, pudiendo promover una mayor liberación de neurotransmisor desde la pre-sinapsis ante la llegada de una señal eléctrica ó induciendo una mayor cantidad de receptores expresados en la membrana post-sináptica que, ante la misma cantidad de neurotransmisor liberado, provocan una respuesta post-sináptica mayor. De esta manera, la plasticidad de una sinapsis química permite el

almacenamiento de *información, codificada* en la actividad sináptica. Siguiendo con el ejemplo de reforzamiento o *potenciación*, una vez modificada la sinapsis, ante la llegada de una estimulación en la pre-sinapsis, la respuesta post-sináptica continuará siendo alta. En la *teoría de la plasticidad sináptica* (TPS) (1893) Ramón y Cajal estableció que la fuerza de una conexión sináptica, la facilidad con la que un potencial de acción en una neurona excita o inhibe a su neurona blanco, puede ser modificada por actividad neuronal y que el proceso de aprendizaje hace uso de dicha maleabilidad. La persistencia de los cambios generados en la comunicación sináptica por el proceso de aprendizaje, según esta teoría prevalente, provee el mecanismo elemental del almacenamiento de la memoria.

Además del efecto en los canales iónicos, que implica cambios rápidos (milisegundos) a nivel del potencial de membrana y puede culminar en un potencial de acción, la activación de los receptores por la interacción con su ligando en la membrana post-sináptica puede generar cambios más lentos (segundos, minutos), mediante la activación de vías de transducción de señales enzimáticas, que resultan en modificaciones de la función sináptica o de toda la neurona. Desde los trabajos en el molusco *Aplysia* y en el modelo de potenciación de largo término (LTP, por sus siglas en inglés *long-term potentiation*) en adelante (Bliss y Lómo 1973, Goelet et al.1986) estos cambios a más largo término, como modificaciones bioquímicas o estructurales en la sinapsis o inducción de una respuesta transcripcional y traduccional, han sido involucrados en procesos de formación de la memoria.

I.3 Distintos niveles de análisis del aprendizaje y de la memoria

Existen distintos niveles de análisis y múltiples enfoques utilizados para investigar los mecanismos involucrados en los procesos de aprendizaje y memoria. Se pueden distinguir tres grandes niveles de estudio, los cuales poseen una relación

jerárquica entre sí: 1) A nivel *comportamental* se estudia cómo una memoria se manifiesta en la conducta del animal; 2) A nivel *de sistemas o de circuitos* se investiga cómo la información es codificada en circuitos neuronales y si existen distintos circuitos que van formando parte de la traza mnésica, implicándose en el almacenamiento de la información y en la expresión de la memoria en distintas fases de la misma; 3) A nivel *celular y/o molecular* se indaga en cómo se modifican las conexiones neuronales y las propiedades reactivas de las neuronas implicadas en la formación y modificación de los circuitos que conforman la traza mnésica, así como también en qué procesos moleculares dentro de las neuronas subyacen y sostienen aquellos cambios a lo largo del tiempo.

Entender el nivel de análisis en el que uno se sitúa para investigar la formación de la memoria es fundamental para interpretar los resultados obtenidos. Luego de un aprendizaje, las representaciones internas de la experiencia en las que se almacena la memoria constituyen el punto crucial en la investigación neurobiológica de estos procesos. Por ello, en el enfoque escogido en la presente tesis, cuando hablamos de cambios moleculares que subyacen a la formación de la memoria no lo entendemos como un mecanismo que codifica de manera independiente la información adquirida, sino que se interpreta en un contexto de circuito neuronal. Más aún, éstos se integran a resultados en otros niveles de análisis para arribar al objetivo principal, el estudio de la memoria.

I.4 Estudio comportamental del aprendizaje y la memoria

Para abordar experimentalmente los procesos de aprendizaje y memoria se requiere simplificar el tipo de experiencia que recibe el sujeto experimental, de modo tal de controlar las condiciones y estímulos que se le presentan. A partir de

los trabajos de científicos como Thorndike y Pavlov (Rosenzweig 1998), el estudio del aprendizaje se benefició en gran medida con el uso de modelos animales y el desarrollo de diversos *paradigmas* experimentales, los cuales constituyen experiencias sensoriales en condiciones controladas. Estos procedimientos permitieron establecer distintas formas de aprendizajes: de tipo *no asociativo* y de tipo *asociativo*. Posteriormente, estos modelos abrieron la posibilidad de realizar intervenciones de distinto tipo en el sistema nervioso, lo cual permitió adentrarse en un análisis mecanístico de los procesos de memoria (ver sección I.3).

Dentro de la categoría de aprendizajes no asociativos encontramos a los procesos de *habitación* y *sensibilización*. En estos procedimientos se considera que el individuo aprende únicamente sobre la presencia de un estímulo determinado. La sensibilización causa un aumento inespecífico en los niveles de respuesta luego de la exposición a un primer estímulo intenso o nocivo. Por el contrario, la habituación se logra mediante una presentación repetida de un estímulo relevante, de modo tal que las respuestas del individuo ante la presencia del mismo van haciéndose cada vez menos intensas. El decremento está específicamente relacionado con el estímulo original y es posible reinstalar la respuesta ante la presentación de un estímulo diferente (Carew 2000). Ciertos autores (Whitlow y Wagner 1984) consideran a la habituación como un caso de aprendizaje asociativo porque numerosos resultados demuestran que el individuo realiza inevitablemente una asociación entre el estímulo y otros parámetros, tales como el contexto donde fue recibido.

El fundamento básico de los aprendizajes de tipo asociativo radica en la capacidad de asociar dos o más eventos inicialmente inconexos, lo cual permite a un animal extraer las características relevantes del ambiente que lo rodea, posibilitándole hacer predicciones acerca de los estímulos y sus potenciales consecuencias. Los paradigmas utilizados para estudiar este tipo de aprendizaje se desarrollan a partir de dos condicionamientos básicos: I) En el *condicionamiento clásico* se presentan de modo pareado dos estímulos diferentes: uno de valor

neutro (estímulo condicionado, EC) y otro de valor significativo para el individuo (estímulo incondicionado, EI) que genera una respuesta espontánea (respuesta incondicionada, RI). Mediante este procedimiento se logra una asociación entre los dos estímulos, adquiriendo el EC un valor predictivo de la llegada del EI, de tal modo que la sola presentación del EC logra generar una respuesta en el individuo (la respuesta condicionada, RC). Por ejemplo, en un condicionamiento contextual de miedo en ratas, se coloca al animal en un contexto (EC) donde recibe una descarga eléctrica en las patas (EI) que le provoca una respuesta de sobresalto seguido por una respuesta de congelamiento (RI). Luego de un intervalo en otro lugar, al volver a colocar a la rata en el contexto original, se observa la respuesta de congelamiento (RC) sin necesidad de presentarle el EI. II) El *condicionamiento instrumental* u *operante* implica la asociación entre un determinado comportamiento con un estímulo incondicionado, siendo en este caso el individuo el que detecta la contingencia entre ambos. Por ejemplo, un ratón al explorar la arena experimental (EC) presiona por casualidad una palanca (RI), tras lo cual recibe una ración de alimento (EI). La repetición de esta secuencia lleva a descubrir que su acción, apretar la palanca, trae aparejada una consecuencia, la comida.

A partir de una gran cantidad de evidencias provenientes de diferentes modelos, se establecieron una serie de “leyes” o principios generales del aprendizaje asociativo (Maldonado 2008), entre los que podemos destacar: a) Cuanto más fuerte sea la contingencia entre el EC y el EI (*i.e.*, mayor la probabilidad de que si ocurre el primero, ocurrirá el segundo), mayor será la fuerza de la asociación; b) Es necesaria una proximidad espacio-temporal entre el EC y el EI para generar la asociación entre ambos; c) La fuerza de la asociación entre el EC y el EI será mayor cuanto mayor sea el EI; d) Es posible generalizar la respuesta condicionada a estímulos de características similares al EC; e) El intervalo entre los ensayos de aprendizaje (donde se presentan apareados el EC y el EI) es un factor determinante en el condicionamiento, siendo más eficiente un espaciamiento de los mismos que un intervalo muy pequeño o nulo. Si bien existen excepciones, se han demostrado estos principios en especies tan diversas como la babosa de mar

Aplysia, la abeja *Apis*, o el mono *Rhesus*, conduciéndonos a pensar que existe cierta universalidad en los fenómenos de aprendizaje asociativo. Evidentemente, esto no implica que todas las especies puedan formar las mismas asociaciones pues existen restricciones biológicas del aprendizaje que implican cierta predisposición del sistema nervioso de las diferentes especies a formar algunas asociaciones y no otras (Menzel 2007).

Con este resumen se abarca, a grandes rasgos, los tres niveles de complejidad que puede tomar el aprendizaje: aprendizaje de la existencia del estímulo (habitación y sensibilización), aprendizaje de la asociación entre estímulos (condicionamiento clásico) y aprendizaje del efecto del comportamiento propio (condicionamiento operante) (Rescorla y Wagner 1972). En cada caso, este comportamiento aprendido por el animal puede dar lugar a la formación de distintos tipos de memorias de corto, mediano ó largo plazo, dependiendo de la persistencia del comportamiento aprendido a lo largo del tiempo luego de la experiencia original.

I.5 Estudio mecanístico del aprendizaje y la memoria

En función de su persistencia, las memorias pueden clasificarse, básicamente, en dos tipos: memoria de largo término (MLT) o memoria de corto término (MCT). Ambos *tipos* de memoria pueden distinguirse entre sí por los procesos moleculares implicados durante la formación de las mismas (ver Introducción de capítulo II). Brevemente, la MCT involucra vías de señalización intracelular y modificaciones post traduccionales en proteínas ya existentes, mientras que la MLT además implica síntesis *de novo* de proteínas e inducción de expresión génica.

A partir de estudios farmacológicos, moleculares y conductuales, se definieron diferentes *fases* por las que transcurre el proceso de formación de una memoria, a partir del momento del aprendizaje. En primer lugar, existe una fase de *adquisición* de la información, proveniente de los diversos estímulos experimentados por el animal en el medio ambiente, la cual es función de los sistemas sensoriales. Seguidamente, la representación interna de la experiencia sensorial se procesa y se almacena en distintas áreas del sistema nervioso central (SNC), conduciendo a la formación de nuevas memorias. En primera instancia, la memoria puede ser de corta duración, en cuyo caso se denominaría MCT. Asimismo, y dependiendo del tipo de experiencia sensorial experimentada por el animal, es posible que el cambio en el comportamiento perdure por más de 24 horas. En ese otro caso, decimos que se ha formado una MLT. Mediante una fase de *consolidación*, la MCT sería remplazada por una forma de memoria más estable y de larga duración, la MLT. Se propone la existencia de una mínima cantidad de tiempo necesaria para que la MLT sea consolidada. Durante este período la MLT se caracteriza por presentar un estado lábil, es decir, pasible de disrupción por diversos agentes amnésicos, tales como choques electro-convulsivos (Duncan 1949) o inhibidores de síntesis de proteínas (Barondes 1975, Davis y Squire 1984, Pedreira et al.1995). Al cabo de este período, la memoria puede ser almacenada de forma permanente, por días, años, o incluso toda la vida del individuo. Una vez formada, la MLT es insensible a los agentes amnésicos antes mencionados. Cuando la memoria está consolidada, la presentación de un recordatorio de la fase de adquisición, puede producir la *evocación* de la memoria. Sucesivamente, y bajo determinadas condiciones, puede ser posible la *reactivación* de la memoria y la consecuente inducción de una “nueva” fase de vulnerabilidad o labilidad, denominada fase de *reconsolidación* (Pedreira et al.2002, Bustos 2009). En esta fase la memoria vuelve a atravesar un proceso de re-estabilización que la retorna a su estado consolidado. Esta fase de re-labilización también es definida operacionalmente por su sensibilidad a agentes amnésicos (Misanin et al.1968, Przybyslawski y Sara 1997, Nader et al.2000).

I.6 Consolidación

El término *consolidación* es utilizado en el estudio de la memoria para referirse a dos familias de procesos: la consolidación *celular* y la consolidación *sistémica* (Nader y Hardt 2006). La consolidación celular es llevada a cabo dentro de los primeros minutos a horas inmediatamente después del aprendizaje y fue encontrada en todos los sistemas estudiados hasta ahora. En este caso, el término engloba a la estabilización dependiente del tiempo de los mecanismos celulares o modificaciones en las propiedades de las neuronas que ocurren luego de la adquisición de la información. En el campo actual de las neurociencias, el cambio en la eficacia sináptica durante la formación de la memoria ha sido definida como una propiedad universal, por eso a este tipo de proceso se lo suele denominar consolidación sináptica (Kandel 2001, Dudai 2004). En cambio, la consolidación sistémica fue encontrada inicialmente en vertebrados, es más prolongada e implicaría la reorganización a través del tiempo de circuitos neuronales y áreas del sistema nervioso central dedicadas al procesamiento y almacenamiento de la información (Dudai 2002b). Por ejemplo, en algunas clases de memoria en humanos se ha observado que una memoria que dependía inicialmente del hipocampo, a través de su consolidación sistémica se vuelve independiente de esta región del cerebro y dependiente de otra (Scoville y Milner 1957, Squire y Alvarez 1995). Tanto en el capítulo II de esta tesis como en el capítulo III, cuando se menciona “consolidación” se refiere a la consolidación del tipo celular. En el capítulo IV se retoma el concepto de consolidación del tipo sistémica.

I.7 Consolidación versus Reconsolidación

La teoría de la consolidación afirma que, tras la adquisición, una memoria transita por un proceso que la convierte en estable y perdurable. Mientras este proceso no se complete, la memoria es inestable y sensible a distintos agentes amnésicos (McGaugh y Petrinovich 1966, Davis y Squire 1984). Este concepto fue cuestionado, por lo menos en su formulación clásica, a partir de estudios mostrando que la *evocación* de una memoria puede abrir un nuevo período de labilidad. Estos trabajos indicaron que después de su *reactivación*, la memoria requiere de un mecanismo tipo-consolidación para su re-estabilización, un proceso llamado reconsolidación (Misanin et al.1968, Mactutus et al.1979, Sara 2000, Nader et al.2000, Pedreira et al.2002, Boccia et al.2004, Alberini 2005). Es materia de intenso debate si los procesos moleculares que se inducen durante la reconsolidación son recapitulados, en su totalidad o en parte, de igual manera que durante la fase de consolidación, o si la consolidación y la reconsolidación de la memoria implican mecanismos diferentes.

A su vez, algunos autores proponen que el fenómeno denominado reconsolidación es una manifestación de una lenta consolidación y no la recapitulación de un proceso ya cerrado (Dudai y Eisenberg 2004). Consideran que la reconsolidación expande el concepto de consolidación y proponen que las memorias podrían consolidar durante un periodo más extenso que lo que originalmente se creía. En un trabajo reciente (Bekinschtein et al.2007) se ha postulado la existencia de una fase de “estabilización retardada”, requerida para el mantenimiento, pero no para la formación, de una memoria. En este trabajo los autores proponen que la persistencia de una memoria implica al menos algunos de los mecanismos moleculares característicos del proceso de consolidación, y que, para el mantenimiento de la información adquirida, se producirían episodios recurrentes de consolidación.

I.8 Regulación de la expresión génica y su relación con la memoria

Desde principios del siglo XX se ha puesto énfasis en el estudio del proceso de transición entre los dos tipos básicos de memoria, la MCT y la MLT, al estudiarse el aprendizaje verbal en humanos (Mueller y Pilzecker 1900). Se propone la existencia de una mínima cantidad de tiempo necesaria para que la MLT sea consolidada. Al cabo de este periodo, la memoria es almacenada en una forma más estable y de larga duración. Durante este intervalo de tiempo de varias horas de duración, la memoria puede ser afectada por distintos agentes disruptores, entre los cuales se encuentran el electrochoque convulsivo (Duncan 1949) y la inhibición de síntesis *de novo* de proteínas. Este último proceso celular representa la primera base bioquímica descrita en el análisis de los mecanismos moleculares que subyacen a la formación de la memoria, y permitió establecer dentro del proceso de consolidación la necesidad de los procesos de transcripción y traducción (Flexner et al.1963, Agranoff 1972, Barondes 1975, Davis y Squire 1984, Crow y Forrester 1990, Pedreira et al.1995). La hipótesis actual de la consolidación de la memoria establece que en esta fase deben sintetizarse nuevas proteínas (Goel et al.1986) que den sustento subcelular al cambio en las conexiones sinápticas subyacentes al cambio en el comportamiento. Por otro lado, en trabajos recientes se ha postulado la existencia de un segundo período crítico de consolidación, también dependiente de la síntesis proteica y de mecanismos de transducción de señales en el lapso de tiempo que va entre las 4 y 6 horas después de la adquisición (Freeman et al.1995, Bernabeu et al.1997, Bourtchuladze et al.1998, Freudenthal y Romano 2000, Locatelli et al.2002, Igaz et al.2002).

La síntesis de proteínas que ocurre durante el primer período de consolidación incluye productos de genes tempranos, que serían esenciales para la

formación de la MLT (Alberini et al.1994). Dado que la fase de consolidación está presente en distintos tipos de aprendizaje y parece hallarse en todo el reino animal, diferentes genes tempranos podrían servir como integrantes de una familia molecular implicada en cambios plásticos adaptados a diferentes tipos de memorias que tienen lugar en distintos sustratos neuronales. Algunos modelos experimentales han servido para probar que estos cambios en el patrón de expresión génica son necesarios para producir alteraciones fisiológicas y morfológicas de largo término en las terminales sinápticas así como en procesos de sinaptogénesis (Montarolo et al.1986, Castellucci et al.1989, Glanzman et al.1990). Se postula que tales procesos de plasticidad neuronal que llevan a la reorganización de los contactos sinápticos de las neuronas involucradas, constituyen los mecanismos celulares básicos que dan sustento a la formación de la MLT.

La regulación de la expresión génica ha sido postulada como un proceso crítico en la formación de memorias a largo término y así como también durante la reactivación de memorias ya formadas (Agranoff 1967, Goelet et al.1986, Duvarci et al.2008).

I.9 Cromatina

El genoma de todas las células se encuentra empaquetado en una estructura llamada *cromatina*. La cromatina está formada por ácido desoxiribonucleico (ADN) y proteínas que se asocian a éste. Las distintas proteínas que se unen al ADN lo hacen a distintos niveles, llevando a cabo la compactación de la estructura de la cromatina y generando distintos grados de empaquetamiento de la misma. Ciertas características de las proteínas que se unen covalentemente al ADN permiten un movimiento dinámico del grado de compactación en determinados sitios del genoma.

El nivel mínimo de compactación de la cromatina es el nucleosoma. Esta unidad consiste en un núcleo de ocho proteínas llamadas histonas (octámero de histonas) y una porción de ADN de 146 ± 2 pares de bases (pb) de longitud que se enrolla haciendo 1.65 vueltas alrededor del octámero. Este complejo nucleoproteico se repite esencialmente cada 200 ± 40 pb a lo largo del genoma en células eucariotas (Ztlatanova 2009). Existen varias clases de histonas; las que conforman el octámero son histonas H3, histona H4 (ambas en homodímeros), histona H2A e histona H2B (en heterodímero). Estas unidades repetitivas se organizan, a su vez, en estructuras de órdenes más altos. El siguiente orden se genera al unirse la histona H1 al ADN conector o *linker*, el cual es la porción de ADN libre entre nucleosomas. Y así, la unión de diferentes proteínas va ensamblando al ADN a distintos niveles hasta compactarlo.

Al pH celular, el ADN es una molécula con carga neta negativa. En el mismo microambiente nuclear, las histonas poseen una estructura primaria, o constitución aminoacídica, con gran cantidad de residuos básicos de lisina y arginina, haciendo que estas proteínas contengan carga neta positiva. Las estructuras secundaria y terciaria de las histonas nucleosomales, es decir, los distintos dominios estructurales que adoptan estas proteínas al plegarse y que son estables en el ambiente nuclear, consisten en tres motivos del tipo α -hélice, unidos entre sí por dos lazos o *loops*, los cuales son las zonas libres entre dominios estructurales. Las características estructurales y de carga de estas proteínas y del ADN inducen distintos tipos de interacciones ADN-histonas, tales como puentes de hidrógeno entre los átomos de oxígeno de los grupos fosfatos del ADN y los átomos de nitrógeno de la unión amida de la cadena polipeptídica de las histonas, puentes de hidrógeno e interacciones iónicas entre las cadenas laterales de los aminoácidos básicos de las histonas y los átomos de oxígeno de los grupos fosfato del ADN, entre otras (Luger K 1997).

Las histonas son proteínas predominantemente globulares excepto por sus colas amino terminales, las cuales no tienen una estructura definida y protruyen

del nucleosoma. Una característica de las histonas, y particularmente de sus colas amino terminales, es que contienen una gran cantidad de residuos que pueden sufrir diversidad de modificaciones covalentes, afectando la unión histona-ADN en un mismo nucleosoma, y/o la interacción entre histonas de nucleosomas adyacentes y, en consecuencia, la estructura de la cromatina a nivel de nucleosoma como así también en órdenes más altos (Figura I.1).

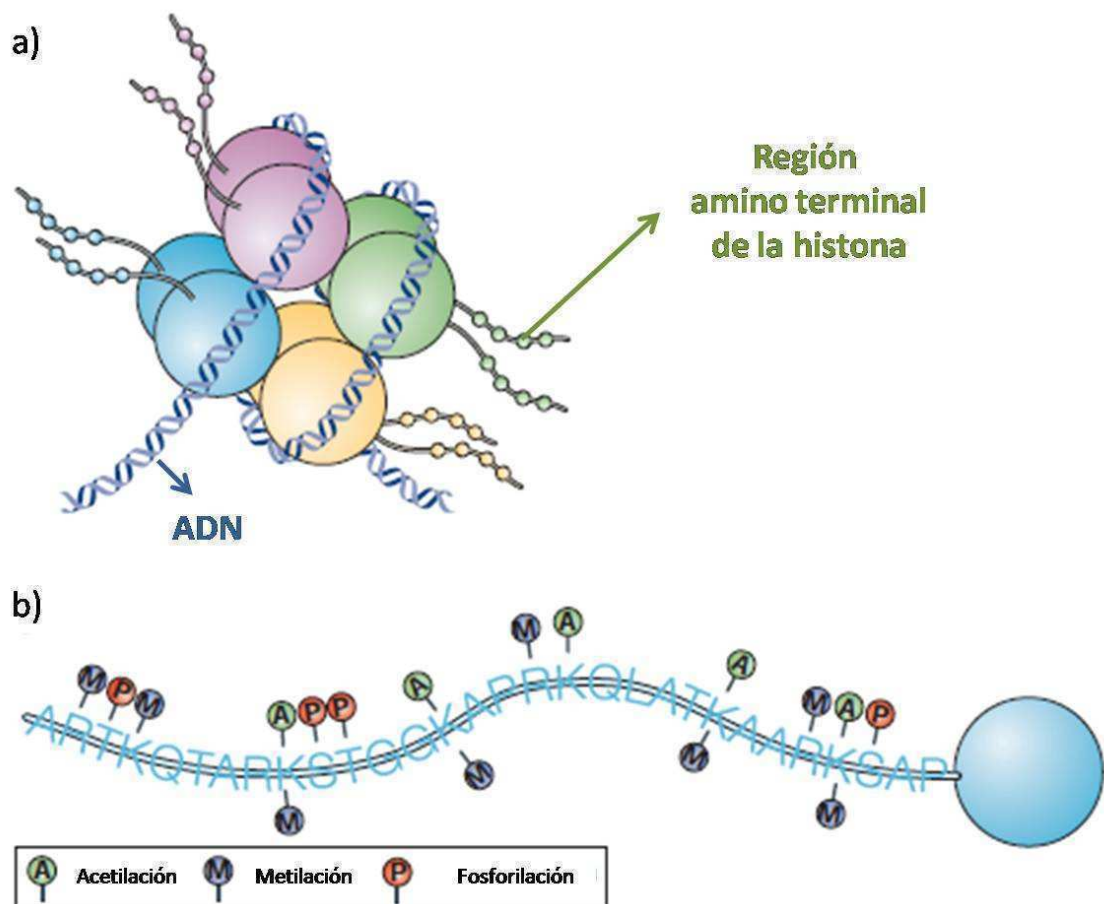


Figura I.1: Modificaciones post-traduccionales de las histonas. a) Dibujo de un nucleosoma conformado por el octámtero de histonas, ilustradas como círculos de colores, y el ADN. Se distinguen las colas amino-terminales de las histonas protruyendo desde el nucleosoma. b) Representación de la histona H3 de humanos, ilustrando los primeros 30 aminoácidos de la cola amino-terminal y las posibles *marcas* epigenéticas que pueden contener. (Gráfico extraído de Levenson y Sweatt 2005).

La estructura de la cromatina adopta un espectro de estados funcionales inter-dispersos a lo largo del genoma que van desde formas condensadas e inactivas (*heterocromatina*) hasta zonas abiertas y activas (*eucromatina*), con algunas regiones presentes en un estado altamente reprimido e inactivo de manera permanente para promover la estabilidad genómica, otras en un estado reprimido pero permisivo o inactivo de manera transitoria y ciertas regiones en estado preparado para la activación. Estos dos últimos estados de la cromatina permiten la transcripción génica que contribuye a diversos procesos celulares. Los distintos dominios o *microdominios* funcionales de la cromatina se mantienen o demarcan por una compleja interacción entre proteínas arquitecturales, *marcas* del genoma y procesos epigenéticos (Mehler 2008).

I.10 Epigenética

La *genética* es la rama de la biología que estudia la herencia de los caracteres. Los genes son las porciones del ADN cuya secuencia nucleotídica codifica a una proteína. El genoma de toda célula contiene muchos genes, los cuales no necesariamente poseen una transcripción activa en todo momento. Para inducir su expresión o transcripción, los genes precisan de la maquinaria de transcripción que se une, en primera instancia, a las regiones regulatorias de los mismos. Las regiones regulatorias son tramos del ADN, cercanos o lejanos a los genes que regulan, cuya secuencia permite el pegado de distintas proteínas, tales como factores, cofactores, represores y correpresores transcripcionales, que modulan la expresión de esos genes. Dentro de las regiones regulatorias se encuentran los *promotores*, sitios río arriba de cada gen que pueden contener secuencias de pegado específico de distintos factores de transcripción, los cuales activan la transcripción del mismo. Como vemos, en términos de la genética, los genes y sus

regiones regulatorias son secuencias en el ADN que contienen la información necesaria para producir una proteína. El término *epigenética* es utilizado por primera vez por Waddington (Waddington 1957), para responder al problema de cómo hacen dos células de un mismo organismo, por ejemplo una célula del hígado y una del músculo, para ser tan distintas si tienen exactamente la misma secuencia de nucleótidos (con excepción de algunas células de su sistema reproductivo y otras pocas de su sistema inmune) en todo su genoma. Waddington acuñó el término epigenética para conceptualizar a aquellos mecanismos que se encuentran río arriba de la lectura de secuencia de nucleótidos de un gen, en el genoma de esas células, que controlan la misma. De esta manera, siguiendo el ejemplo, determinadas *marcas epigenéticas* en los genes A,B,C,D activarán o inhibirán la transcripción de esos genes, y la consecuente síntesis de proteínas codificadas, en una célula hepática y otras lo harán en los genes A,E,F,G en una célula muscular. Entonces, se denominan *marcas epigenéticas* a aquellas modificaciones en la estructura de la cromatina que afectan a la transcripción de los genes en cuya secuencia se encuentran. Estas marcas pueden ser modificaciones post traduccionales (MPTs) de histonas, en las que se le unen covalentemente diferentes grupos químicos, como la acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación y sumolación), así como también cambios en los patrones de metilación de los residuos de citosina del ADN. Otros mecanismos epigenéticos incluyen incorporación de variantes de histonas a los nucleosomas, remodelación de nucleosomas y de cromatina de más alto orden, generación de ARN no codificante, edición de ARN y recodificación de ADN. Todos estos *procesos epigenéticos* ocurren de manera interdependiente y coordinada, para preservar la organización de los distintos microdominios funcionales del genoma y la fidelidad de los mecanismos que sobre éste ocurren (Mehler 2008).

Se ha postulado que las modificaciones de la cromatina modularían la expresión génica no sólo por afectar la unión de los factores de transcripción de un modo puramente estérico, bloqueando o descubriendo un sitio de unión del factor al ADN, sino también de maneras más sutiles, proveyendo directamente una plataforma para la unión de factores de transcripción y cofactores adicionales que

identifican o *leen* esas marcas. Se denominó *código de histonas* (Jenuwein y Allis 2001) a las modificaciones en estas proteínas cuya presencia es reconocida específicamente por factores de transcripción y cofactores, modulando la progresión y fidelidad de la función genómica en los sitios donde se posicionan.

Estas definiciones son útiles para entender que durante la transcripción de un determinado gen, no sólo importa la presencia o ausencia de ciertas secuencias en las regiones regulatorias del gen sino también el estado de la estructura de la cromatina en dichas regiones.

Las *marcas* pueden ser establecidas a lo largo del genoma en el momento en el cual se determina el destino de una célula, sirviendo como almacenaje de información a largo plazo para mantener ese fenotipo celular a lo largo de toda la vida de la misma. Sin embargo, se ha demostrado que los mecanismos epigenéticos no servirían tan sólo para inducir cambios permanentes en la expresión génica, como en el establecimiento y la perpetuación del fenotipo celular, sino también, como en el caso de células totalmente diferenciadas y que ya no se dividen, las neuronas, las *marcas* epigenéticas podrían regular la expresión génica en respuesta a la actividad celular, con una longevidad o temporalidad distinta (Borreli et al.2008).

I.11 Acetilación de histonas y regulación de la expresión génica

En esta tesis estudiamos la función de la cromatina en la regulación génica durante el proceso de formación de la memoria, tomando como modelo de proceso epigenético a una de las modificaciones post traduccionales de las histonas más estudiada: la *acetilación* (Strahl y Allis 2000, Kouzarides 2007). Este proceso implica el agregado de un grupo acetilo (-COCH₃) al aminoácido lisina (K). Dentro de todas las modificaciones que pueden sufrir las histonas, la acetilación posee el

mayor potencial para desarmar la estructura de la cromatina, ya que neutraliza la carga positiva del residuo básico de lisina afectando directamente la carga de las histonas, decreciendo su afinidad por el ADN y, consecuentemente, desarmando la arquitectura de la cromatina y permitiendo el reclutamiento de la maquinaria transcripcional (Norton et al. 1989, Vettese-Dadey et al. 1996, Kouzarides 2007). Además, se conocen una gran variedad de cofactores transcripcionales, como modificadores y remodeladores de la cromatina, que reconocen esta marca epigenética, uniéndose específicamente y activando la transcripción (Zhou y Zeng 2002).

La acetilación está asociada con activación de la transcripción mientras que el proceso inverso de retirar el grupo acetilo de los residuos de lisina, llamado desacetilación, está asociado con el silenciamiento génico (Figura I.2). La acetilación es una de las modificaciones de histonas mejor caracterizada. Las enzimas modificadoras de la cromatina que llevan a cabo la acetilación y deacetilación de histonas ya han sido descritas (Sternier and Berger 2000): las acetilasas (HATs, por sus siglas en inglés: histone acetyl transferases), como la proteína CBP (por sus siglas en inglés: CREB binding protein) y las deacetilasas (HDACs, por sus siglas en inglés: histone deacetylases), respectivamente.

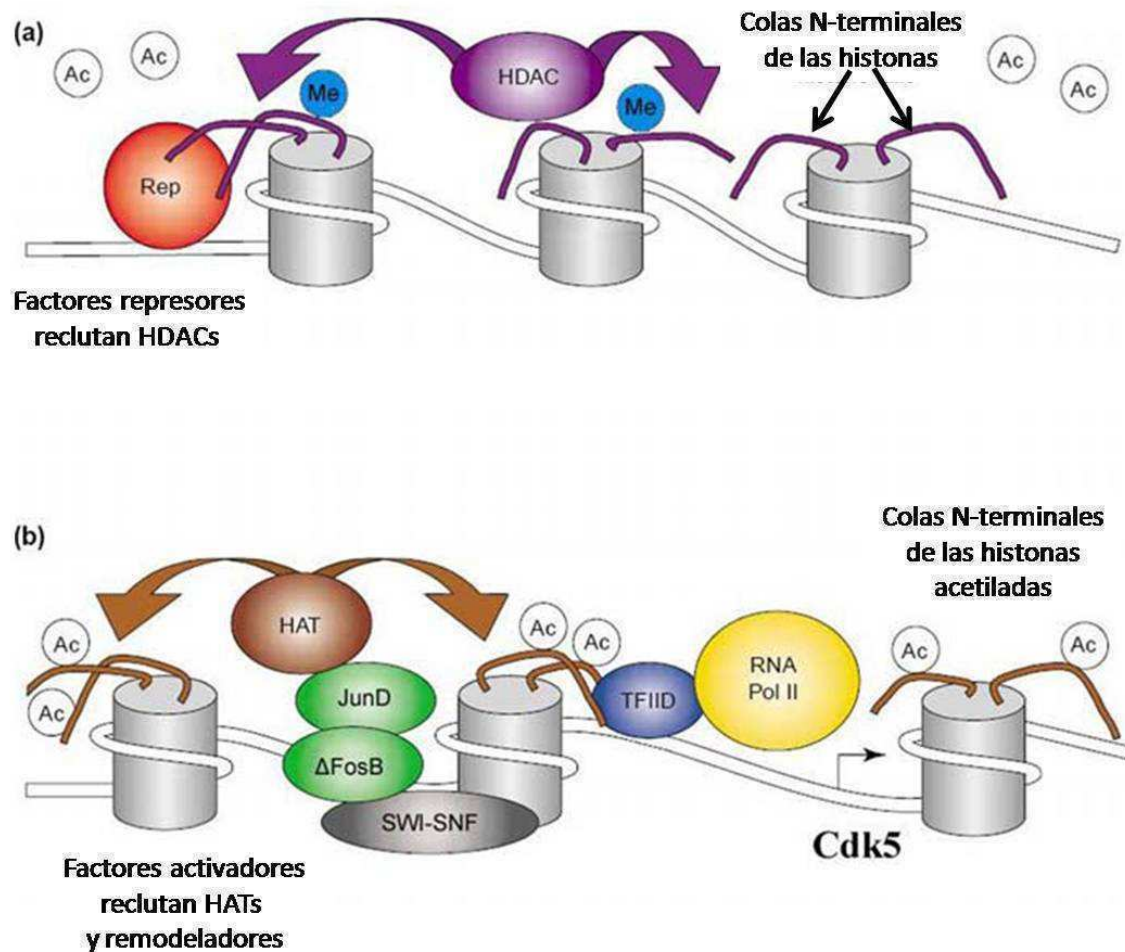


Figura I.2: El proceso reversible de acetilación-desacetilación de histonas y su relación con la transcripción génica. El gráfico describe un esquema propuesto para los eventos de remodelación de la cromatina en un gen inducido por cocaína (gen *Cdk5*). a) La región promotora del gen se encuentra en estado reprimido, en el cual un represor sitio específico (Rep) recluta HDACs, las cuales remueven acetilos (Ac) de las colas amino terminales (N-terminales) de las histonas. b) El estado activo de la cromatina en el gen inducida por cocaína. Los factores de transcripción (JunD y deltaFosB) reclutan HATS, las cuales inducen la acetilación de las histonas. De esta manera, se promueve la unión de la maquinaria de transcripción basal (TFIID y RNA Pol II) al promotor del gen y la transcripción del mismo (Gráfico de Colvis et al.2005).

Aunque la acetilación fue identificada hace 40 años como una clase de MPT de las histonas, se conoce hoy en día que también ocurre en otras proteínas como factores de transcripción, otros reguladores nucleares y varias proteínas

citoplasmáticas (Glozak et al, 2005). Por ello, se ha sugerido que la nomenclatura de estas enzimas cambie a una denominación más general, como KATs y KDACs, por acetilasas y desacetilasas de lisinas, respectivamente. Esta nueva terminología es la utilizada en esta tesis.

I.12 Epigenética y memoria

Todas las células eucariotas contienen cromatina y esta universalidad indicaría que la compactación del ADN ha sido fijada en períodos muy tempranos en la escala evolutiva, aún antes de la aparición de los sistemas nerviosos más primitivos. Además, las histonas son proteínas sumamente conservadas entre los organismos. De manera tal que es lógico pensar en la estructura de la cromatina como plataforma de diversos procesos importantes para la fisiología de toda célula. ¿En qué procesos y de qué manera la usarían las neuronas? ¿Cómo las experiencias individuales en un entorno dinámico son transmitidas al genoma de las neuronas y cómo esa información nuclear es almacenada y disponible para ser utilizada posteriormente?

Las MPTs de las histonas y la remodelación de la cromatina han sido implicadas en el mantenimiento del fenotipo en las células madre neurales y en la progresión de su destino celular, en la especificación y maduración de los subtipos neuronales y gliales, en la homeostasis neuronal, en diferenciación sexual del cerebro, en procesos de plasticidad neuronal, en aprendizaje y memoria y otras capacidades comportamentales y cognitivas, en envejecimiento neuronal y en la patogénesis de diversas enfermedades neurológicas y psiquiátricas (Bhaumik et al.2007, Blasco 2007, Feng et al.2007, Hsieh y Gage 2004, Kondo 2006, McCarthy et al.2009, Mikkelsen et al.2007, Ooi y Wood 2007, Shi et al.2007, Taniura et al.2007, Tsankova et al.2007). Una de las primeras evidencias que demuestran la modulación de la estructura de la cromatina en un gen debido a una experiencia

comportamental fue presentada en un trabajo realizado sobre el cuidado parental en ratas (Weaver et al. 2004). Los hallazgos sorprendentes fueron que: 1) la conducta maternal influyó sobre el desarrollo de la respuesta a estrés en las crías, en un efecto mediado por cambios en la estructura de la cromatina en el promotor del gen del receptor de glucocorticoides en hipocampo; 2) las marcas epigenéticas inducidas en el gen son persistentes pero reversibles.

En particular, la participación de mecanismos epigenéticos durante la formación de la memoria ha sido postulada como un suministro continuo de regulación de la expresión génica, específicamente requerida para mantener a largo término los cambios inducidos, que forman parte en los procesos de plasticidad neuronal, por medio de proveer marcas potencialmente estables en el genoma (Tsankova et al. 2004, Kumar et al. 2005, Hsieh y Gage 2005, Barret y Wood 2008, Levenson y Sweatt 2006, Colvis et al. 2005,). Ya que la interacción entre factores de transcripción y cromatina depende de las modificaciones en la misma, por medio de estos procesos de regulación la generación de cambios estables en el patrón de expresión génica durante las fases de consolidación y reconsolidación podría constituir un mecanismo importante para la estabilidad de la memoria a largo término (Alberini 2009). Sin embargo, el estado de la estructura de la cromatina durante estas fases de la memoria ha sido estudiado de manera incipiente. Debido a la falta de estudios sobre el transcurso espacio-temporal de estos mecanismos durante la formación de la MLT, el rol de estos procesos en la codificación y almacenamiento de la información se ha limitado a especulaciones. Se ha propuesto la existencia de un *código epigenético* implicado en la formación de la memoria, en el cual patrones específicos de MPTs de histonas y de metilación del ADN contribuirían en la codificación de la saliencia de las señales extra e intra celulares y de su contingencia (Roth y Sweatt 2009, Wood et al. 2006b). Esta hipótesis del *código epigenético para la memoria* surge a partir de la idea original de código de histonas propuesto por Allis (Jenuwein y Allis 2001), pero incluyendo también a la metilación del ADN (Roth y Sweatt 2009). En este contexto, se puede redefinir epigenética como las modificaciones covalentes de la cromatina que

influyen sobre los cambios en la expresión génica que son inducidos por la actividad neuronal y son necesarios para los procesos cognitivos.

Objetivos e hipótesis

El objetivo de esta tesis es estudiar la participación de la epigenética en distintos procesos mnésicos. En particular, se estudiará el papel de la acetilación de histonas en la consolidación y reconsolidación en un modelo de invertebrado y en la consolidación en un modelo de vertebrado, durante la formación de la memoria de largo término.

Las hipótesis propuestas son las siguientes:

- 1) Un protocolo de entrenamiento capaz de inducir la formación de una memoria de largo término, promueve un aumento en la acetilación de histonas durante la fase de consolidación.
- 2) Un protocolo de entrenamiento capaz de inducir la formación de una memoria de largo término, promueve un aumento en la acetilación de histonas durante la fase de reconsolidación.
- 3) Un protocolo de entrenamiento débil que sólo es capaz de inducir una memoria de corto término, puede inducir la formación de una memoria de largo término si se proporciona en concomitancia con la administración de una droga inhibidora del proceso de desacetilación de histonas. La memoria de largo término inducida de esta manera implica al mecanismo de acetilación de histonas durante las fases de consolidación y reconsolidación.
- 4) Diferentes protocolos de entrenamiento que sí inducen la formación de la memoria de largo término, pueden diferenciarse entre sí en cuanto al

reclutamiento del proceso de acetilación de histonas durante su consolidación y reconsolidación.

- 5) La acetilación de histonas es un mecanismo partícipe en la formación de distintas clases de memoria ímplicita y explícita y es evolutivamente conservado.

Capítulo II

Participación de la acetilación de histonas durante la fase de consolidación en el modelo de memoria contexto señal en *Chasmagnathus*

II.1 Introducción

II.1.1 Consolidación de memorias asociativas

La consolidación es definida como un proceso de estabilización dependiente del tiempo que conduce finalmente al almacenamiento permanente de las memorias recientemente adquiridas (Nader y Hardt 2009). La evidencia empírica de la existencia del proceso de consolidación proviene de experimentos demostrando un período de tiempo post adquisición en el cual las memorias son sensibles a la intervención con diferentes agentes (Duncan 1949, McGaugh y Krivanek 1970, Gordon y Spear 1973). Por lo tanto, la memoria puede existir en dos estados: un estado lábil y sensible a ser reforzada o irrumpida, y un estado estable e insensible a estos tratamientos y, por definición, en un estado de memoria *consolidada*. Se ha propuesto que la lenta consolidación de las memorias otorgaría la ventaja adaptativa de permitir que a algunos procesos endógenos activados por la experiencia modulen la *fuerza* de la memoria (Gold y McGaugh 1975). Estos procesos implicarían, por ejemplo, liberación de hormonas que responden al estrés como consecuencia del estado emocional del individuo. En este ejemplo, las hormonas jugarían un rol importante en determinar el significado de la experiencia, regulando la fuerza de esa memoria e inclusive, en algunos casos, seleccionando las experiencias que se almacenarán (McGaugh 1983).

II.1.2 Diferencias en el aprendizaje y tipos de memoria

Tal como ha sido introducido en el primer capítulo, las memorias pueden clasificarse según su longevidad o temporalidad, en memorias de corto término (**MCT**) que duran desde segundos o minutos hasta algunas horas, y memorias de largo término (**MLT**) que persisten al menos 24 horas, pudiendo perdurar meses o años, inclusive toda la vida del animal. Las **MCT** son las memorias que nos permiten mantener la información adquirida al momento del aprendizaje por un

tiempo corto luego de que este ha ocurrido. Las **MLT** en cambio, son aquellas memorias que pueden perduran por tiempos prolongados luego de la adquisición. El proceso por el cual la MLT se vuelve estable y duradera constituye la denominada *consolidación*.

El dominio temporal de las memorias varía considerablemente a través de las especies. Sin embargo, distintas aproximaciones experimentales tanto en modelos de invertebrados como de vertebrados han permitido disecar mecanísticamente entre estas dos clases de memoria y encontrar cambios en procesos anatómicos y/o moleculares característicos de cada una. Son ejemplos el molusco marino *Aplysia* (Carew et al.1972, Carew 2000), la mosca de la fruta *Drosophila* (Tully et al.1994, Quinn 2006), el cangrejo *Chasmagnathus* (Pedreira et al.1998, Maldonado 2002), la rata *Rattus norvergicus* (Serota 1971, Kandel 2000) y el ratón *Mus musculus* (Squire y Barondes 1970, Squire y Kandel 1999). En todos los modelos se observó que la **MCT** requiere de fosforilación de proteínas dependiente de la cascada de señalización de AMP cíclico pero no de síntesis de proteínas. En algunos de ellos se probó la inducción de cambios en la eficacia sináptica durante la formación de la MCT, pero no de remodelación sináptica. La **MLT**, en cambio, requiere de activación de varias cascadas de señalización, como la vía de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), de las quinasas activadas por mitogenos (MAPKs, del inglés *mitogen activated protein kinase*), de las quinasas dependientes de Ca²⁺/Calmodulina, que culminan en la activación de la transcripción génica dependiente de factores de transcripción, tales como la proteína de unión al elemento que responde a AMP cíclico (CREB, del inglés *cAMP-responsive element binding protein*) y el factor nuclear *kappa B*(NF-κB), AP1 y Zif268 (Alberini 2009), y en la síntesis *de novo* de proteínas. En varios modelos se observó que la MLT induce remodelación sináptica.

Asimismo, además de procesos que promueven la formación de **MLT**, existirían mecanismos moleculares inhibitorios que regularían la habilidad para establecer memorias de largo término. Estudios en *Aplysia* y *Drosophila* (Bartsch et al.1995, Yin et al.1994) han evidenciado la existencia de un factor regulador negativo de la transcripción, llamado CREB2, el cual no parece responder a la

misma vía de señalización que estimularía a la proteína activadora CREB1. El balance debe ser alterado a favor del activador para inducir MLT. Otro ejemplo de un regulador negativo es la proteína fosfatasa dependiente de calcio (Ca^{2+}) llamada Calcineurina. Esta fosfatasa tiene una gran afinidad por Ca^{2+} , actúa contrabalanceando la acción de la quinasa dependiente de Ca^{2+} y Calmodulina, CaMKII, cuya participación en la consolidación de la memoria ha sido demostrada (Wayman et al.2008). La inactivación de Calcineurina ha sido evidenciada como facilitador de la memoria (Mansuy 2003). Se ha sugerido que un modo en el que operaría el balance entre proteínas quinasas y fosfatasas durante la consolidación de la memoria podría ser activando/inactivando receptores de membrana o induciendo/inhibiendo la liberación de neurotransmisores, respectivamente, estableciendo un control de la eficacia sináptica y en consecuencia modulando la MLT (Lisman 1994). Estas evidencias demuestran la existencia de procesos moleculares coordinados que regularían tanto positiva como negativamente la formación de la MLT.

II.1.3a Aprendizaje Contexto-Señal en *Chasmagnathus granulatus* como modelo experimental

En el laboratorio de Neurobiología de la Memoria (FCEN-UBA, IFIByNE-CONICET) se realizan desde el año 1986 estudios comportamentales y mecanísticos sobre procesos mnésicos, utilizando al cangrejo *Chasmagnathus granulatus* como animal experimental (Figura II.1.1). *Chasmagnathus* tiene todas las facilidades de experimentación atribuidas a un sistema simple, pero presenta además otras ventajas, como la posibilidad de ser capturado durante todo el año; su fácil mantenimiento en el laboratorio; la constancia de su respuesta de escape ante un estímulo de peligro, base del paradigma de aprendizaje utilizado; y el hecho de carecer de una barrera hemato-encefálica endotelial, lo que permite detectar, en muchos casos, el efecto de drogas inyectadas por vía sistémica en bajas dosis (Maldonado et al.1997, Romano et al.2006a).

Para entender el diseño de los experimentos comportamentales en este modelo, es relevante destacar ciertas características de la biología y hábitat de la especie. La clasificación taxonómica de esta especie la ubica dentro del Phylum Arthropoda, subphylum Crustacea, clase Malacostraca, Orden Decapoda, familia Grapsidae, suborden Brachyura. Posee hábitos semiterrestres, pasa gran parte del tiempo fuera del agua, dentro de cuevas que cava en el barro (Figura II.1.1 B) las cuales forman extensos “cangrejales” que pueden ocupar cientos de hectáreas (Figura II.1.1 C). Es una especie propia de la costa del Atlántico Sur: su distribución geográfica va desde Río de Janeiro hasta el golfo de San Matías en las costas patagónicas argentinas, ubicándose en zonas de transición de agua dulce y salada (Spivak 1997). Su régimen alimentario es variable de acuerdo a las zonas, pero está mayormente compuesto por sedimentos con restos de pequeños invertebrados y vegetales (Alberti et al. 2008, Gutierrez e Iribarne 2004). Por otro lado, su principal predador es la gaviota cangrejera (Figura II.1.1 D) (Berón 2003), lo cual constituye un dato fundamental, dado que los estímulos que pasan por encima del horizonte visual son interpretados por el animal como potencialmente peligrosos (Zeil y Zanker 1997).



Figura II.1.1: *Chasmagnathus granulatus* y su habitat. A: Un ejemplar macho adulto. B: Un animal dentro de su cueva. C: Cangrejal de San Clemente del Tuyú, mostrando la densidad poblacional de cangrejos. D: Una gaviota cangrejera alimentándose.

Chasmagnathus despliega una **respuesta de escape** característica ante la presentación de una figura rectangular opaca moviéndose sobre el animal. Esta respuesta de escape presenta una marcada disminución en intensidad ante la presentación de unas pocas repeticiones del **estímulo visual de peligro** (Figura II.1.2a). Esta disminución de la respuesta puede persistir por un largo tiempo y no puede ser explicada por fatiga motora ni por adaptación sensorial (Brunner y Maldonado 1988) puesto que la presentación de un estímulo no relacionado con el utilizado en el entrenamiento recupera por completo los niveles de escape iniciales (Lozada et al.1990). Esta memoria de larga duración (al menos hasta 5 días) es comportamentalmente robusta y evidente, de adquisición rápida, estímulo-

específica (Lozada et al.1990), frecuencia-específica (Pedreira et al.1998) y dependiente de la fase circadiana (Pereyra et al.1996). La retención de esta memoria se evidencia a nivel del comportamiento en los grupos que fueron entrenados como una respuesta al estímulo visual de peligro significativamente menor que la respuesta de los grupos controles no entrenados (Figura II.1.2b). Típicamente, la evaluación de la memoria a largo término implica que el intervalo entre la sesión de entrenamiento y la sesión de evaluación sea mayor o igual a 24 horas (Lozada et al.1990).

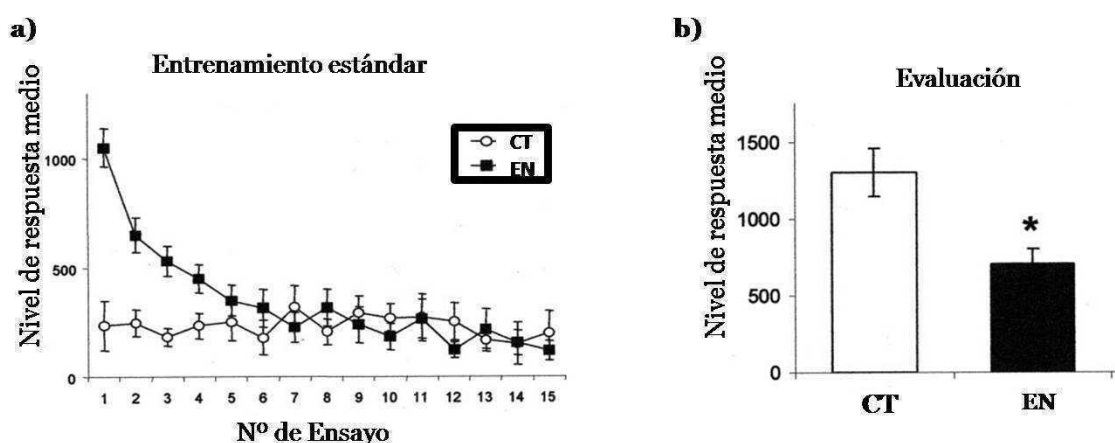


Figura II.1.2. Memoria contexto señal. a) Nivel de respuesta promedio (*medio*) durante una sesión de entrenamiento estándar. b) Nivel de respuesta medio de un grupo control (CT) y un grupo entrenado (EN) en la sesión de evaluación.

Extensos estudios complementarios demostraron que esta memoria a largo término en *Chasmagnathus* es una memoria asociativa, formada por una asociación del contexto que rodea al animal concomitante a la presentación iterativa del estímulo de peligro, y denominada entonces **memoria contexto señal (MCS)**. Para inducir la formación de la **MCS** es necesaria la presentación de un entrenamiento espaciado, de 15 ó más ensayos separados por un intervalo

mayor a 27 segundos (Pedreira et al.1998). También se ha demostrado que la disminución en el nivel de respuesta de escape es específica del contexto de entrenamiento, es decir, que si los animales son entrenados en un contexto A, y evaluados para la retención de la **MCS** en un contexto B distinto de aquel en cuanto a características visuales, no se evidencia la disminución en la respuesta de escape ante la presentación del estímulo de peligro (Tomsic et al.1993, Hermitte et al.1999). En conformidad con las evidencias experimentales observadas en otros modelos de memoria, la **MCS** presenta una fase de consolidación inmediatamente después de la adquisición, dependiente de la síntesis *de novo* de proteínas y de ARN mensajeros (Pedreira et al.1995 y 1996). Por último, se ha demostrado que la **MCS** inducida por el entrenamiento espaciado es de larga duración, perdurando al menos 5 días después de la sesión de entrenamiento (Pedreira et al.1995). En conjunto, estas características enmarcan a la **MCS** dentro de lo clásicamente definido como **memoria de largo término (MLT)**.

De la misma forma, estudios comportamentales, farmacológicos y de biología molecular, han permitido distinguir otra serie de propiedades de la **MCS**. La formación de esta memoria necesita de la vía de transducción de señales dependiente de AMPc (Romano et al.1996 a y b) con la concomitante activación de PKA (Locatelli et al.2000, Locatelli et al.2002) y de la activación de la proteína quinasa regulada por señales extracelulares (ERK, del inglés *extracellular signal regulated kinase*) perteneciente a la vía de señalización de las kinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Feld et al.2005); es positivamente modulada por péptidos de la familia de las angiotensinas (Delorenzi et al.1995 y 1996) y por el sistema gabaérgico (Carbo Tano et al.2009); depende de la activación de receptores de acetilcolina de tipo muscarínicos (Berón de Astrada y Maldonado, 1999), es dependiente de la activación de receptores de glutamato del tipo N-metil D-aspartato (NMDA) (Troncoso y Maldonado 2000) e implica la activación del factor de transcripción NF- κ B (Freudenthal et al. 1998; Freudenthal y Romano 2000).

En el modelo de *Chasmagnathus* se puede distinguir entre memorias de corto y largo término en base a sus requerimientos de inducción durante el período

de aprendizaje, dado en la sesión de entrenamiento, y según su duración, manifestada por la extensión del intervalo entre las sesiones de entrenamiento y evaluación. Un protocolo de entrenamiento **espaciado** de 15 ensayos (**estándar**) o de 30 ensayos (**fuerte**) con un intervalo entre ensayos (**IEE**) mayor a 27 segundos (el IEE típicamente utilizado es de 171 segundos) produce una MLT, la memoria contexto señal (**MCS**), que dura al menos 5 días (Pedreira et al.1998), siendo el cambio en la conducta durante la sesión de evaluación más pronunciado en aquellos animales entrenados con un protocolo fuerte (Freudenthal et al.2000). En cambio, un protocolo de entrenamiento espaciado de 5 o 10 ensayos (**débil**) con un IEE de más de 27 segundos, no produce MLT, pero sí una MCT que dura al menos 4 horas y que ya no se evidencia a las 8 horas luego de la sesión de entrenamiento (Suarez 2004, Smal et al.2010, manuscrito enviado). Los diferentes tipos de protocolos de entrenamiento han sido útiles para realizar experimentos de intervención farmacológica con el objetivo de evaluar los efectos amnésicos (protocolo estándar y fuerte) y facilitadores (protocolo débil) de distintos agentes sobre la memoria.

II.1.3b Anatomía del sistema nervioso central de los decápodos

En artrópodos el sistema nervioso se clasifica tradicionalmente según su origen embriológico en: protocerebro, deutocerebro y tritocerebro (figura II.1.3). Estas estructuras embrionarias son las que originan el sistema nervioso del animal adulto (Nassel y Elofsson 1987). En los crustáceos decápodos el protocerebro se divide en protocerebro lateral y medial, el primero da lugar a parte del lóbulo óptico y el segundo a parte del ganglio supraesofágico; el deutocerebro y parte del tritocerebro dan origen al resto del ganglio supraesofágico; el ganglio torácico, en cambio, se origina totalmente a partir del tritocerebro (Harzsch et al.1999).

En un decápodo adulto encontramos, entonces, tres centros nerviosos principales: los lóbulos ópticos, el ganglio supraesofágico y el ganglio torácico.

Cada lóbulo óptico se encuentra conectado con el ganglio supraesofágico por el tracto protocerebral. Los lóbulos ópticos y el ganglio supraesofágico cumplen funciones fundamentalmente de percepción sensorial y cognitivas, mientras que el ganglio torácico cumple principalmente funciones vegetativas y motoras (Sandeman et al.1993).

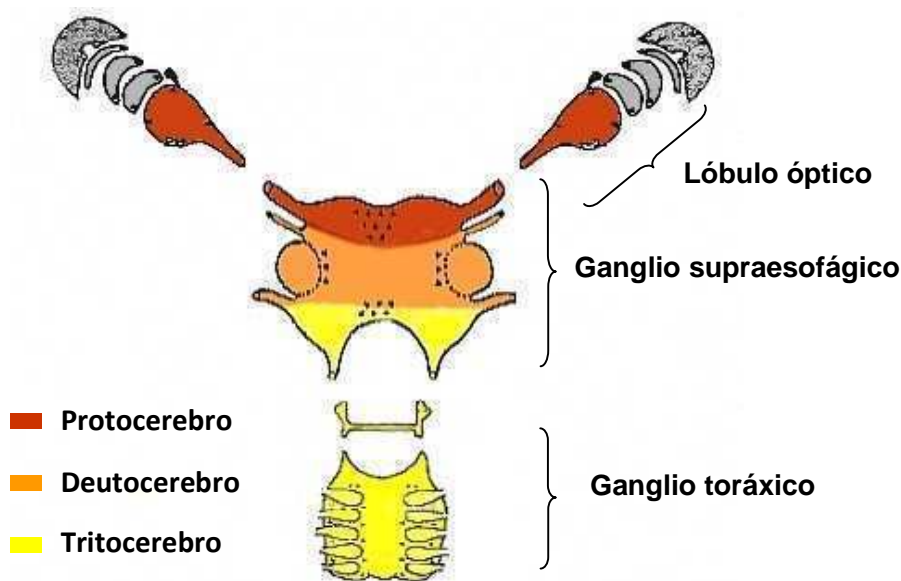


Figura II.1.3: Esquema del sistema nervioso de un decápodo adulto. Los tres centros nerviosos principales son el lóbulo óptico (estructura par), el ganglio supraesofágico y el ganglio torácico. El lóbulo óptico se ubica dentro del pedúnculo ocular y se conecta al ganglio supraesofágico por el tracto protocerebral. El ganglio supraesofágico se ubica en la región anterior ventral del cuerpo del animal (cefalotórax) y el ganglio torácico también en posición ventral pero más caudal que el supraesofágico. En este esquema se representa en colores el origen embrionario de los distintos centros nerviosos. Rojo: protocerebro; naranja: deutocerebro; amarillo: tritocerebro; gris: otro origen. (Gráfico extraído de la tesis de doctorado de Martín Berón de Astrada 2005)

Dado que, el ganglio supraesofágico constituiría el principal centro nervioso de procesamiento de información sensorial e integración de funciones cognitivas

(Sandeman 1982, Utting et al.2000), el análisis de los niveles de acetilación de histonas durante la formación de la memoria en el modelo de *Chasmagnathus* se realizó a partir de extracción de proteínas desde este ganglio.

II.1.4 Acetilación de histonas y la consolidación de la memoria

Como se introdujo en el capítulo I, durante la formación de la memoria de largo término las respuestas adaptativas de las neuronas que subyacen a ese comportamiento requieren de cambios en la expresión génica. Dado que los procesos epigenéticos están funcionalmente asociados a la regulación de la transcripción génica, hace no más de diez años comenzó a estudiarse el rol de estos mecanismos en la formación de la MLT.

La acetilasa de lisinas CBP (CREB binding protein) es una de las acetiltransferasas de lisinas (KATs) más estudiadas en los fenómenos de regulación local de la estructura de la cromatina, como parte de la activación génica dependiente del factor de transcripción CREB, durante la consolidación de la memoria en modelos de vertebrados (Alarcon et al.2004, Korzus 2004, Martin y Sun 2004, Oliveira et al.2007, Vecsey et al.2007). Algunos trabajos demuestran que la disrupción de la actividad de CBP y de otras KATs interfiere con la formación de la memoria (Alarcon et al.2004, Korzus 2004, Oliveira et al.2007, Maurice et al.2007). La participación de mecanismos epigenéticos tales como acetilación, fosforilación y metilación de histonas, ha sido descrita en procesos de plasticidad neuronal a largo término en invertebrados y consolidación de la memoria en vertebrados (Guan et al. 2002, Alarcon et al. 2004, Korzus et al. 2004, Levenson et al.2004, Wood et al. 2005, Wood et al. 2006). Por ejemplo, la acetilación de histona H3 en hipocampo ha sido asociada a la formación de la memoria de miedo condicionado en roedores (Levenson et al.2004, Bredy et al.2007, Lubin et al.2008). Algunos de estos estudios fueron realizados sobre promotores específicos, mostrando que estas modificaciones post traduccionales (MPTs) de histonas pueden regular la transcripción de genes asociados con plasticidad durante la consolidación, tales como factores de transcripción (por ejemplo, C/EBP β , del

inglés *CCAAT enhancer binding protein β*), receptores de neurotransmisores excitatorios y de neuromoduladores, proteínas del citoesqueleto, moléculas de adhesión celular y enzimas metabólicas (Levenson y Sweatt 2005, Wood et al. 2006a).

En la preparación de neuronas en cultivo de *Aplysia* (Guan et al. 2002) ha sido demostrada la existencia de una proteína inhibidora CREB2 que recluta la deacetilasa de lisinas 5 (KDAC5) al promotor del gen de C/EBP β , impidiendo la unión de la proteína activador CREB1 y su cofactor CBP e inhibiendo de esta manera la facilitación a largo término, un modelo de plasticidad sináptica sugerido como mecanismo celular de la MLT.

Por otro lado, se ha demostrado que la inhibición de la actividad de las KDACs facilita la memoria en modelos de roedores (Yeh et al. 2004, Levenson et al. 2004, Vecsey et al. 2007, Fischer et al. 2007), así como también revierte los déficits de memoria inducidos por manipulaciones genéticas en el gen de CBP (Alarcon et al. 2004, Korzus et al. 2004). Un trabajo muy reciente ha mostrado que la sobreexpresión en neuronas de la deacetilasa HDAC2 obstruye la plasticidad sináptica y la formación de la memoria (Guan et al. 2009).

Si bien existen estudios enfocados directamente en el rol de las acetilasas y desacetilasas en la consolidación de la memoria, se sabe poco acerca de las vías de señalización intracelular y activación de factores de transcripción que inducen o reprimen la actividad de estas proteínas durante la formación de la memoria. Las hipótesis sobre los pasos a través de los cuales la actividad neuronal y la transmisión sináptica indicarían al núcleo la regulación de la actividad de estas enzimas que remodelan la cromatina surgen de estudios recientes en preparaciones de neuronas en cultivo (Chawla 2003, Linseman 2003, Tsankova 2007) y un estudio realizado en un modelo de miedo condicionado al contexto en ratón (Chwang et al. 2006; 2007).

No obstante existe variada evidencia señalando que la acetilación de histonas es regulada durante la consolidación de la MLT y que esta regulación contribuye a la capacidad de formar memorias, no existen estudios que muestren la

cinética de estas modificaciones ni su temporalidad. Estos estudios darían indicios sobre el rol de estos fenómenos en la codificación o almacenamiento de la información durante la formación de la MLT.

Por otro lado, si bien la primera evidencia del rol de un mecanismo epigenético en procesos de plasticidad neuronal fue obtenida en un sistema de neuronas en cultivo del modelo de invertebrado *Aplysia* (Guan et al. 2002), hasta ahora no hay evidencia directa del rol de las modificaciones de la cromatina durante la formación de la memoria a largo término en invertebrados.

II.1.5 KDACs y fármacos inhibidores

Existen tres familias de proteínas deacetilasas de lisinas, en base a su homología con tres tipos distintos de enzimas KDACs encontradas en levaduras (Kurdistani y Grunstein 2003). Las KDACs pertenecientes a la clase III son enzimas cuya actividad depende de NAD, operando de manera diferente a los otros dos grupos, y cuyo rol en los procesos de formación de la memoria no ha sido indagado. En cambio, la mayoría de las KDACs pertenecientes a las familias I y II, cuya expresión ha sido observada en cerebro, constituyen targets de los fármacos utilizados en estos estudios. De los inhibidores de KDACs utilizados para manipular el epigenoma en muchos tipos celulares, tanto tricostatina A (TSA) como butirato de sodio (NaB) han resultado efectivos para facilitar la MLT en diferentes modelos animales (Yeh et al. 2004, Levenson et al. 2004, Vecsey et al. 2007, Fischer et al. 2007, Guan et al. 2009).

Tomando como modelo de proceso epigenético a la acetilación de histona H3, en la primera serie experimental de esta tesis se evaluó si tal mecanismo modificador de la cromatina está implicado en la formación de la memoria a largo término en un modelo de invertebrado, el cangrejo *Chasmagnathus*. Primeramente, se estudió la habilidad de drogas inhibidoras de KDACs para

facilitar la memoria, administradas durante la fase de consolidación en este paradigma de aprendizaje. Posteriormente, se investigó si la acetilación de la histona H3 era inducida en este paradigma, se definieron los parámetros de entrenamiento necesarios para promoverla y se describió el curso temporal de este proceso durante la consolidación de la memoria.

II.2 Materiales y métodos

II.2.1. Animales

Los animales utilizados fueron cangrejos macho adultos de la especie semi-terrestre *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda: Grapsidae. Dana 1851), con un ancho máximo de caparazón comprendido entre 2,7 y 3 cm, y un peso medio de $17 \pm 0,2$ g. Los cangrejos fueron recolectados en aguas salobres de menos de un metro de profundidad en las rías de San Clemente del Tuyú, Argentina; y transportados al laboratorio donde fueron alojados en cubas plásticas (35 x 45 x 20 cm) con una profundidad de agua marina de 2 cm a una densidad de 20 cangrejos por recipiente. El agua utilizada en las cubas y durante los experimentos fue preparada con sal marina Cristalsea Marinex (Winex-Germany) (salinidad 10-14 ‰, pH 7,4-7,6). Los animales fueron alimentados cada tres días con pellets para conejos (Nutrientes S.A., Argentina), mantenidos en un ciclo de 12 horas de luz – 12 horas de oscuridad (8:00hs – 20:00hs) a una temperatura ambiente comprendida entre los 22 y 24 °C.

Los experimentos fueron llevados a cabo durante los 10 días luego del arribo de los animales al laboratorio y cada animal se utilizó en un único experimento. Previo a incluir a cada animal en un dado grupo experimental se realizó una prueba de selección, en la cual se daba vuelta al animal apoyándolo por su región dorsal; si el animal tardaba más de 2 segundos en volver a su posición de apoyo ventral original (sobre sus patas) era descartado del experimento, dado que la lentitud en la restitución de su posición normal se correlaciona con un estado general de deterioro. En ningún caso fue necesario eliminar más del 5%.

II.2.2. Dispositivo de Entrenamiento y Evaluación. El actómetro

El dispositivo experimental utilizado fue el actómetro (Figura II.2.1) que consistió en un recipiente plástico cóncavo (C, el **contexto**), con paredes curvas y un piso circular plano, cubierto por 0,5 cm de agua marina. Los cangrejos eran alojados individualmente en estos recipientes, los cuales estaban suspendidos por 3 hilos de nylon fijados a un marco de madera, e iluminados por una lámpara (L) de 10 Watts ubicada a 30 cm por encima del animal. En el actómetro, los animales recibían por estímulo el movimiento horizontal, sobre cada uno de ellos, de una pantalla opaca rectangular (S, de 25 x 7,5 cm, la **señal**), movida por un motor (M). La trayectoria (Figura X) que recorría la pantalla iba desde 1 hasta 2 para regresar a 1. Cada uno de estos ciclos duraba aproximadamente 2,5 seg. El desplazamiento de la pantalla provocaba, en el cangrejo, una respuesta de escape que originaba oscilaciones en el recipiente C. Un micrófono (D) fijado solidario a la base del recipiente transmitía las oscilaciones a un transductor piezoeléctrico que convertía la velocidad de oscilación del receptáculo en señales eléctricas proporcionales. Éstas eran amplificadas, e integradas durante el tiempo de estimulación y traducidas a unidades numéricas en un rango que iba de 0 a 24000. Los valores que tomaba la variable experimental, respuesta de escape de un cangrejo eran, entonces, consecuencia de las oscilaciones registradas durante el tiempo de estimulación.

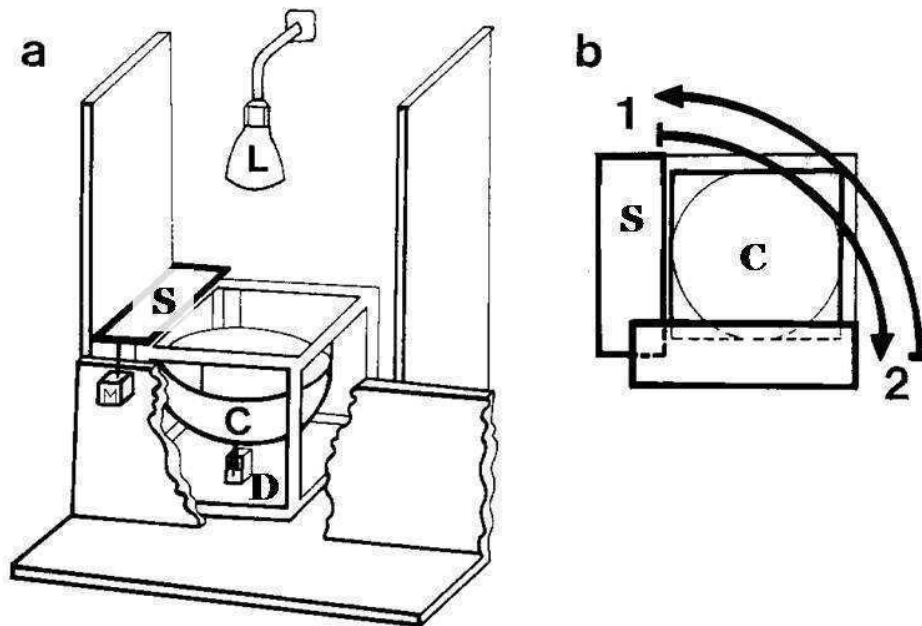


Figura II.2.1 El actómetro. a. El dispositivo de entrenamiento y registro de la respuesta de escape del cangrejo consiste en un recipiente plástico (C, contexto) donde se coloca al animal; una pantalla rectangular (S, señal); un motor (M) que mueve la pantalla; iluminación indirecta por una lámpara de 10 W (L), y un micrófono que capta las vibraciones del recipiente provocadas por el movimiento del animal y las traduce a señales eléctricas proporcionales enviadas a una computadora. b. Movimiento de la pantalla rectangular (S) sobre el cangrejo (colocado en C), en un ciclo del ensayo. **1»2»1**: Desplazamiento de la figura en cada ciclo de estimulación. Un ciclo de estimulación dura aproximadamente 2,5 segundos; un **ensayo** (Dos ciclos de estimulación más el intervalo inter-ciclos de 2 segundos) dura aproximadamente 9 segundos.

El recinto de experimentación contó con 40 actómetros, aislados unos de otros por paneles. Una computadora fue utilizada para programar las secuencias de ensayos, la duración de los intervalos entre éstos y tomar registro de los eventos experimentales medidos.

II.2.3 Procedimiento experimental

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron distintos tipos de enfoques metodológicos. Por un lado, se llevaron a cabo experimentos de correlación entre un

evento molecular epigenético, la acetilación de histona H3, y procesos mnésicos. Por otro lado, se utilizaron experimentos de intervención farmacológica en combinación con dos tipos de análisis: análisis comportamental, en los cuales se estudió el efecto de la administración de drogas inhibitoras de KDACs durante la consolidación de la memoria de largo término; análisis mecanístico-molecular, en los cuales se investigó el efecto de la administración de una droga inhibidor de KDACs sobre los niveles de acetilación de histona H3, durante la consolidación de la memoria de largo término.

II.2.3.1 Experimentos de intervención farmacológica y análisis comportamental

Efecto de la administración de drogas inhibitoras de KDACs sobre la consolidación de la memoria de largo término

Diseño experimental

Cada cangrejo era llevado directamente desde el cuarto de alojamiento a un actómetro en el recinto de experimentación. Para el análisis de la fase de consolidación de la MCS los experimentos incluyeron una sesión de entrenamiento y una sesión de evaluación, separadas por un intervalo de 72 horas. Una vez concluida la sesión de entrenamiento, los animales eran alojados en recipientes plásticos individuales con 0,5 cm. de agua marina, y permanecían allí hasta el momento de la sesión de evaluación.

Cada **ensayo**, tanto en las sesiones de entrenamiento como de evaluación, consistía en dos ciclos sucesivos de pasaje de la pantalla opaca, con una duración total de 9 segundos. Los ensayos fueron diseñados de esta manera para obtener una respuesta mayor por ensayo y para asegurar que la pantalla en movimiento entrase en el campo visual de los individuos por direcciones opuestas, de manera que los mismos fuesen estimulados en forma similar independientemente de su posición en el receptáculo.

La **respuesta de escape** (Maldonado et al.1997) consiste en la corrida del cangrejo tratando de dejar atrás la sombra pasante. Se inicia inmediatamente después de la entrada del estímulo en el campo visual, precedida por un pequeño salto.

Cada grupo estaba formado por 40 animales, por lo que cada experimento requirió más de una corrida experimental, debido al número de actómetros disponibles (40). A su

vez, cada corrida experimental incluía a todos los grupos, representados por igual número de animales.

Como los animales provenientes de distintos esfuerzos de captura podrían mostrar diferencias en sus niveles de respuesta, sólo animales procedentes de una misma captura eran utilizados para un mismo experimento.

Para cada experimento, las sesiones de entrenamiento y evaluación se realizan en la misma franja horaria.

Sesión de entrenamiento débil: consistía de 5 ensayos separados por un intervalo entre ensayos (IEE) de 171 seg. Cada experimento incluía dos grupos control pasivo (CT) no entrenados, que permanecía en los actómetros sin recibir estimulación durante el tiempo que duraba la sesión, los cuales eran inyectados con el vehículo (**CT-VEH**) o con droga (**CT-X**), y dos grupos entrenados (EN), uno de los cuales era inyectado con el vehículo (**EN-VEH**), mientras que el otro era inyectado con la droga (**EN-X**). Los animales fueron inyectados a diferentes puntos de tiempo antes (pre-) y luego (post-) entrenamiento débil. Cada experimento incluía dos grupos controles pasivos (CT), Cada grupo estaba formado por 40 animales.

Sesión de evaluación: consistía en un ensayo de 9 segundos. Se llevaba a cabo a distintos tiempos luego de haber finalizado la sesión de entrenamiento. En esta sesión se evidenciaba la retención de la MCS.

Tanto la sesión de entrenamiento como la de evaluación eran precedidas por un período de adaptación sin estimulación de 10 min. El intervalo entre sesiones de entrenamiento y evaluación fue de 72 horas.

Método de inyección y drogas utilizadas

Todas las inyecciones se daban a través del lado derecho de la membrana cefalotorácica-abdominal, con una penetración de la aguja de 4 mm controlada por un tope. Se aseguraba así la liberación de su contenido dentro del centro del saco pericárdico. El volumen total de hemolinfa se estimó en 5 ml (30% del peso corporal) (Gleeson y Zubkoff 1977) resultando en aproximadamente una dilución de 100 veces de la droga en la hemolinfa.

Butirato de sodio. Cincuenta μl de vehículo o de la solución del inhibidor de KDAC, butirato de sodio (**NaB**) (Sigma Aldrich, EE.UU), se administraban a cada animal en forma sistémica. Se utilizó una dosis de NaB de concentración 15 mM (83 microgramos por cangrejo, 4,8 $\mu\text{g/g}$), disuelta en solución salina de cangrejo (Hoeger y Florey 1989). La solución inyectada como vehículo fue solución salina de cangrejo.

Tricostatina A. Diez μl de vehículo o de una solución del inhibidor de KDACs, Tricostatina A (**TSA**) (Sigma Aldrich, EE.UU), fueron administrados en forma sistémica. Se utilizó una dosis de TSA, de concentración 6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (60 μg por cangrejo, 3.5 $\mu\text{g/g}$), disuelta en DMSO. La solución inyectada como vehículo fue DMSO.

Análisis de datos

La retención de la memoria de largo término se define operacionalmente como la diferencia significativa entre los grupos CT y EN, en su nivel de respuesta media durante la sesión de evaluación. Es decir, se centra el análisis de los datos en los niveles de respuesta durante la sesión de evaluación. Rescorla (1988) argumentó en favor de este tipo de análisis en lugar de la comparación entrenamiento-evaluación, puntualizando la necesidad de distinguir entre el momento de la adquisición de la información (sesión de entrenamiento) y el momento de la evaluación (sesión de evaluación). Un hecho que justifica este tipo de comparación es que el comportamiento del animal puede diferir entre las dos sesiones por razones no relacionadas con el aprendizaje, y de esta forma acentuar o mitigar diferencias propias del fenómeno mnésico. Esta visión está especialmente justificada para el modelo bajo estudio, considerando resultados previos demostrando que la MCS puede formarse independientemente del nivel de la respuesta de escape durante el entrenamiento (Tomsic et al.1991).

Normalmente, en el caso de un entrenamiento espaciado de 15 ó más ensayos, y no en el caso de un entrenamiento de 10 ó menos ensayos, se observan diferencias significativas (t-test $\alpha=0,05$) entre CT y EN al comparar el nivel de respuesta media al estímulo de peligro. Es decir, una predicción básica en todos los experimentos es que habrá una diferencia significativa entre CT y EN. Por ello, se ha recurrido a la estadística de comparaciones planeadas *a priori*, ANOVA de coeficientes pesados con $\alpha=0,05$ (Howell 1987, Rosenthal y Rosnow 1985). Entonces, para los experimentos del efecto facilitador de

los inhibidores de KDACs sobre la consolidación de la MCS el análisis de los datos incluyó cuatro tipos de contrastes: 1) un contraste entre los grupos no entrenados (CTs), cuyas respuestas se esperaba que fuesen similares, demostrando que la droga no tuviese efectos secundarios sobre el nivel de respuesta en la sesión de evaluación, en una manera no relacionada con el fenómeno mnésico; 2) un contraste por cada grupo no entrenado (CT) y su respectivo grupo entrenado (EN). En la comparación CT-VEH vs. EN-VEH, se esperaba la ausencia de diferencias significativas, dado que se ha utilizado un protocolo de entrenamiento débil sobre el grupo EN. Por el contrario, si el tratamiento con la droga mejora o facilita la MCS, se esperaba encontrar diferencias significativas en la comparación CT-X vs EN-X. 3) un contraste entre los grupos entrenados (EN). Si el tratamiento con la droga mejora o facilita la MCS, se esperaba encontrar diferencias significativas en la comparación EN-VEH vs EN-X.

II.2.3.2 Experimentos de correlación

Curso temporal de la acetilación de histona H3 durante la consolidación de la memoria.

Diseño experimental

Para el análisis del curso temporal de la acetilación de histona H3 durante la fase de consolidación de la MCS, se realizaron dos series de experimentos:

1) consolidación de la MCS inducida por *protocolo de entrenamiento estándar*. Cada experimento consistió de un grupo entrenado (EN) bajo un *protocolo de entrenamiento estándar*, el cual recibió 15 ensayos separados por un intervalo entre ensayos (IEE) de 171 segundos (45 minutos de duración total); un grupo control **pasivo** (CT) no entrenado, que permaneció en los actómetros sin recibir estimulación, igual cantidad de tiempo que el grupo EN, y un grupo de animales naive (NV) no tratado. Cada grupo contenía 20 animales.

2) consolidación de la MCS inducida por un *protocolo de entrenamiento fuerte*. Cada experimento consistió de grupos similares a la serie de experimentos 1), pero en este caso el grupo EN fue entrenado bajo un *protocolo de entrenamiento fuerte*, que consistía de 30 ensayos separados por un intervalo entre ensayos (IEE) de 171 segundos (90 minutos de duración total).

Los cerebros fueron disecados a distintos tiempos de finalizada la sesión de entrenamiento: 0, 1, 6 y 24 horas post-entrenamiento. Para los experimentos de 1, 6, 24 horas, luego del entrenamiento los animales de los grupos EN y CT eran alojados en recipientes individuales, con agua marina, luminosidad constante y temperatura controlada hasta el momento de disección. Los grupos EN y CT correspondientes a un mismo experimento fueron entrenados en simultáneo. Al finalizar el periodo de tiempo estipulado, los animales fueron anestesiados por inmersión en agua salobre enfriada en hielo por dos minutos, y se procedió a la disección del cerebro central (ganglio supraesofágico). Los cerebros de los animales NV eran disecados en simultáneo con los otros grupos.

En las dos series de experimentos, durante ambos protocolos de entrenamiento se evidenció un decremento de la respuesta de escape en los animales entrenados, conforme se sucedían las presentaciones de los estímulos.

Medición de los niveles de histona H3 acetilada en cerebro mediante ensayos de Western Blot.

Obtención de extractos enriquecido en histonas : Los animales fueron anestesiados por inmersión en agua helada durante dos minutos. El cerebro fue disecado. Cada grupo consistió en veinte ganglios supraesofágicos, los cuales se colocaron inmediatamente en buffer (solución salina de cangrejo – HEPES 10mM, pH 7,6). Se obtuvieron extractos nucleares enriquecidos en proteínas histonas de la siguiente manera: todos los procedimientos se realizaron a 4 ° C; los veinte ganglios fueron homogeneizados en un buffer A (HEPES 10mM, pH 7,8 - Cl₂Mg 1,5 mM - KCl 10mM - DDT 1mM - 5mM de butirato de sodio) con un homogeneizador teflón-vidrio que rotaba mediante un motor tipo taladro, realizando 12 bajadas del émbolo. El homogenato de tejido se centrifugó a 1000g durante 15 minutos. El precipitado fue resuspendido en buffer A hasta su máxima disolución, luego se añadió H₂SO₄ de manera tal de llegar a una concentración 0.4N y la solución permaneció 30 minutos a 4 ° C para extraer las histonas desde la fracción nuclear. La solución se centrifugó 5 minutos a 15000 rpm, el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y las proteínas se precipitaron en 10 volúmenes de acetona a -20 ° C, durante toda la noche. El precipitado de proteínas básicas nucleares fue recogido por centrifugación a 15.000 rpm por 15 min. El pellet fue resuspendido en agua destilada. Para el ensayo de Western blot, se añadió buffer de siembra y las muestras fueron incubadas a 100 °C durante 5 minutos, e inmediatamente luego colocadas en hielo. Diez microgramos

de proteína de cada muestra se corrieron un gel de poliacrilamida, cuya solución del gel contenía 15% de acrilamida. Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF para la detección de proteínas por unión a anticuerpo específico. El ensayo de western blot se realizó con anticuerpos específicos anti histona H3 acetilada (reconoce las lisinas K9 y K14 acetiladas) y anti histona H3 total (CT, pan) (Upstate), siguiendo el protocolo del fabricante. Los anticuerpos fueron generados usando un péptido correspondiente a los aminoácidos 1-20 de la histona H3 del protozoo *Tetrahymena* como inmunógeno, ambos anticuerpos de conocida reactividad cruzada con humanos, ratón, rata, pollo y levadura. Una amplia reactividad cruzada de estos anticuerpos es esperada debido a la alta homología de secuencia de las histonas entre distintas especies. La detección fue realizada utilizando un kit de quimioluminiscencia Luminol (SCB) siguiendo el protocolo del fabricante y las señales fueron digitalizadas por el dispositivo lector de imágenes marca Fuji Film, modelo Intelligent Oscuro Recuadro II, utilizando el software LAS-1000.

Mediciones densitométricas: La densidad óptica relativa (DOR) se estima a través del software ImageJ 1.29x., NIH Image. La intensidad de las bandas se comparó usando el valor de la densidad integrada, el cual representa la sumatoria de los valores de grises del área seleccionada menos el fondo. Entonces, para analizar las bandas de las tinciones de membranas, se realizó un perfil con los valores de intensidad de los grises y se midió el área del histograma así generado para cada banda. Ese es el valor de densidad óptica (DO). En todos los experimentos, y para cada grupo, se cuantificó el valor DOR de la siguiente manera: cada membrana se realizó por duplicado y una membrana fue revelada con anticuerpo anti histona H3 acetilada y la otra con anticuerpo anti histona H3 total. Se cuantificó las señales de ambos anticuerpos tomando la DO de cada banda. Se relativizó en cada caso el valor DO proveniente del revelado con anticuerpo anti histona H3 acetilada a su correspondiente banda revelada en la otra membrana con anticuerpo anti histona H3 total. El valor de esta relación H3 acetilada/H3 total, DOR, de cada grupo fue normalizado al valor promedio del grupo NV.

Análisis de datos: Para cada experimento, se llevaron a cabo 4 repeticiones independientes. Para las comparaciones entre dos grupos se utilizó el test de *t*, y en el caso de comparaciones múltiples se realizó un ANOVA general y se aplicó el test *post hoc* de Duncan. En todos los casos se usó un $\alpha=0.05$ como criterio de significancia. Las mediciones de todos los grupos eran normalizadas al grupo NV.

II.2.3.3 Experimentos de intervención farmacológica y análisis mecanístico

Evaluación del efecto inhibitor de desacetilasas NaB en el cerebro de *Chasmagnathus*.

Procedimiento experimental

Para la evaluación molecular del efecto inhibitor de la desacetilación de histonas de la droga NaB, se realizaron los siguientes grupos de animales: un grupo control inyectado con VEH y sacrificado a los 15 minutos luego de la inyección (VEH-15 min), y los grupos experimentales inyectados con 15 mM de NaB y sacrificados a 15 minutos (NaB-15 min), 30 minutos (NaB-30 min) y 1 hora (NaB-1 h) luego de la inyección. Un grupo denominado naive (NV) no tratado fue agregado en cada repetición. Luego, se procedió con la disección, extracción ácida de proteínas histonas, ensayos de western blot con anticuerpo anti histona H3 acetilada, medición densitométricas y análisis de los datos de manera similar a los experimentos de correlación.

Análisis de la acetilación de histonas durante la facilitación de la MCS mediada por la inyección del inhibidor de KDACs.

Procedimiento experimental

Se realizó el mismo protocolo de entrenamiento débil utilizado anteriormente en los experimentos farmacológicos combinados con análisis comportamental. Luego de la sesión de entrenamiento, los animales fueron divididos en dos grupos: el grupo ENdébil-NaB, los cuales fueron inyectados inmediatamente post-entrenamiento débil con 15mM de NaB, y el grupo ENdébil-VEH los cuales fueron inyectados también inmediatamente post-entrenamiento pero con solución salina. Los cerebros fueron sacrificados 1 hora después de la inyección. Cada repetición incluyó un grupo naive (NV), no tratado. Luego, se procedió con la disección, siguiendo con la extracción ácida de proteínas histonas, luego el ensayo de western blot con anticuerpo anti histona H3 acetilada, la medición densitométrica y el análisis de los datos, de manera similar a los experimentos de correlación.

II.3 Resultados

II.3.1 La administración de butirato de sodio durante la consolidación facilita la MCS

Estudios previos en modelos de mamíferos indican que la inhibición de las proteínas desacetilasas induce un mejoramiento de la memoria (Yeh et al.2004, Levenson et al.2004, Vecsey et al.2007, Fischer et al.2007). Con el fin de evaluar si la inhibición de estas enzimas induce la facilitación de la memoria en el invertebrado *Chasmagnathus*, se administró butirato de sodio (NaB), un inhibidor de KDACs ampliamente utilizado, a diferentes tiempos pre- y post-sesión de entrenamiento débil. Se ha demostrado en este modelo que una sesión de entrenamiento débil induce la formación de una MCT que se evidencia a 4 horas post entrenamiento, pero que ya no es observada a las 8 horas (Suarez 2004). En el primer experimento, a un grupo de cangrejos se le administró NaB, mientras que otro grupo fue inyectado con vehículo (solución salina). Inmediatamente después de la inyección, todos ellos fueron colocados en los actómetros. Diez minutos más tarde, la mitad de los animales de cada grupo se sometió a un entrenamiento débil de cinco presentaciones del estímulo visual de peligro (grupo EN) mientras que la otra mitad se mantuvo en el contexto sin ser entrenado (grupo CT). Por lo tanto, se determinaron 4 grupos: CT-Veh, EN-Veh, CT-NaB, EN-NaB; de 40 cangrejos cada uno. La figura II.3.1a muestra el nivel de respuesta medio de los 4 grupos durante los cinco ensayos de la sesión de entrenamiento. Como se observa en la figura, la inyección de la droga antes del entrenamiento no tuvo efectos sobre la fase de adquisición de la memoria (ANOVA de medidas repetidas, no significativa). Veinticuatro horas más tarde se puso a prueba la retención de la MCS. Como se muestra en la Figura II.3.1b, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos CT-Veh y EN-Veh, demostrando que no hay retención de la MLT luego de un entrenamiento débil. Por el contrario, la comparación de los grupos CT-NaB y EN-NaB muestra diferencias significativas ($F_{1,140} = 4,2, p < 0,05$). Esta última

comparación sugiere que el inhibidor de KDACs facilita la memoria, al permitir que un entrenamiento débil forme una memoria que se observa a largo término.

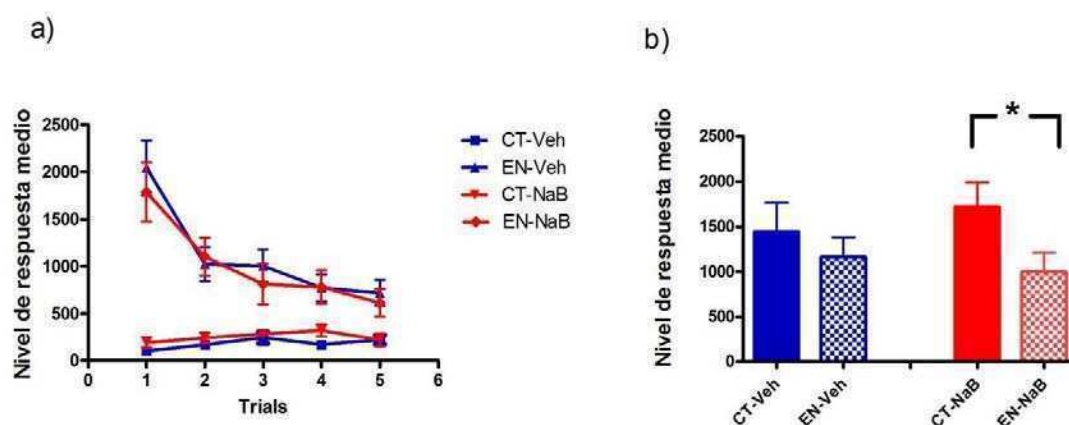


Figura II.3.1: Efecto de inyección del inhibidor KDACs butirato de sodio, 10 minutos pre-entrenamiento, durante la consolidación de la memoria. a) Nivel de respuesta medio ante las presentaciones iterativas del EVP durante la sesión de entrenamiento, 10 minutos después de la inyección de la droga. b) Nivel de respuesta medio en la sesión de evaluación ante la presentación del EVP. Media + / -error estandar. ANOVA *: $P < 0,05$.

En el siguiente experimento, con el mismo diseño de grupos, los cangrejos fueron inyectados con NaB o Veh inmediatamente después del entrenamiento débil. Como se muestra en la Figura II.3.2a, nuevamente no hay diferencias en la comparación CT-Veh *versus* EN-Veh. En cambio, sí se encontraron diferencias significativas en la comparación CT-NaB *versus* EN-NaB ($F_{1, 108} = 4,0$; $p < 0,05$), indicando una facilitación de la memoria como efecto de la droga. A diferencia del experimento anterior, también hubo diferencias significativas entre los grupos EN-Veh y EN-NaB ($F_{1, 108} = 3,8$, $p < 0,05$), lo cual indica el fuerte efecto facilitador sobre la MCS del inhibidor de KDACs inyectado inmediatamente post entrenamiento.

En el tercer experimento, los animales fueron inyectados 3 horas después del entrenamiento débil y, en este caso, no se encontraron diferencias significativas

en las distintas comparaciones para cada par de grupos CT y EN (Figura II.3.2b). El resultado de este experimento sugiere que la ventana de tiempo del efecto facilitador del NaB sobre la MCS es más corto que 3 horas. Sin embargo, estudios anteriores realizados sobre la consolidación de la MCS del cangrejo *Chasmagnathus* demuestran la presencia de una segunda fase de activación de PKA y de NF- κ B durante el proceso de consolidación (Freudenthal y Romano 2000, Locatelli y Romano 2005). Más aún, experimentos con inhibidores de la actividad de PKA o de NF- κ B mostraron una segunda fase de acción de estas drogas durante la consolidación, en ambos casos, alrededor de las 6 horas post entrenamiento. Entonces, decidimos evaluar una posible segunda fase de facilitación de la memoria mediante administración de NaB, en un cuarto experimento. Los animales fueron inyectados 6 horas después del entrenamiento débil. Se encontró una nueva ventana de facilitación a las 6 horas post entrenamiento débil, en acuerdo con las conclusiones anteriores de los estudios en PKA y NF- κ B. Los resultados muestran que no hay diferencias entre los grupos CT-Veh y EN-Veh con respecto a la retención de la MCS, pero sí en las comparaciones entre CT-NaB y EN-NaB ($F_{1, 106} = 9,3$, $p < 0,01$) y entre las EN-Veh y EN-NaB ($F_{1, 106} = 4,8$, $p < 0,05$) (Figura II.3.2c). Por consiguiente, los resultados de este experimento apoyan la idea de un fuerte efecto de mejoramiento de la memoria por inyección de inhibidores de KDACs, en una segunda fase de sensibilidad a la droga.

Por último, se llevó a cabo un experimento con el mismo diseño pero esta vez la inyección de los animales con NaB se realizó a las 12 horas después de la sesión de entrenamiento. En este experimento no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones (Figura II.3.2d), sugiriendo un cierre de la segunda ventana de tiempo del efecto facilitador del inhibidor KDACs, entre las 6 y las 12 horas.

En todos los experimentos presentados en esta sección, no se encontraron diferencias entre los grupos CT-Veh y CT-NaB, señalando que la droga no altera los niveles normales de respuesta de los animales no entrenados y demostrando entonces que la droga no tiene efectos inespecíficos al efecto mnésico, sobre la respuesta a la estimulación del EVP.

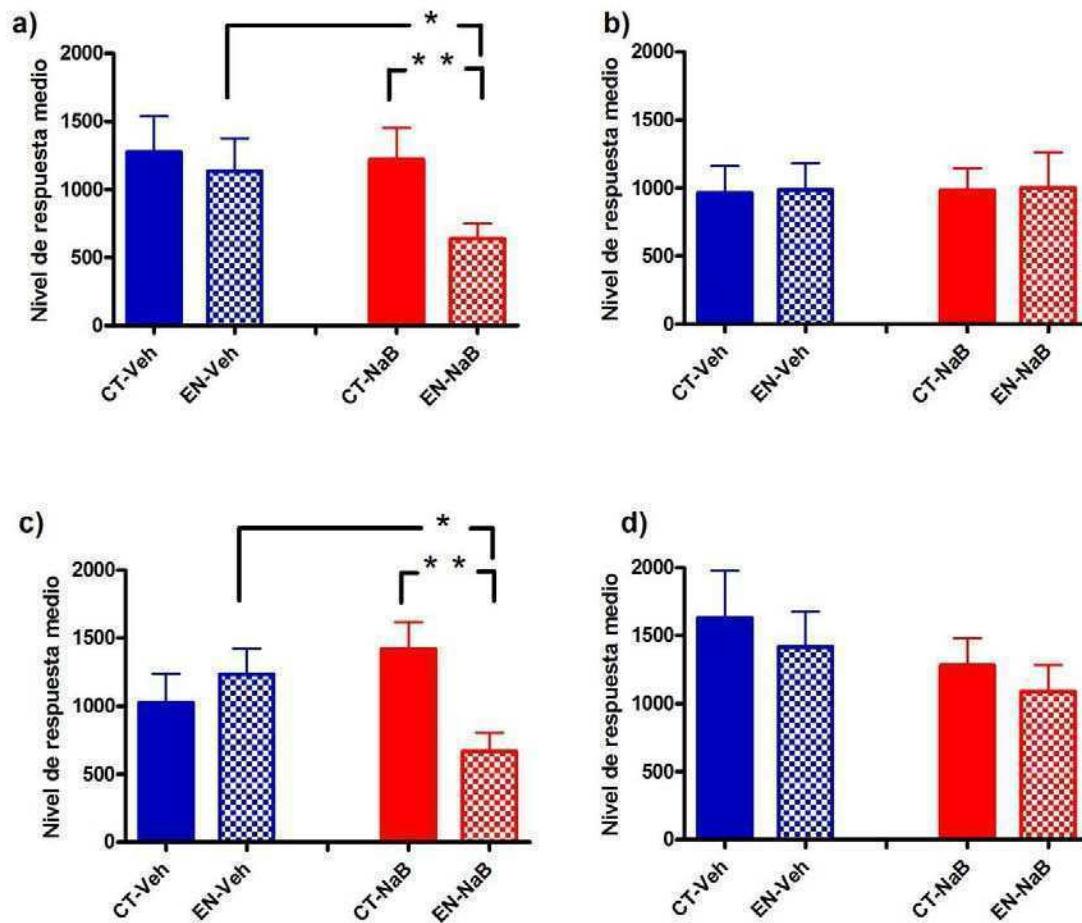


Figura II.3. 2: Efecto de la inyección de butirato de sodio inmediatamente post- a 3, 6 y 12 hs posteriores al entrenamiento, en la consolidación de la memoria. Los gráficos muestran el nivel de respuesta medio en la sesión de evaluación. a) Los animales fueron inyectados inmediatamente post- entrenamiento. b) Los animales fueron inyectados a las 3 h posteriores al entrenamiento. c) Los animales fueron inyectados a las 6 h posteriores al entrenamiento. d) Los animales fueron inyectados a las 12 h posteriores al entrenamiento. Nivel de respuesta + / - error estándar. ANOVA *: $P < 0,05$; **: $p < 0,01$.

II.3.2 La administración de tricostatina A durante la consolidación facilita la MCS

Aunque el butirato de sodio ha sido utilizado como inhibidor de KDACs, también se han observado posibles efectos de esta droga como inhibidor de los canales de cloruro y de proteínas fosfodiesterasas (Resta-Lenert et al. 2001). Por lo tanto, se evaluó el efecto de otro inhibidor de KDACs no vinculado estructuralmente con NaB, tricostatina A (TSA). El diseño de este experimento fue similar a aquellos de la sección anterior, pero en este caso los animales fueron inyectados con TSA o DMSO (vehículo) y la administración de las drogas se realizó inmediatamente después del entrenamiento débil. De acuerdo con los resultados observados en los experimentos con inyecciones de NaB inmediatamente después del entrenamiento (Figura II.3.2a), no se encontraron diferencias entre los grupos CT-Veh y EN-Veh. En cambio sí se observaron importantes diferencias entre los grupos CT-TSA y EN-TSA ($F_{1, 122} = 7,12$ $p < 0,01$) (Figura II.3.3). Este resultado apoya los resultados anteriores sobre el efecto facilitador de NaB sobre la MCS, indicando que se debe a un efecto específico de la inhibición del proceso de desacetilación llevado a cabo por KDACs.

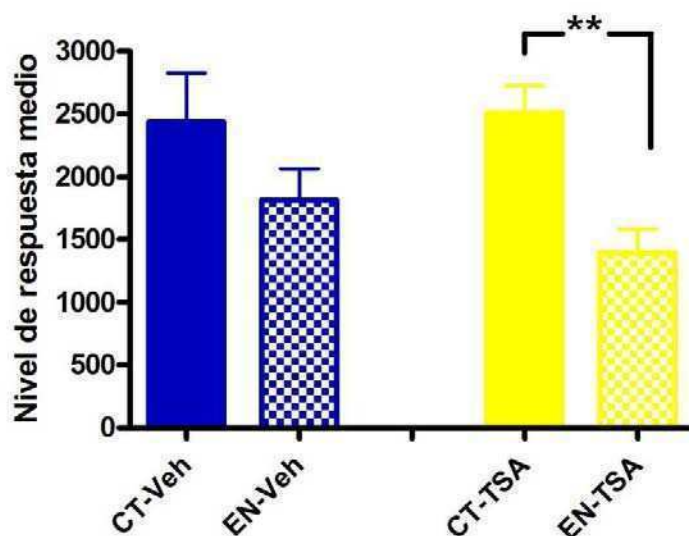


Figura II.3.3: Efecto de la inyección de Tricostatina A, administrada inmediatamente post entrenamiento, en la consolidación de la memoria. Nivel de respuesta medio + / - error estándar ANOVA **: $p < 0,01$.

II.3.3 La inyección de NaB aumenta los niveles de acetilación de la histona H3 en cerebro de *Chasmagnathus*

Experimentos anteriores en otros modelos sugieren que la inhibición de KDACs, por medio de la administración de NaB induciría la activación de la expresión génica mediante un incremento en la acetilación de histonas y, en consecuencia, mejoraría la memoria a largo plazo. Con el fin de obtener pruebas de que la acetilación de histonas es incrementada en el cerebro del cangrejo *Chasmagnathus* después de la inyección de NaB, se realizó el siguiente experimento. Se inyectó con NaB tres grupos de 20 animales cada uno, utilizando

la misma dosis de la droga descrita para los experimentos de facilitación de la memoria. A los 15, 30 o 60 minutos luego de la inyección se anestesió a los animales y se procedió a la disección del cerebro central de los mismos. Dos grupos de animales fueron incluidos como controles: 1) animales no inyectados (NV) y 2) animales inyectados con solución salina y sacrificado a los 15 minutos post inyección (15min post Veh). Se recolectaron 20 cerebros de cada grupo y desde allí se realizó una extracción ácida obteniendo extractos enriquecidos en histonas. Para la detección de los niveles de acetilación de histonas mediante la técnica de Western Blot se empleó un anticuerpo específico que reconoce la histona H3 acetilada. La intensidad de las bandas obtenidas con este anticuerpo fue calculado por densitometría, y se la relativizó a los valores densitométricos obtenidos con un anticuerpo que reconoce la histona H3 total. La figura II.3.4 muestra los valores de la media +/- el error estándar de la densidad óptica relativa (DOR) encontrada en cada grupo con respecto al grupo NV, a partir de cinco experimentos independientes. Se observó un aumento importante de la acetilación de la histona H3 a los 15 minutos (ANOVA General $F_{3,14} = 4,9$, $p < 0,01$; prueba de Duncan, $p < 0,01$) y a los 30 minutos después de la inyección NaB (Prueba de Duncan, $p < 0,05$) en comparación con la inyección de solución salina (15min post Veh). A los 60 minutos luego de la inyección de NaB no se encontraron diferencias significativas (Prueba de Duncan, NS).

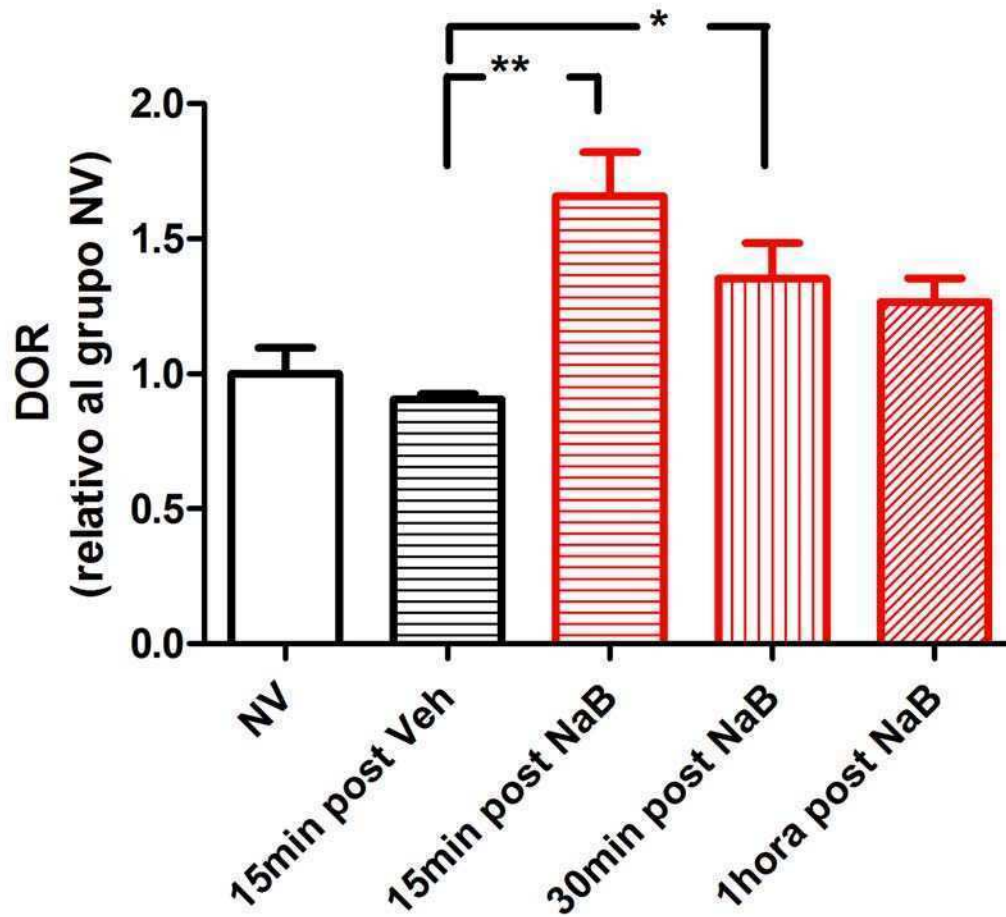


Figura II.3.4: Efecto de la inyección de butirato de sodio sobre el nivel de acetilación de histona H3. El valor mostrado para cada grupo es la media \pm error estándar de los valores específicos de la histonas H3 acetilada, normalizado al valor medio del grupo NV. Los resultados obtenidos provienen de cinco experimentos independientes. Prueba de Duncan, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

II.3.4 Curso temporal de la acetilación de histonas H3 durante la consolidación de la memoria

Los siguientes experimentos fueron realizados para evaluar si existen cambios en los niveles de acetilación de la histona H3 durante la consolidación de la memoria, estudio que no fue realizado previamente en ningún modelo de memoria. En la primera serie de experimentos, un grupo de cangrejos fue entrenado con el protocolo estándar de 15 ensayos (grupo EN) que induce la MLT (Pedreira et al.1998), y otro grupo permaneció en los actómetros sin estimulación (grupo CT). También fue añadido un grupo naïve (NV), como se describe en materiales y métodos. Este diseño de tres grupos se repitió para cada punto de tiempo luego del entrenamiento: 0 (inmediatamente), 1 hora, 6 horas y 24 horas. Se llevó a cabo 4 repeticiones independientes para cada tiempo, utilizando 20 animales por grupo, que fueron anestesiados y sacrificados para la disección en los puntos de tiempo descriptos. Como se muestra en la Figura II.3.5, no se encontraron cambios en el nivel de acetilación de la histona H3, con respecto al nivel de acetilación observado en el grupo NV, en cualquier punto de tiempo después del entrenamiento estándar.

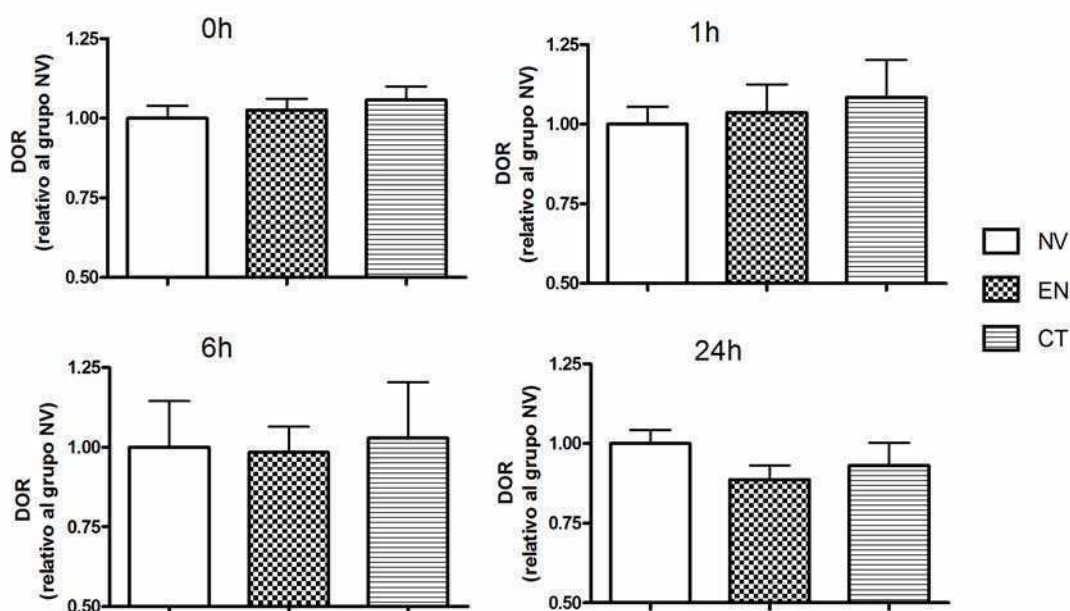


Figura II.3.5: Niveles de acetilación de la histona H3 en el cerebro de cangrejo

durante la consolidación. Curso de la acetilación de histona H3 durante la consolidación de la memoria después de un entrenamiento estándar. El valor mostrado para cada grupo es la media \pm error estándar de los valores específicos de la histonas H3 acetilada, normalizado al valor de la media del grupo NV. Los resultados obtenidos provienen de cuatro experimentos independientes. Prueba de Duncan NS. $p > 0.05$.

En la segunda serie de experimentos se repitió la curva temporal, pero esta vez utilizando un protocolo de entrenamiento fuerte de 30 ensayos. En estos experimentos el procedimiento empleado fue el mismo que en la primera serie. La figura II.3.6 muestra un aumento significativo del nivel de histona H3 acetilada en el grupo EN con respecto a los grupos NV y CT (ANOVA General $F_{2,6} = 7,7$, $p < 0,05$; prueba de Duncan, $p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente). Estas comparaciones muestran diferencias significativas sólo en las extracciones realizadas a 1 h luego del entrenamiento fuerte, no así en ninguno de los otros puntos de tiempo analizados. Las comparaciones entre el grupo NV y el grupo CT no mostraron diferencias en ninguno de los casos. Por lo tanto, el entrenamiento fuerte induce un aumento en los niveles de acetilación de histona H3 en el cerebro central de cangrejo. Dicho aumento se observó a 1 hora luego de la sesión de entrenamiento fuerte y resultó ser transitorio, ya que se observaron niveles basales a las 6 y 24 horas post entrenamiento. Este incremento no se encontró en los tiempos analizados luego del entrenamiento estándar.

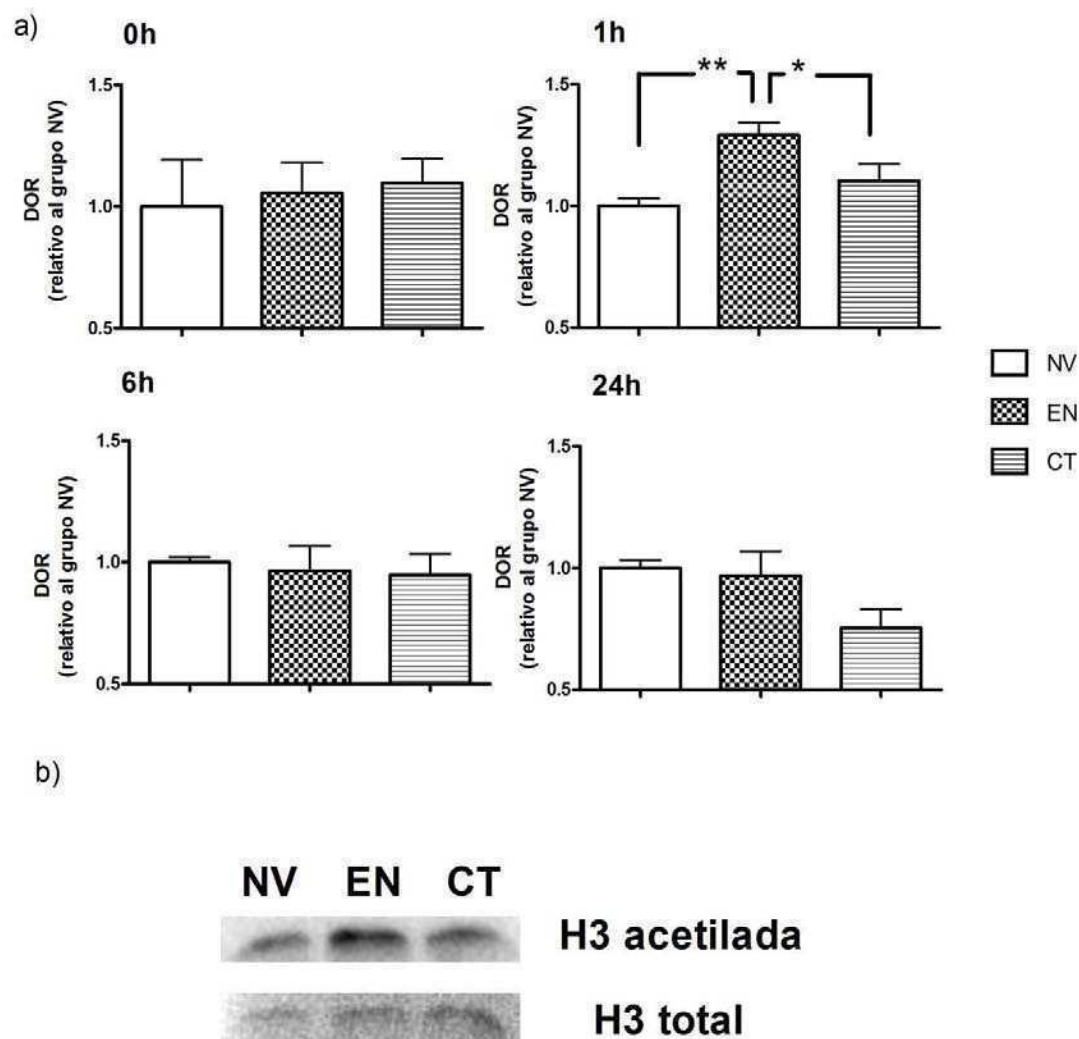


Figura II.3.6: Curso temporal de la acetilación de histona H3 durante la consolidación de la memoria después de un entrenamiento fuerte. a) El valor mostrado para cada grupo es la media \pm error estándar de los valores específicos de la histonas H3 acetilada, normalizado al valor medio del grupo NV. Los resultados obtenidos provienen de cinco experimentos independientes. Prueba de Duncan, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$. b) Western blot representativo de los extractos proteicos de animales luego de 1h post entrenamiento fuerte, realizados con anticuerpos acetil-H3 específicos (arriba) y anti-H3 total (abajo).

II.3.5 El entrenamiento débil concomitante con la administración de NaB induce un aumento de la acetilación de histonas H3

Con el fin de conocer mejor la modulación de la consolidación de la memoria por medio de la inhibición de KDACs, se estudió si el protocolo de entrenamiento débil, utilizado en los experimentos de facilitación, más la inyección de NaB modifican los niveles de la histona H3 acetilada. Se evaluó si estos cambios en la acetilación de H3 coinciden temporalmente con los cambios inducidos por el entrenamiento fuerte de 30 ensayos, determinados en los experimentos de la sección anterior. El experimento contó con un grupo de animales no inyectados (NV) como control, al que fueron relativizadas las mediciones obtenidas de los otros dos grupos. Ya que se observó un aumento en los niveles de H3 acetilada a 1 hora luego del entrenamiento fuerte (Figura II.3.6), se decidió medir los niveles de esta histona modificada en el mismo punto de tiempo, pero, en este caso, luego de un protocolo de entrenamiento débil. Se utilizaron dos grupos de animales: un grupo entrenado con el protocolo de entrenamiento débil e inyectado con NaB (ENdébil+NaB) y otro grupo entrenado con el protocolo de entrenamiento débil e inyectado con solución salina (ENdébil+Veh). Se llevaron a cabo 4 repeticiones independientes de cada experimento. La figura II.3.7 muestra los resultados, en los que se encontró un incremento significativo del nivel de acetilación de la histona H3 a 1 hora después del tratamiento (entrenamiento débil más la inyección de NaB, grupo ENdébil+NaB) en comparación con ambos grupos control (NV y ENdébil+Veh) (ANOVA General $F_{2,9} = 5,33$, Duncan test $p < 0,05$, respectivamente). El entrenamiento débil por sí solo no parece inducir cambios en la acetilación de histona H3, como se observa al comparar los grupos NV y ENdébil+Veh (Duncan test, NS). Por lo tanto, la inhibición de KDACs facilita la memoria al aumentar la acetilación de la histona H3 a 1 hora después el protocolo de entrenamiento débil. Este incremento posee una dinámica temporal similar al aumento observado en la acetilación de esta histona durante la consolidación de una memoria inducida por 30 ensayos.

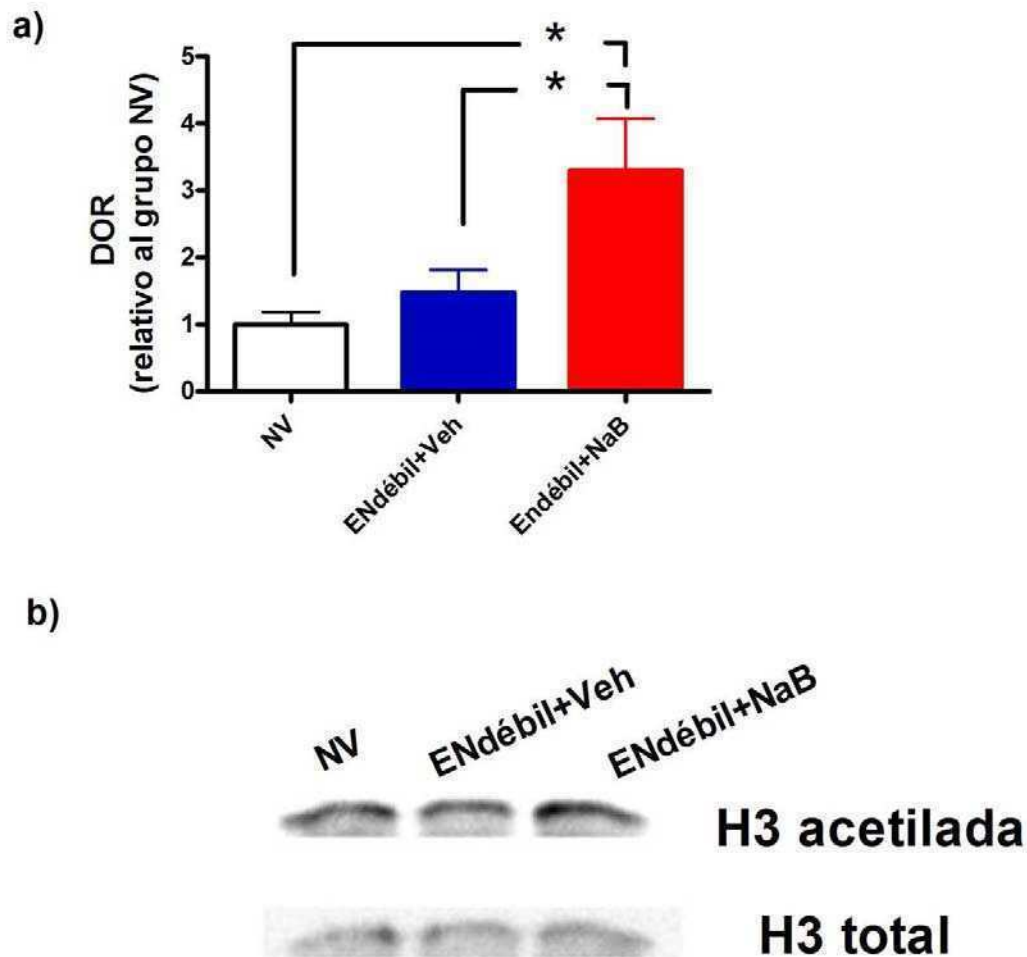


Figura II.3.7: Niveles de acetilación de histona H3 durante la facilitación de la memoria por inyección del inhibidor KDACs. a) El valor mostrado para cada grupo es la media \pm error estándar de los valores específicos de la histonas H3 acetilada, normalizado al valor medio del grupo NV. Los resultados obtenidos provienen de cinco experimentos independientes. Prueba de Duncan, *: $p < 0,05$. b) Western blot representativo de los extractos proteicos de animales luego de 1h post entrenamiento débil más inyección de butirato de sodio, realizados con anticuerpos acetil-H3 específicos (arriba) y anti-H3 total (abajo).

II.4 Conclusiones y Discusión

En esta primera parte de la tesis, se presentan dos líneas de evidencias que apoyan la hipótesis planteada sobre el papel de la acetilación de histonas de la clase H3 en el proceso de consolidación de la memoria en invertebrados.

La primera línea de evidencias demuestra que el inhibidor de KDACs, NaB, el cual incrementó la acetilación de histonas en el cerebro de *Chasmagnathus* (Figura II.3.4), facilita la MLT durante la fase de consolidación. La inyección sistémica de NaB, antes o después de un entrenamiento *débil*, permitió la retención de la MLT a 72 horas (Figura II.3.1 y II.3.2b). Por el contrario, aquellos animales inyectados con vehículo no mostraron retención, tal como se esperaba para animales que reciben una sesión de entrenamiento débil. Además, se encontró que un entrenamiento débil, el cual no provoca *per se* cambios observables en el nivel de acetilación de histonas (Figura II.3.7, grupo ENdébil-Veh), en conjunto con la inyección de NaB promovió un incremento en la acetilación de la histona H3, 1 hora después del entrenamiento (Figura II.3.7, grupo ENdébil-NaB), de manera similar al cambio encontrado 1 hora luego de un entrenamiento fuerte, sin inyección (Figura II.3.6). Por lo tanto, la acetilación de histonas formaría parte del mecanismo facilitador de la memoria del inhibidor NaB.

Se ha demostrado que NaB inhibe la actividad enzimática de las KDACs, tanto de clase I (localización nuclear) y como de clase II (puede localizarse en el núcleo o en el citoplasma). Su acción produce un aumento en la acetilación de histonas y, por lo tanto, la facilitación de la transcripción génica (Dokmanovic y Marks 2005, Marks et al.2004). La expresión génica es un requisito fundamental para la conversión de una memoria lábil de corto término (MCT) hacia una memoria consolidada de largo término (MLT). En un trabajo anterior realizado en nuestro laboratorio, se ha encontrado que un entrenamiento débil de 5 ensayos no recluta la activación suficiente del factor de transcripción NF- κ B (Freudenthal y Romano 2000), a fin de inducir MLT. Los resultados de este capítulo de la tesis sugieren que la facilitación de la transcripción génica inducida por el inhibidor de KDACs podría permitir la síntesis de una cantidad de ARN mensajeros necesaria

para transformar a una traza mnésica débil en aquella que puede sostener una memoria más fuerte, normalmente promovida durante la consolidación.

Asimismo, el inhibidor NaB induce el efecto facilitador de la memoria en dos fases luego del entrenamiento: la primera fase al ser administrado inmediatamente después del entrenamiento y la otra fase alrededor de 6 horas luego del mismo. Contrariamente, este efecto no se encontró a 3 horas o a 12 horas post entrenamiento. Estas dos ventanas de tiempo del efecto de la droga ajustan muy bien con las dos fases post entrenamiento débil para la activación de PKA (Locatelli y Romano de 2005, Locatelli et al. 2002) encontradas en este modelo de memoria, sugiriendo que la expresión génica dependiente de cAMP podría participar en estas dos fases transcripcionales.

Del mismo modo, las dos ventanas del efecto de NaB también se acoplan con las dos fases post entrenamiento estándar encontradas para la activación de NF- κ B (Freudenthal y Romano 2000, Merlo et al. 2002). Éstas últimas, podrían estar siendo reproducidas luego de un entrenamiento débil presentado en concomitancia con la inhibición de KDACs. Teniendo en cuenta que un entrenamiento débil no produce activación de NF- κ B (Freudenthal y Romano, 2000), estos resultados sugieren que el aumento en los niveles de acetilación de histonas H3 por la inyección de NaB durante estas dos fases podría compensar la falta de inducción transcripcional dependiente de NF- κ B luego de un entrenamiento deficiente, al permitir que la actividad transcripcional basal de éste y de otros factores de transcripción sean suficientes para promover la consolidación de la MLT.

La segunda línea de evidencias proviene de los experimentos donde se encontró un aumento en el nivel de acetilación de histona H3 durante la consolidación de la MCS luego de un entrenamiento fuerte. El anticuerpo utilizado para la detección de la histona H3 acetilada fue construido para reconocer las lisinas 9 y 4 (K9 y K14) acetiladas, siendo ambas modificaciones previamente asociadas con activación de la transcripción en diferentes taxa. En los experimentos realizados en este capítulo de la tesis se han encontrado dos características importantes de este incremento en la acetilación durante la consolidación:

1) tal incremento se produce después de un entrenamiento fuerte de 30 ensayos, y no se observa luego de un entrenamiento estándar de 15 ensayos. Esto indicaría que no en todos los casos la formación de MLT emplea este mecanismo epigenético durante la consolidación. La acetilación de histona H3 podría estar involucrada en la consolidación de aquellas memorias de mayor persistencia, no obstante los conceptos de fuerza y persistencia de la memoria no son equivalentes (Las definiciones referidas a éstas características de la memoria serán discutidas en el Capítulo V). Este hallazgo tiene una importante consecuencia interpretativa, pues se considera que para la formación de toda memoria a largo término se requiere de expresión génica. ¿Por qué entonces existirían diferencias entre los mecanismos inducidos por un entrenamiento estándar y por uno fuerte? Se ha propuesto la existencia de dominios estructurales en el genoma donde la cromatina puede encontrarse en estados diferentes. En algunas regiones, la cromatina permanece en un estado preparado para la activación, y los genes localizados en éstas se hayan normalmente accesibles para la maquinaria transcripcional. Mientras que, en otras regiones, donde la cromatina reside en un estado permisivo pero reprimido transitoriamente, los genes requerirían modificaciones ulteriores en la cromatina para ser accesibles (Saccani et al. 2001). Se ha demostrado muy recientemente que algunos genes, por ejemplo el gen que codifica para la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM, por sus siglas en inglés *neural cell adhesion molecule*), poseen normalmente sus regiones regulatorias accesibles pero sufren modificaciones en las histonas de la cromatina subyacente a regiones intragénicas que afectan su transcripción y algunos procesos co-transcripcionales, tal como el empalme o *splicing* del ARNm (Schor et al. 2009). En este marco, los resultados de este capítulo de la tesis apoyan la idea de que algunos genes o regiones intragénicas son accesibles sólo después de una gran inducción, y que este cambio en la expresión de dichos genes contribuye a una mayor persistencia de la memoria, consolidada de esta manera. Debido al hecho de que se ha realizado un análisis del genoma total, no se ha podido determinar si hay algún cambio en el nivel de acetilación de las histonas en los promotores de algunos genes, después del protocolo estándar de entrenamiento. Un análisis específico del proceso de

acetilación en promotores particulares, podría proveer posterior evidencia del rol de este mecanismo de modificación de la cromatina durante la formación de la memoria, evaluando más en profundidad las diferencias obtenidas entre los protocolos estándar y fuerte. La fuerza de la memoria podría estar asociada con diferencias en el patrón de expresión génica, el cual se encuentra bajo la influencia de las modificaciones en la estructura de la cromatina de estos loci (Alberini 2009). Actualmente, se postula la existencia de un código epigenético, el cual regula la expresión de genes y, de esta manera, promueve patrones específicos de transcripción génica durante la formación de las memorias (Roth y Sweatt 2009, Wood et al. 2006b). Los diferentes patrones de transcripción génica podrían estar dados por activación diferencial de genes y/o por diversidad en la temporalidad o intensidad en la que se expresan tales genes.

Los resultados presentados no descartan la coexistencia de cambios en otros residuos en la misma clase de histona, H3, o en otras histonas nucleosomales. Estas modificaciones podrían estar implicadas en la transcripción inducida durante la consolidación de memorias de menor persistencia, como el caso de la memoria generada por un entrenamiento de 15 ensayos. Aún más, la ausencia de H3 acetilada podría *marcar* la cromatina en aquellos genes que son regulados y requeridos para mediar la formación de la memoria de tal manera de inducir un tipo de memoria de menor *fuerza* o menos *persistente* que aquellas que sí implican el mecanismo de acetilación.

2) El incremento en el nivel de acetilación de histona H3 es transitorio, disminuyendo a su nivel basal a las 6 h después del entrenamiento. Hasta la fecha de escritura de esta tesis, este es el primer estudio del curso temporal de la acetilación de histonas durante la consolidación de la MLT, mostrando la cinética de este proceso molecular durante la formación de la memoria. Por un lado, este resultado podría explicarse por la implicancia de la acetilación de histonas en la activación transcripcional. Dado que esta MPT es la de mayor potencialidad como inductora de cambios en la estructura de la cromatina, se podría pensar que por medio de este mecanismo el ADN es extremadamente sensible a la transcripción de manera tal que es necesario revertirlo para culminar con la ola transcripcional y

avanzar en el proceso de consolidación. Al contrario de la acetilación, el estudio de otras clases de PTMs de histonas podría revelar cambios duraderos en las marcas epigenéticas del genoma durante la formación de la MLT.

Por otra parte, en este modelo de memoria el incremento en el nivel de acetilación de histonas H3 a 1 hora post entrenamiento coincide con la activación de ERK1/2 luego de un entrenamiento estándar (Feld et al.2005). Esta quinasa forma parte de la vía de señalización de las MAPKs, es activada por fosforilación, pudiendo translocarse al núcleo para fosforilar y consecuentemente activar factores de transcripción (Bodart 2010). ERK 1/2 ha sido involucrada en la formación de la memoria (Davis y Laroche 2006). La actividad de las KDACs de clase II es regulada por fosforilación, modificación que promueve su exportación desde el núcleo y su permanencia en el citoplasma, impidiendo su actividad inhibidora de la transcripción (Yang y Seto 2008). Ya que en el modelo de memoria en *Chasmagnathus*, así como en el condicionamiento de miedo en ratón (Tronson et al.2009), el aumento de ERK fosforilada durante la consolidación es extra-nuclear, una hipótesis que surge es que esta vía de señalización podría servir como reguladora de la actividad de las KDACs durante la consolidación de la memoria, favoreciendo su retención en citoplasma. Posteriores experimentos utilizando inhibidores de esta vía en combinación con técnicas moleculares que detecten KDACs de clase II fosforilada en este compartimento celular neuronal, podrían otorgar evidencias que sustenten esta hipótesis.

Aunque NaB es un fármaco ampliamente utilizado para inhibir las proteínas KDACs en procesos de memoria, se han encontrado otros efectos no relacionados con la acetilación de histonas (Resta-Lenert et al.2001). En este capítulo se ha demostrado que otra droga inhibidora, TSA, también facilita la memoria (Figura II.3.3). Este hecho apoya la hipótesis de que la acción de NaB sobre la memoria se debe a la inhibición de KDACs. Coincidentemente, se encontró un aumento en la acetilación de la histona H3 1 hora después de un protocolo de entrenamiento débil, cuando los animales fueron inyectados con NaB (Figura II.3.7), en una marcada correlación con el incremento inducido por un protocolo de entrenamiento fuerte (Figura II.3.6). Estos resultados adicionan pruebas de que el

aumento en la acetilación de la cromatina es la responsable del efecto facilitador de estas drogas.

No obstante, la inhibición de KDACs podría estar aumentando la acetilación de otras proteínas nucleares diferentes de las histonas, lo que contribuiría al efecto de facilitación de la MLT observado. En particular, el factor de transcripción NF- κ B es un sustrato de estas enzimas (Sternier y Berger 2000) y esta modificación post traduccional del factor ha sido demostrada para regular su actividad transcripcional (Chen y Greene 2004). Existe un único trabajo sugiriendo que la inhibición de KDACs aumenta la actividad de NF- κ B durante la facilitación de la memoria en un modelo murino (Yeh et al. 2004), mediante aumentar su estado acetilado. Los resultados de este capítulo en conjunto con resultados previos en el modelo de *Chasmagnathus*, sugieren que esta proteína podría tratarse de otro punto de regulación transcripcional que explica parte del efecto mnésico encontrado.

El hallazgo del efecto facilitador de los inhibidores de KDACs es coherente con los resultados anteriores obtenidos en paradigmas de memoria en modelos murinos (Yeh et al. 2004, Levenson et al. 2004, Vecsey et al. 2007, Fischer et al. 2007). Los resultados presentados aquí y en un trabajo previo en un modelo de plasticidad sináptica (Guan et al. 2002) son las primeras evidencias sobre el papel de la acetilación de histonas en procesos de memoria en invertebrados. Junto con los estudios previos en vertebrados, prueban que la acetilación de histonas es un mecanismo ancestral evolutivamente conservado que forma parte de la regulación de la expresión génica subyacente al proceso de consolidación de la memoria de largo término.

Capítulo III

Participación de la acetilación de histonas durante la fase de reconsolidación en el modelo de memoria contexto señal en *Chasmagnathus*

III.1 Introducción

III.1.1 Reconsolidación de memorias asociativas

Desde hace tiempo, la idea clásica sobre la formación de la memoria de largo término establece que una vez que la memoria se ha consolidado y almacenado, permanece en estado estable por tiempos prolongados, llegando en algunos casos a perdurar por toda la vida del animal. Sin embargo, recientes estudios en vertebrados e invertebrados, han sugerido que la evocación de la memoria asociativa en ausencia del estímulo incondicionado, es decir en ausencia de refuerzo, induce un nuevo período de labilidad del trazo mnésico que precede a la fase de re-almacenamiento (Misanin et al.1968, Mactutus et al.1979, Nader et al.2000, Sara 2000a, Pedreira et al.2002). Esta nueva fase de consolidación, llamada reconsolidación, se ha definido operacionalmente como una ventana temporal que sucede a la re-activación del trazo mnésico producto de la evocación de la memoria en ausencia de refuerzo, en la cual agentes disruptores como inhibidores de síntesis *de novo* de proteínas, bloquean el almacenamiento de la memoria, produciendo amnesia. La ventaja adaptativa que conferiría tal mecanismo es, hasta el día de hoy, materia de discusión. Una primera aproximación a este problema ha interpretado que este nuevo período lábil de la memoria sería biológicamente relevante como una instancia de renovación de la predicción establecida en experiencias anteriores, permitiendo de esta manera la actualización o puesta al día de las asociaciones establecidas en el pasado como respuesta a cambios en las condiciones ambientales en el presente (Przybylski y Sara 1997, Hupbach et al.2007). De esta manera, el animal tendría la posibilidad de re-evaluar la relación predictiva entre el estímulo condicionado y el incondicionado generándose, al labilizarse la memoria, la posibilidad de incorporar nueva información a esta relación causal. La memoria una vez reconsolidada podría ser reforzada ó debilitada en virtud de esta nueva experiencia (Sara 2000b, Miller y Matzel 2000, Nadel y Land 2000, Dudai 2006). Este último punto es un tema central en la intención de comprender el destino de una memoria una vez adquirida, abriendo un proceso que podría ser

fundamental para el mantenimiento de un comportamiento lo más certeramente adaptado a las condiciones cambiantes del medio ambiente donde el animal se desarrolla.

III.1.2 Mecanismos moleculares involucrados en la reconsolidación

Si bien ambos procesos, la consolidación y la reconsolidación, dependen positivamente de la síntesis *de novo* de proteínas y ARN mensajeros, la identidad de los mecanismos moleculares involucrados en la fase de reconsolidación es, actualmente, materia de intenso debate (Debiec et al.2002, Myers y Davis 2002, Lee et al.2004, Salinska et al.2004, Dudai 2006). Varios trabajos proponen que cada proceso tendría una identidad propia y, entonces, ambos se diferenciarían entre sí gracias a los mecanismos moleculares que involucran. Lee y colaboradores (2004), utilizando un paradigma de condicionamiento de miedo contextual en ratas, demostraron que la fase de consolidación depende de la vía de transducción de señales activada por el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, del inglés *brain derived neurotrophic factor*) pero no de la activación del factor de transcripción inducible Zif268 en el hipocampo, mientras que la reconsolidación de esta memoria sí necesita de la actividad de Zif268, pero es independiente de BDNF. Por otro lado, tan importante como las proteínas involucradas en cada proceso, también lo son las áreas del cerebro implicadas en cada caso. Se ha reportado en un paradigma de evitación inhibitoria en ratas, que la consolidación, y no la reconsolidación de la memoria, depende de la expresión del factor de transcripción C/EBP β (del inglés *CCAAT enhancer binding protein β*) en el hipocampo (Taubenfeld et al.2001).

Otra serie de evidencias experimentales sugieren que algunos mecanismos moleculares sí estarían conservados entre los procesos de consolidación y reconsolidación. La activación en el cerebro anterior del factor de transcripción CREB (del inglés *cAMP-responsive element binding protein*) es crucial tanto para la consolidación como para la reconsolidación de una memoria de miedo al contexto en ratones (Kida et al.2002). Otro factor de transcripción involucrado es el factor nuclear κ B (NF- κ B), cuya participación durante la consolidación y la reconsolidación de la memoria fue evidenciada tanto en modelos de vertebrados como de invertebrados (Merlo et

al.2005, Romano et al.2006b, Boccia et al.2007). En lo que respecta a los neurotransmisores involucrados también se han reportado similitudes entre ambos procesos. Przybylski y colaboradores (1999) demostraron que tanto en la consolidación como en la reconsolidación de una memoria de evitación inhibitoria en ratas, es necesaria la cascada de eventos intracelular activada por receptores β -adrenérgicos.

III.1.3 La reconsolidación de la MCS en *Chasmagnathus*

Como se ha visto en el capítulo II, en el paradigma de memoria del cangrejo *Chasmagnathus*, quince ó más presentaciones del estímulo visual de peligro (EVP) con un intervalo entre estímulos (IEE) mayor o igual a 27 segundos inducen la consolidación de una memoria de largo término. De esta manera queda establecida una asociación entre las claves contextuales (estímulo condicionado) y el pasaje del EVP (estímulo incondicionado). Una vez consolidada la memoria contexto señal, el cangrejo adquiere una nueva respuesta al pasaje del EVP en el contexto de entrenamiento, pasando de un robusto escape en las primeras presentaciones a una respuesta de congelamiento luego del entrenamiento. Esta memoria consolidada y estable es plausible de volver a un estado lábil, es decir, a un estado sensible a la disrupción, como consecuencia de la exposición breve de alrededor de 5 minutos al contexto de entrenamiento sin presentación del estímulo visual de peligro (Pedreira et al. 2002). Esta fase, denominada entonces de *reconsolidación*, se caracteriza por necesitar de los mecanismos de síntesis *de novo* de proteínas (Pedreira y Maldonado 2003) y regulación de la expresión génica (Merlo et al.2005) para volver la MCS a un estado estable. Por otra parte, otros estudios en este mismo modelo de memoria evidenciaron que la reconsolidación de la MLT puede ser facilitada (Frenkel et al.2005). En estos estudios, los animales recibieron un entrenamiento débil, el cual genera una memoria que no se expresa a largo término, y fueron re-expuestos al contexto 24 horas después de manera concomitante a distintas condiciones que modifican los niveles endógenos de angiotensina II (ANGII). Bajo el mencionado protocolo, los animales mostraron retención de la memoria en la sesión de evaluación. Estos resultados sugieren que el valor funcional de la reconsolidación sería

el de ofrecer una etapa de modulación de la expresión de la memoria por parte de la experiencia individual concurrente al transcurso de esta fase.

III.1.4 Mecanismos epigenéticos y la reconsolidación de la memoria.

Aunque ha sido demostrado que la activación de la expresión génica es un paso necesario para la reconsolidación de la memoria, los mecanismos que regulan la transcripción durante esta fase han sido menos estudiados. Hasta la fecha de escritura de la tesis, existe un único trabajo que apoya la idea de que la acetilación y fosforilación de histonas estaría implicada en la reconsolidación de la memoria en el modelo de miedo condicionado al contexto en ratones (Lubin et al. 2007). En este trabajo se demuestra que la quinasa de I κ B (IKK) fosforila histonas en el promotor de Zif268 y promueve la acetilación de histonas durante la reconsolidación. Sin embargo, no se evalúa si la inhibición de KDACs facilita la memoria en reconsolidación. En otro estudio, utilizando ácido valproíco (VPA) como inhibidor de KDACs, se muestra un efecto facilitador de esta droga durante la fase de reconsolidación en el modelo de memoria de miedo condicionado a una clave en ratones (Bredy y Barad 2008). No obstante, VPA ha sido ampliamente utilizado como una droga anticonvulsivante y estabilizante del humor por su acción, entre otras, como agonista sobre el sistema gabaérgico y el efecto sobre canales de sodio dependiente de voltaje (Bowden y Singh 2005) y ha sido mostrado su efecto amnésico en algunos paradigmas de memoria (Umka et al. 2009). Por lo tanto, la conclusión de que el efecto facilitador de VPA sobre la reconsolidación es debida a inhibición de KDACs y la consecuente hipótesis de que la reconsolidación puede ser facilitada por inhibidores de KDACs permanecen sujetas a ulterior evidencia.

Más allá de estas evidencias, poco se conoce de los procesos involucrados en la reconsolidación de la memoria, quedando algunas preguntas sin responder: ¿Hasta qué punto la reconsolidación involucra procesos similares a los de la consolidación? ¿Existen diferencias en los mecanismos moleculares involucrados en cuanto a la calidad, cantidad o temporalidad? ¿Es inducida la acetilación de histonas por la evocación de la memoria de largo término? ¿Está este proceso epigenético funcionalmente asociado al mecanismo de reconsolidación? Teniendo presente la hipótesis que sostiene que los mecanismos moleculares básicos involucrados en la consolidación son necesarios para la re-estabilización de la memoria reactivada (Dudai 2006, Romano et al.2006), en el presente capítulo se estudió el papel de la acetilación de histonas en la fase de reconsolidación de la MCS. Se presenta una serie de experimentos que, por un lado, evalúan si la acetilación de histonas H3 es inducida luego de la re-activación de la MCS desencadenada por una exposición breve al contexto de entrenamiento y, por el otro, examinan la factibilidad de facilitar una memoria durante la fase de reconsolidación mediante la inhibición de KDACs y, en consecuencia, el aumento de la acetilación de histonas.

III.2 Materiales y Métodos

Los animales y el dispositivo experimental de entrenamiento y evaluación utilizados en este capítulo de la tesis son similares a los descriptos en el Capítulo II.

III.2.1 Procedimiento experimental

Los **enfoques metodológicos** y el **análisis de datos** utilizados para el desarrollo de este capítulo fueron similares a los descriptos en el Capítulo II. Las variaciones y especificaciones son detalladas a continuación.

II.2.2 Experimentos de correlación

Determinación del nivel de acetilación de histona H3 a durante la reconsolidación de la memoria

Diseño experimental

Cada experimento consistió en dos grupos de animales:

Grupo NoReexp: este grupo de animales recibió una *sesión de entrenamiento fuerte* (descrita en el capítulo II), que constó de 30 ensayos con IEE de 171 segundos. A las 24 horas luego de la sesión de entrenamiento, los animales fueron anestesiados y se condujo el procedimiento de disección de cerebros, en simultáneo con los animales pertenecientes al *grupo Reexp*. Este grupo de animales constituye el grupo control negativo del experimento.

Grupo Reexp: este grupo de animales recibió una *sesión de entrenamiento fuerte* (descrita en el capítulo II), que constó de 30 ensayos con IEE de 171 segundos. A las 24 horas luego de la sesión de entrenamiento, los animales fueron sujetos a una *sesión de re-exposición*, que consistió en colocar a los animales en el mismo *contexto* del entrenamiento, re-exponiéndolos al mismo durante 5 minutos sin la presentación del EVP. A 1 hora luego de la sesión de re-exposición, se procede con la disección de cerebros y obtención de extractos enriquecidos en histonas para el análisis mediante Western Blot del nivel de histona H3 acetilada, tal como se describe en el capítulo II.

II.2.3 Experimentos de intervención farmacológica y análisis mecanístico

Comparación entre los niveles de acetilación de histona H3 durante la reconsolidación de memorias inducidas por distintos entrenamientos

Diseño experimental

Cada experimento consistió en cuatro grupos de animales:

Grupo 30E NoReexp: este grupo de animales recibió una *sesión de entrenamiento fuerte* de 30 ensayos con IEE de 171 segundos. A las 24 horas luego de la sesión de entrenamiento, los animales no fueron re-expuestos. Este grupo de animales constituye el grupo control negativo del experimento.

Grupo 30E Reexp: este grupo recibió una *sesión de entrenamiento fuerte* de 30 ensayos con IEE de 171 segundos, inmediatamente después de la cual los animales fueron inyectados con vehículo. A las 24 horas recibieron una *sesión de re-exposición*. Este grupo de animales constituye el grupo control positivo del experimento.

Grupo 5E+VEH: este grupo recibió una *sesión de entrenamiento débil* de 5 ensayos, inmediatamente después de la cual los animales fueron inyectados con vehículo. Luego de 24 horas recibió una *sesión de re-exposición*.

Grupo 5E+NaB: este grupo recibió una *sesión de entrenamiento débil*, inmediatamente después de la cual los animales fueron inyectados con butirato de sodio. Luego de 24 horas fue sometido a una *sesión de re-exposición*.

Entre sesiones, los animales eran alojados en recipientes individuales, con agua marina, oscuridad constante y temperatura controlada.

En el caso de los grupos *30E Reexp*, *5E+VEH*, *5E+NaB*, luego de la hora posterior a la re-exposición, los animales fueron anestesiados y se procedió a la obtención de extractos de histonas, para el análisis mediante Western Blot del nivel de histona H3 acetilada, tal como se describe en el capítulo II. Los animales del grupo *30E NoReexp* fueron anestesiados en paralelo con los otros grupos y se procedió a la disección de cerebros de forma simultánea.

Niveles de acetilación de histona H3 luego de un protocolo de facilitación de la MCS presentado en la fase de reconsolidación

Diseño experimental

El experimento de facilitación de la MCS mediante privación de agua, manipulación que en esta tesis se denominará *sequedad*, durante las dos (2) horas posteriores a la re-exposición al contexto fue desarrollado por Delorenzi y sus colaboradores (Frenkel et al.2002). Brevemente, el experimento verificando tal protocolo de facilitación de la MCS se realizó de la siguiente manera. Cada experimento constó de 80 animales. Los mismos fueron divididos en dos grupos de cuarenta individuos: grupo CT+Seq y grupo ENdébil+Seq. Durante la sesión de entrenamiento, el primer grupo de animales permanece en el actómetro sin ser estimulado con el EVP (CT+Seq) mientras que el otro grupo de animales es estimulado con un protocolo de entrenamiento débil, de 5 ensayos con un IEE de 171 segundos (ENdébil+Seq). A las 24 horas ambos grupos son re-expuestos al contexto de entrenamiento durante 5 minutos, con el objeto de inducir la fase de reconsolidación en aquellos animales que han sido entrenados el día anterior (grupo EN+Seq). Inmediatamente post re-exposición todos los grupos son sometidos a un período de privación de agua durante 2 horas. Al cabo de este período, se les colocó agua a los recipientes en los cuales eran alojados los animales, y éstos permanecieron de esta manera hasta el momento de la sesión

de evaluación. A las 24 horas (es decir, a 48 horas post entrenamiento) todos los animales fueron evaluados para la retención de la MCS (Figura III.5). Los actómetros durante las sesiones de entrenamiento, re-exposición y evaluación en todos los casos contienen agua.

Con el objeto de estudiar el nivel de acetilación de histonas, se combinó dicho protocolo con metodologías de intervención farmacológica y análisis molecular del proceso de acetilación. Para ello, cada experimento consistió en tres grupos de animales:

Grupo NoSeq+VEH: este grupo recibió una *sesión de entrenamiento débil*. A las 24 horas, los animales fueron sometidos a una *sesión de re-exposición*, 70 minutos después de la cual fueron inyectados con vehículo.

Grupo Seq+VEH: este grupo recibió una *sesión de entrenamiento débil*. A las 24 horas, los animales fueron sometidos a una *sesión de re-exposición*, inmediatamente después de la cual se les retiró el agua de los recipientes individuales en los que eran alojados. Después de 70 minutos de la terminación de la sesión de re-exposición, los animales fueron inyectados con vehículo.

Grupo Seq+SAR: este grupo recibió una *sesión de entrenamiento débil*. A las 24 horas, los animales fueron sometidos a una *sesión de re-exposición*, inmediatamente después de la cual se les retiró el agua de los recipientes individuales en los que eran alojados. Después de 70 minutos de la terminación de la sesión de re-exposición, los animales fueron inyectados con el antagonista no selectivo del receptor de ANGII, saralasin.

Luego de las 2 horas de sequedad (grupos *Seq+SAR* y *Seq+VEH*) o de no sequedad (grupo *NoSeq+VEH*), posteriores a la re-exposición, los animales fueron anestesiados y se procedió a la obtención de extractos de histonas, para el análisis mediante Western Blot del nivel de histona H3 acetilada, tal como se describe en el capítulo II.

Drogas utilizadas

Saralasin. Cincuenta μ l de vehículo o de la solución de un antagonista no selectivo de los receptores de ANGII, llamado saralasin (SAR) (Sigma Aldrich, EE.UU), se administraron a cada animal de forma sistémica. Se utilizó una dosis de 50 pmol por animal, disuelta en solución salina para cangrejo (Hoeger & Florey, 1989). La solución inyectada como vehículo fue solución salina.

III.2.4 Experimentos de intervención farmacológica y análisis comportamental

Efecto de la administración de una droga inhibidora de KDACs sobre la reconsolidación de la memoria de largo término

Diseño experimental

Sesión de entrenamiento débil: consistió de 5 ensayos separados por un intervalo entre ensayos (IEE) de 171 seg. Cada experimento incluía dos grupos control pasivo (CT) no entrenados, que permanecía en los actómetros sin recibir estimulación durante el tiempo que duraba la sesión, y dos grupos entrenados (EN).

Sesión de re-exposición: consistió en colocar a los animales en el mismo *contexto* del entrenamiento, re-exponiéndolos al mismo durante 5 minutos sin la presentación del EVP. Cada experimento contó con cuatro grupos: dos grupos CT, en los cuales los animales eran inyectados con vehículo (CT-VEH) o con droga (CT-X), y dos grupos entrenados (EN), en uno de los cuales los animales eran inyectados con el vehículo (EN-VEH), mientras que en el otro era inyectados con la droga (EN-X). Según el experimento, los animales fueron inyectados a diferentes tiempos antes (pre-) y luego (post-) de la sesión de re-exposición: 20 minutos pre, 45 minutos post o 1 hora post re-exposición. Cada grupo estaba formado por 40 animales.

Sesión de evaluación: consistió en un ensayo de 9 segundos. Se llevó a cabo a distintos tiempos luego de haber finalizado la sesión de entrenamiento. En esta sesión se evidenció la retención de la MCS.

Tanto la sesión de entrenamiento como la de evaluación eran precedidas por un período de adaptación sin estimulación de 10 min. El intervalo entre sesiones de entrenamiento y reexposición fue de 24 horas, mientras que entre sesiones de entrenamiento y evaluación fue de 72 horas. Para cada experimento, las sesiones de entrenamiento, re-exposición y evaluación se realizaron en la misma franja horaria. Entre sesiones, los animales eran alojados en recipientes individuales, con agua marina, oscuridad constante y temperatura controlada.

Método de inyección y drogas utilizadas

Similar al capítulo II.

Butirato de sodio, NaB. Ya descrita en Capítulo II.

III.3 Resultados

III.3.1 La reconsolidación de la memoria fuerte induce un aumento en la acetilación de histonas H3

La regulación de la expresión génica es un proceso necesario en la reconsolidación de la memoria (Sara 2000, Nader 2003). En esta parte de la tesis, se evaluó si la reconsolidación recluta mecanismos modificadores de la cromatina, por ejemplo la acetilación de histonas, como parte de la regulación de la expresión de genes. La siguiente serie de experimentos tuvo por objeto evaluar si los niveles de acetilación de histonas de la clase H3 cambian durante la fase de reconsolidación de la MCS. Teniendo en cuenta que observamos cambios en la acetilación de esta histona durante la consolidación sólo después de un protocolo de entrenamiento fuerte, se probó si el mismo entrenamiento de 30 ensayos recluta el mecanismo de acetilación después de la sesión de re-exposición al contexto. El protocolo fue el siguiente: en el primer día, 40 animales fueron entrenados con 30 ensayos (con un IEE de 171 segundos). Veinticuatro horas más tarde, 20 cangrejos fueron re-expuestos a los respectivos actómetros durante 5 minutos (grupo Reexp) mientras que los 20 cangrejos restantes no fueron re-expuestos (grupo NoReexp). Una hora después de la sesión de re-exposición, los cangrejos fueron sacrificados para la obtención de extractos de histonas de cerebro y los niveles de acetilación de histona H3 fueron evaluados, como ya se ha descrito en el capítulo II. Se llevaron a cabo 4 experimentos independientes. Los resultados muestran un incremento significativo en la acetilación de histonas H3 en el grupo re-expuesto (Prueba T $p < 0,01$) en comparación con el nivel de acetilación de H3 en el grupo no re-expuesto (Figura III.1). De esta manera, se evidencia que la acetilación de histonas es reclutada durante la reconsolidación, de igual manera que en la fase de consolidación.

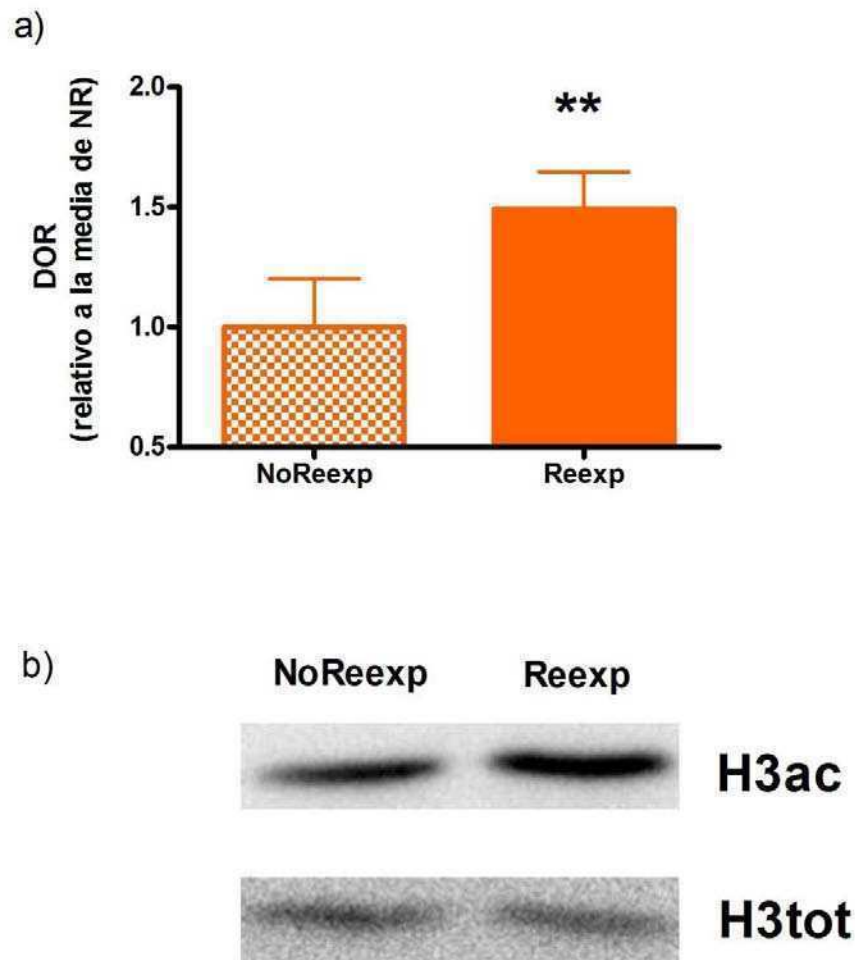


Figura III.1: Cambios en la acetilación de histonas durante la reconsolidación de la memoria. El valor mostrado para cada grupo es la media \pm error estándar de los valores específicos de las bandas de histona H3 acetilada, normalizadas a H3 total y al valor medio del grupo NoReexp. Resultados obtenidos de cuatro experimentos independientes. Prueba t de Student, **: $P < 0,01$. b) Western blot representativo, realizado con anticuerpos acetil-H3 específico (arriba) y anti-H3 total (abajo).

III.3.2 La reconsolidación de una memoria débil que ha sido facilitada por NaB durante su consolidación muestra altos niveles de histona H3 acetilada en la reconsolidación

Los experimentos de la sección III.3.1 demuestran que la reconsolidación de una memoria fuerte implica un incremento en el nivel de H3 acetilada a 1 hora post re-exposición. Teniendo en cuenta este resultado y aquellos descritos en el capítulo II, en los cuales se observó que una memoria débil facilitada mediante administración del inhibidor de KDACs en consolidación involucra acetilación de histonas tal como la consolidación de una memoria fuerte, se buscó comparar la reconsolidación de ambas memorias con el objetivo de investigar si durante esta fase también reclutan mecanismos similares. Para ello, se realizó el siguiente experimento. Se tomaron 80 animales y se dividieron en 4 grupos. Dos grupos, cada uno de 20 animales, fueron entrenados con un protocolo de entrenamiento fuerte (30E NoReexp y 30E Reexp). Otro grupo de 20 animales fue entrenado con un protocolo de entrenamiento débil e inmediatamente post entrenamiento fueron inyectados con solución salina (5E+Veh). Un último grupo de 20 animales fue entrenado con un protocolo de entrenamiento débil y los animales recibieron una inyección de NaB inmediatamente post entrenamiento (5E+NaB). A las 24 horas, todos los grupos, excepto el grupo 30E NoReexp, fueron sometidos a una sesión de re-exposición, de manera tal de inducir la fase de reconsolidación. A 1 hora post re-exposición los animales fueron sacrificados para la obtención de extractos de histonas de cerebro y los niveles de acetilación de histona H3 fueron evaluados de la misma manera que en el capítulo II. La extracción de histonas para el grupo 30E NoReexp se realizó en simultáneo con aquella de los otros grupos. Los resultados indican que hay un aumento similar en el nivel de histona H3 acetilada a 1 hora post re-exposición en los grupos 30E Reexp y 5E+NaB (Prueba T: NS), el cual es significativamente mayor al comparar con los grupos 30E NoReexp y 5E+Veh, respectivamente (Prueba T: 30E Reexp vs 30E NoReexp $p < 0,05$; 5E+NaB vs 5E+Veh $p < 0,01$) (Figura III.2). Por lo tanto, la reconsolidación de una memoria inducida por un entrenamiento débil y facilitada durante su consolidación mediante la administración de NaB, involucra un aumento a la hora post reactivación, de manera similar a la reconsolidación de una memoria fuerte inducida por un entrenamiento de 30 ensayos.

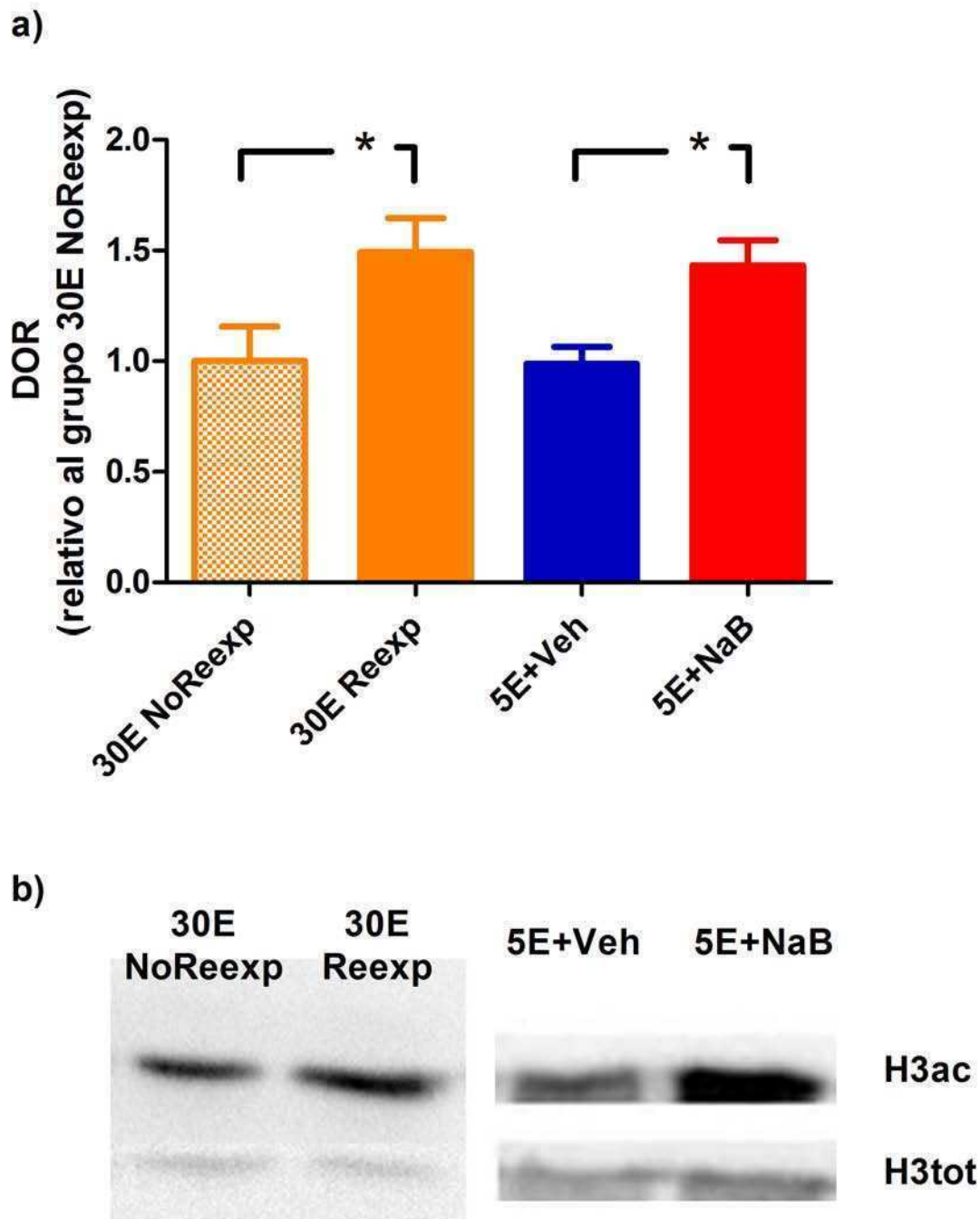


Figura III.2: Cambios en la acetilación de histonas durante la reconsolidación de la memoria. El valor mostrado para cada grupo es la media \pm error estándar de los valores específicos de las bandas de histona H3 acetilada, normalizadas a H3 total y al valor medio del grupo 5E+Veh. Resultados obtenidos de cuatro experimentos independientes. Prueba t de Student, *: $P < 0,05$. b) Western blot representativo, realizado con anticuerpos acetil-H3 específico (arriba) y anti-H3 total (abajo).

III.3.3 El inhibidor de KDACs no facilitó la MCS durante la fase de reconsolidación

Con el objetivo de profundizar sobre el papel de este proceso epigenético en la reconsolidación de la memoria, se investigó si una memoria *débil* podría ser facilitada mediante la administración del inhibidor NaB luego de que la memoria ha sido reactivada y labilizada mediante una breve re-exposición al contexto, 24 horas después del entrenamiento (Pedreira et al. 2002, Merlo et al.2005). Para ello, se realizaron 3 experimentos independientes, en cada uno los cuales la administración de NaB se realizó en distintos tiempos post reactivación. Como se mencionó en la introducción, existen antecedentes en este modelo de memoria de reforzamiento de una memoria débil en la fase de reconsolidación mediante manipulaciones de los niveles del neuromodulador ANGII (Frenkel et al.2005).

En el primer experimento, los animales recibieron un entrenamiento débil, 24 horas después fueron inyectados con NaB o solución salina (Veh), 20 minutos antes de la re-exposición al contexto de entrenamiento. La re-exposición en todos los casos duró 5 minutos, promoviendo la reactivación de la memoria e induciendo la fase de reconsolidación (Pedreira et al.2002). La sesión de evaluación de la MCS se realizó 72 horas después de la sesión de re-exposición. Tal como muestran los resultados ilustrados en la figura III.3a, no se encontraron diferencias significativas en ninguna comparación entre los grupos CT y EN. En el segundo experimento, las animales fueron inyectados con NaB o Veh a los 45 minutos post sesión de re-exposición. Al igual que en el experimento anterior, no se encontraron diferencias en la respuesta de escape entre los grupos (Figura III.3b). En un tercer experimento, los animales fueron inyectados 1 hora después de la sesión de re-exposición, otra vez realizada 24 horas después de la sesión de entrenamiento débil. Como se muestra en la Figura III.3c, nuevamente, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la sesión de evaluación.

Estos experimentos sugieren que no es posible facilitar la memoria débil mediante la inyección de inhibidores de KDACS durante la reconsolidación. En el diseño de este experimento se evitó la inyección a tiempos inferiores a 20 minutos antes de la re-exposición ó a 45 minutos después de la misma, debido a la existencia de efectos deletéreos sobre la memoria por la manipulación de los cangrejos en tiempos muy cercanos a la fase de labilización de la MCS (Pedreira y Maldonado 2003, Merlo et al. 2005).

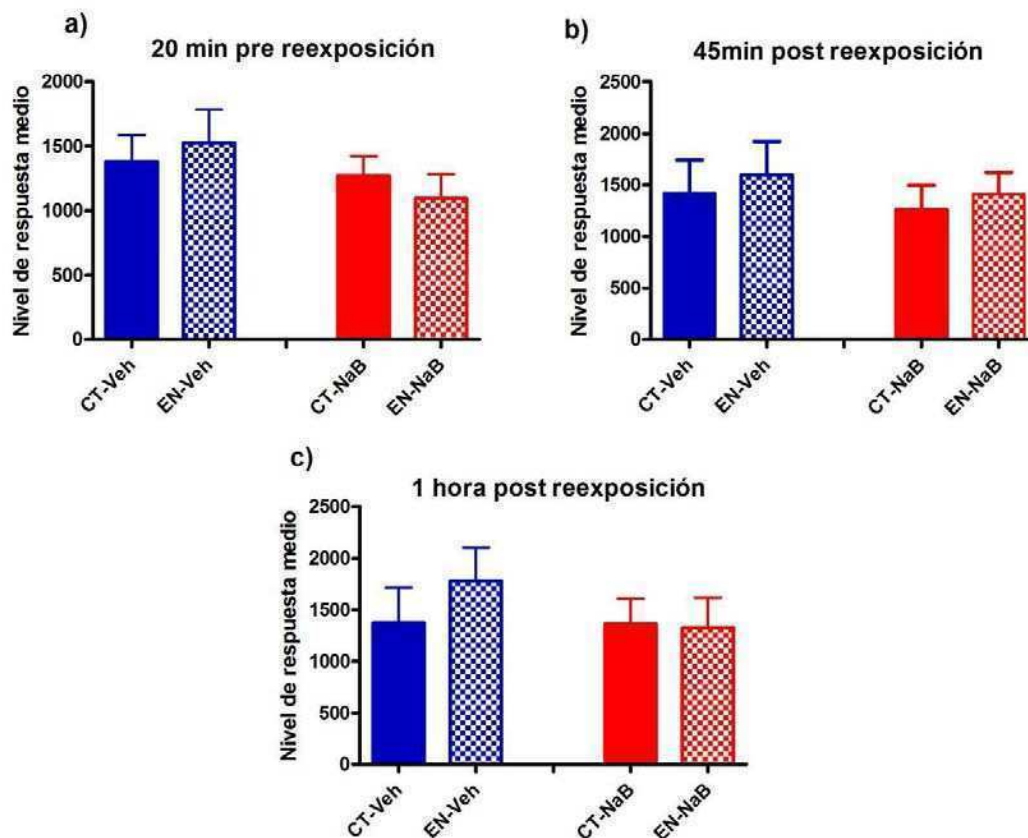


Figura III.3: Efecto de la inyección de inhibidor de KDACS butirato de sodio durante la reconsolidación de la memoria. Nivel de respuesta medio en la sesión de evaluación ante la presentación del EVP. a) Animales inyectados 20 minutos antes de la re-exposición al contexto. b) Animales inyectados 45 minutos post re-exposición al contexto. c) Animales inyectados a 1 h luego de la re-exposición al contexto. Nivel de respuesta media + / - error estándar. ANOVA NS.

III.3.4 El estrés hídrico puede facilitar la MCS durante la reconsolidación pero no involucra acetilación de H3

Experimentos realizados en este mismo modelo de memoria han demostrado que una memoria débil puede ser facilitada por medio de someter a los animales a períodos de restricción de agua, durante las fases de consolidación y reconsolidación. En la consolidación, la restricción de agua por un período de 2 horas facilita la memoria e induce la activación del factor de transcripción NF- κ B (Frenkel et al.2002), mecanismo implicado en la consolidación y reconsolidación de la memoria en vertebrados e invertebrados (Merlo et al.2005, Freudenthal et al.2007). Esta activación es dependiente de receptores de ANGII (Frenkel et al.2002). En el caso de la reconsolidación, la facilitación inducida por el estrés hídrico requiere de síntesis de proteínas y es mediada por la liberación de ANGII promovida por la privación de agua y bloqueada por antagonista de receptores de ANGII (Frenkel et al.2005). Entonces, se realizó la siguiente serie de experimentos con el objetivo de evaluar si esta facilitación involucra la acetilación de histonas como parte de los mecanismos moleculares implicados. El primer experimento consistió de 3 grupos de animales. En el primer día del experimento, todos los animales recibieron una sesión de entrenamiento débil y luego fueron colocados en recipientes individuales hasta el día siguiente. A las 24 horas, los animales recibieron una sesión de re-exposición al contexto por 5 minutos. Inmediatamente luego de la re-exposición, los animales se dividieron en los distintos grupos. Veinte animales fueron colocados en sus respectivos recipientes individuales con agua y a los 70 minutos post re-exposición recibieron una inyección de solución salina (NoSeq+Veh). Otros veinte animales recibieron una sesión de restricción de agua por 2 horas, dentro de la cual fueron administrados con un antagonista de los receptores de ANGII, saralasin (Seq+Sar), a los 70 minutos post re-exposición. Veinte animales del grupo restante recibieron una sesión de restricción de agua por 2 horas, dentro de la cual fueron administrados con vehículo (Seq+Veh), a los 70 minutos post re-exposición. A las 2 horas post re-exposición los animales fueron sacrificados para la obtención de extractos de histonas de cerebro, y los niveles de histona H3 acetilada fueron evaluados de igual modo que en el capítulo II. Cada experimento constó de 60 animales. Se

realizaron 4 repeticiones independientes de este experimento. Como se observa en la figura III.4, no se encontraron diferencias significativas en las comparaciones realizadas entre los tres grupos (ANOVA General, NS). Por lo tanto, la facilitación de la memoria por el efecto de la restricción de agua durante la reconsolidación no implica cambios en la acetilación de histona H3.

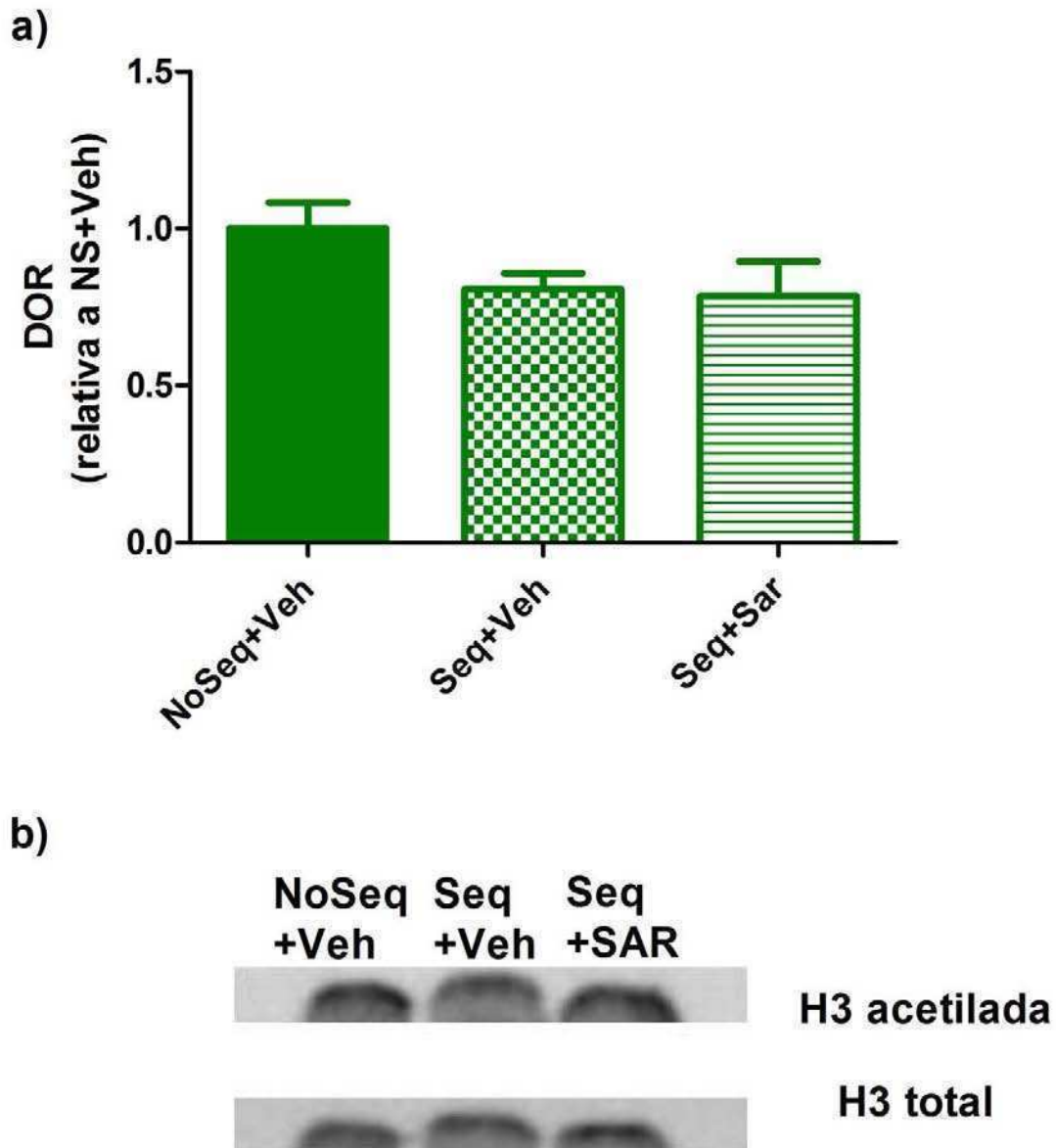


Figura III.4: Estudio de los niveles de acetilación de histonas durante la reconsolidación de una memoria débil facilitada por privación de agua (sequedad). El valor mostrado para cada grupo es la media \pm error estándar de los valores específicos de las bandas de histona H3 acetilada, normalizadas a H3 total y al valor medio del grupo NoSeq+Veh. Resultados obtenidos de cuatro experimentos independientes. ANOVA NS. b) Western blot representativo, realizado con anticuerpos acetil-H3 específico (arriba) y anti-H3 total (abajo).

Al mismo tiempo, se llevó a cabo un experimento con el objetivo de controlar que la memoria débil de 5 ensayos esté siendo facilitada por la privación de agua durante la reconsolidación. Para ello, cada experimento contó con 2 grupos, cada uno de 40 animales, de los cuales un grupo recibió una sesión de entrenamiento débil de 5 ensayos (con un IEE de 171 segundos) (ENdébil+Seq) y el grupo restante permaneció en los actómetros sin recibir estimulación (CT+Seq). A las 24 horas estos animales fueron re-expuesto al contexto por 5 minutos e inmediatamente luego de esta sesión fueron colocados en los recipientes individuales. Todos los animales fueron sometidos a restricción de agua por 2 horas post re-exposición, después de la cual se procedió al llenado con agua de los contenedores individuales en los cuales permanecían. A las 24 horas posteriores a la re-exposición, la retención de la MCS fue evaluada. Como se observa en la figura III.5, existen diferencias significativas entre los grupos ENdébil+Seq y CT+Seq (Prueba T $p < 0,05$). Este experimento confirma resultados similares obtenidos previamente utilizando 6 ensayos durante la sesión de entrenamiento (Frenkel et al.2005), demostrando que es posible facilitar una memoria débil 24 horas después del mismo, durante la fase de reconsolidación.

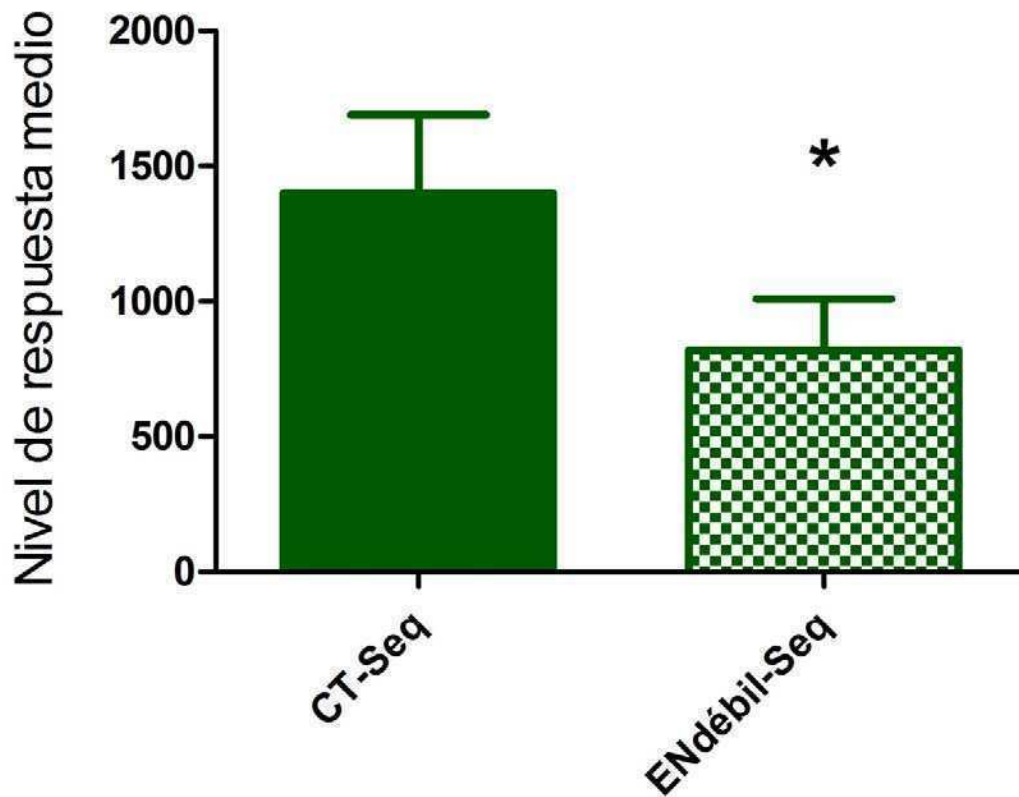


Figura III.5: Efecto de la privación de agua durante la reconsolidación de una memoria débil. Nivel de respuesta medio en la sesión de evaluación ante la presentación del EVP. Media +/- error estándar. Prueba T,* $p < 0.05$.

III.6 Conclusiones y Discusión

En esta segunda parte de la tesis, se presentan resultados que apoyan la hipótesis propuesta de que el proceso de acetilación de histonas de la clase H3 está implicado en la reconsolidación de la memoria.

En primer lugar, se encontró un aumento en los niveles de histona H3 acetilada 1 hora después de la reactivación de una memoria fuerte (Figura III.1), tal como se observa en la fase de consolidación (Figura II.3.5). Junto con las evidencias previas

obtenidas en el modelo de condicionamiento de miedo al contexto en ratas (Lubin et al.2007), los resultados presentados en la presente tesis constituyen los primeros datos experimentales que sugieren que mecanismos epigenéticos estarían implicados en la reconsolidación de la memoria. Este hecho cobra gran relevancia al considerar que los mecanismos moleculares que diferencian y/o comparten la consolidación y la reconsolidación son materia de intenso debate (Dudai 2006). Estos hallazgos sugieren que la acetilación de la cromatina es necesaria durante reconsolidación, de igual manera que la consolidación, de memorias fuertes.

Además, se ha mostrado que si una memoria débil es facilitada durante la consolidación por inyección de inhibidores de KDACs, la reactivación de esta memoria induce un aumento a 1 hora post re-exposición del nivel de histona H3 acetilada (Figura III.2), tal como se observó durante la consolidación de este tipo de memoria (Figura II.3.6). Estos resultados demuestran que si la acetilación de histonas está presente durante la consolidación de una memoria proveniente de un protocolo de entrenamiento débil, que no promueve por sí sólo este proceso (Figura II.3.6, grupo ENdébil+Veh), la memoria que es generada involucra acetilación de histonas nuevamente durante el proceso de reconsolidación. Más aún, la cinética de este mecanismo molecular es similar tanto para memorias débiles mejoradas por inyección de inhibidor de KDACs en consolidación, como para memorias fuertes (III.2, grupos 5E+NaB y 30E).

Por otro lado, no se ha encontrado ningún efecto facilitador de la memoria mediado por la administración de NaB, al ser inyectado antes o después de la re-exposición al contexto de entrenamiento (Figura III.3). Entonces, surgen dos posibilidades: 1) Es posible que el entrenamiento de 5 ensayos forme una memoria débil que no puede ser reconsolidada y, por lo tanto, no puede ser facilitada por la inhibición de KDAC luego de una sesión de re-exposición. Sin embargo, resultados de la figura III.3.5 y antecedentes de trabajos realizados en este mismo modelo (Frenkel et al.2005a y b) han mostrado que la memoria débil puede ser facilitada mediante privación de agua aplicada durante esta fase. Estos mismos estudios también mostraron que esta fase de labilización, facilitada de esta manera, es sensible a inhibidores de síntesis de ARNm y de proteínas. Por lo tanto, esta posibilidad es descartada. 2) La memoria débil inducida por un protocolo de 5 ensayos puede reconsolidar, pero no puede ser facilitada en esta

fase por medio de la administración de inhibidores de KDACs, en contraposición a la facilitación encontrada durante la fase de consolidación (Capítulo II). Este hallazgo es importante en relación al debate establecido sobre los mecanismos compartidos entre la consolidación y la reconsolidación de la memoria. En este modelo, nuestros resultados muestran que según los parámetros del entrenamiento la memoria puede involucrar o no la acetilación de histonas durante la fase de reconsolidación.

Los resultados del experimento ilustrado en la figura III.4 muestran que la facilitación inducida al someter a los animales a un período de restricción de agua de 2 horas post re-exposición no implica un cambio en los niveles de histona H3 acetilada. Entonces, la reconsolidación de una memoria débil, facilitada mediante privación de agua aplicada durante esta fase, no implicaría los mismos procesos que la reconsolidación de una memoria fuerte, al menos en cuanto a la participación de la acetilación de histona H3.

A partir de estos resultados, y en conjunto con aquellos del Capítulo II, postulamos la existencia de tres categorías de memoria: 1) una memoria débil o *latente*, es decir, que no se expresa a largo término pero es potencialmente re-activable y capaz de ser evidenciada en el comportamiento del animal; 2) una memoria estándar o *intermedia*, que es evocable y se expresa a largo término; 3) una memoria *fuerte*, que es evocable, se expresa a largo término e involucra como mecanismo de regulación de la expresión génica acetilación de histonas durante las fases de consolidación y reconsolidación. Por un lado, se ha demostrado que la memoria débil puede ser facilitada durante su consolidación a una memoria de mayor categoría o más fuerte, mediante la acción de neuromoduladores como ANGII o de activadores de proteínas quinasas (Romano et al.1996a y b, Delorenzi et al.2000, Locatelli et al.2002). Los presentes resultados muestran que la memoria débil también puede ser transformada a una memoria *fuerte*, mediante el incremento en el nivel de acetilación de histonas durante la consolidación (Capítulo II y Capítulo III). Por otro lado, una memoria débil puede ser facilitada durante su reconsolidación mediante la acción de los neuromoduladores ya mencionados, pero sólo a una memoria intermedia (Figura III.4). El aumento de acetilación durante esta fase no la facilita (Figura III.3). Por lo tanto, la hipótesis que proponemos postula que el marcado del genoma, mediante acetilación de

histonas, es un proceso necesario para la activación transcripcional durante la reconsolidación de memorias fuertes (el concepto de fuerza de la memoria será debatido, en un marco teórico más amplio, en la discusión final).

Capítulo IV

**Participación de la acetilación de
histonas durante la fase de
consolidación en vertebrados. Modelo
de memoria de reconocimiento de
objeto novedoso en *Mus musculus***

IV.1 Introducción

IV.1.1 Tipos de memoria en vertebrados

En 1949, el filósofo Gilbert Ryle propuso la existencia de dos tipos de conocimientos: el conocimiento *del qué* y el conocimiento *del cómo*. Años más tarde, en estudios realizados en seres humanos con lesiones cerebrales que inducían a estos pacientes a amnesias severas, se descubrió que las consecuencias mnésicas de los daños en diferentes regiones del cerebro no eran generalizadas, es decir, los pacientes perdían la capacidad de recordar determinados aspectos de su vida mientras que otros recuerdos eran retenidos normalmente. En base a estos estudios se definieron dos clases de memoria, las cuales reflejaron los dos tipos de conocimientos a los que hacía alusión Gilbert: la memoria *declarativa*, del qué, y la memoria *no declarativa*, del cómo (Milner 1972), también denominadas memoria *explícita* o *implícita*, respectivamente. La memoria declarativa o explícita se relaciona con la capacidad de recordar de un modo consciente hechos o eventos del pasado (Milner et al.1998). Este tipo de memoria ha sido implicada en el almacenamiento de la representación del mundo externo, en la forma de hechos de conocimiento general, en cuyo caso se denomina memoria declarativa *fáctica* o *semántica*, o de episodios personales, memoria que se denomina declarativa *autobiográfica*. Por ejemplo, recordar que el 28 de diciembre es el día de los santos inocentes (memoria semántica) o la última broma inofensiva que le hicimos a alguien (memoria episódica o autobiográfica). En cambio, la memoria no declarativa subyace a cambios en el desempeño o la destreza (en inglés, *performance*) y la habilidad de responder apropiadamente a distintos estímulos, como resultado de un condicionamiento o aprendizaje de hábitos, pero sin que deba ocurrir el acceso consciente de un episodio previo (Squire et al.1993, Schacter

y Tulving 1994). Por ejemplo, la habilidad que adquirimos para andar en bicicleta, manejar un auto o regañar a conductores vecinos inmediatamente luego de que realizan alguna maniobra inadecuada.

IV.1.2 Sistemas de memoria y consolidación sistémica

Muchas formas de memoria no declarativa, tales como la habituación, la sensibilización y el condicionamiento clásico, son filogenéticamente ancestrales y han sido ilustradas en muchos modelos animales, tanto de invertebrados como de vertebrados. Un ejemplo es el modelo de memoria no declarativa utilizado en esta tesis, el paradigma de memoria contexto señal en *Chasmagnathus*. En cambio, los modelos de memoria declarativa se han desarrollado en animales que poseen una región del cerebro denominada lóbulo temporal (LT) medial en humanos y primates no humanos, o una estructura homóloga en roedores (figura VI.1.1). En general, los principios de organización de las estructuras del LT medial son similares entre especies (Burwell et al.1996). Por lo tanto, los descubrimientos sobre las funciones de dichas estructuras que provienen de un modelo en particular tienen relevancia en las otras especies. En humanos, el paciente H.M. fue el caso modelo mejor conocido (Corkin 2002). Ocurrió a mediados del siglo pasado, que H.M. fue sometido a una operación cerebral con el fin de aliviarlo de sus recurrentes ataques epilépticos. En dicha operación, a H.M. se le removió gran parte de su LT medial, de ambos hemisferios del cerebro (Scoville 1954). Esta cirugía fue exitosa, en cuanto a que redujo la frecuencia de las manifestaciones epilépticas y sus habilidades perceptuales y cognitivas permanecieron intactas, tales como la capacidad para formar memorias de corto término, como la memoria de trabajo (descrita en capítulo II), y el desempeño en aprendizajes perceptuales y motores. Sin embargo, H.M. perdió dos capacidades mnésicas importantes: la habilidad de formar nuevas memorias declarativas y la habilidad para recordar memorias declarativas adquiridas previamente a su operación quirúrgica. El

impedimento de dichas capacidades se conocen como *amnesia anterógrada* y *retrógrada*, respectivamente.

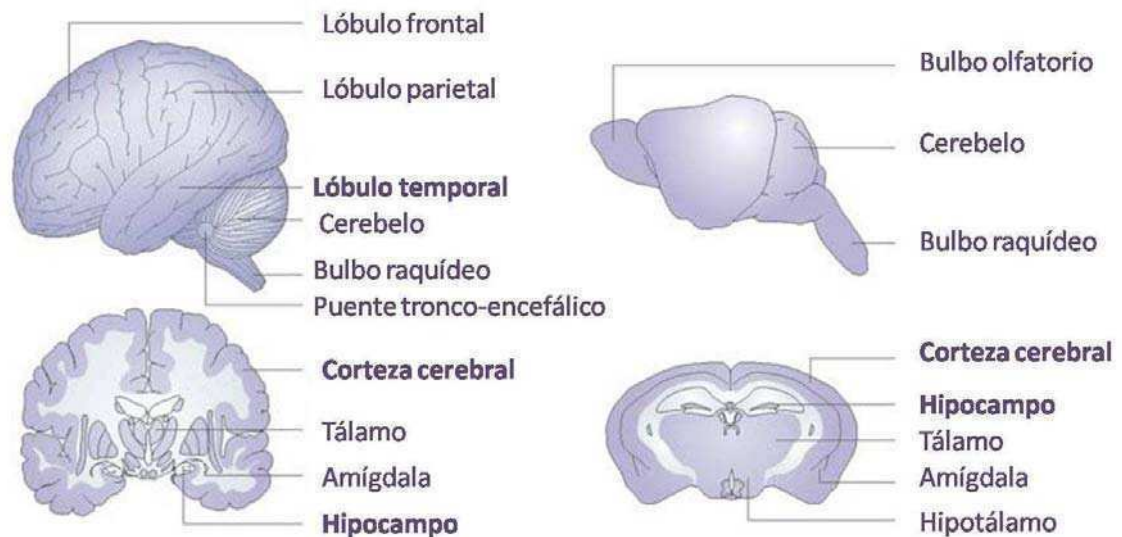


Figura IV.1.1: Comparación neuro-anatómica de algunas regiones del cerebro entre humano (izquierda) y ratón (derecha), desde una vista superficial lateral (arriba) y desde una vista interna, en un corte coronal realizado aproximadamente en el medio del cerebro moviéndose en el eje antero-posterior del animal (abajo). (Gráfico extraído desde Cryan y Holmes 2005).

En relación a la amnesia anterógrada, el aspecto más llamativo del caso H.M fue que el paciente no podía formar nuevas memorias declarativas, es decir, era incapaz de formar recuerdos de eventos recientes (memoria episódica o autobiográfica), posteriores a la operación, o adquirir nueva información de conocimiento general o de hechos (memoria semántica), empero, otras habilidades mnésicas permanecían intactas, tal como la capacidad de establecer nuevas memorias no declarativas (Gabrieli et al.1993). Estudios posteriores en otros pacientes con daño o remoción de la región medial del LT confirmaron los efectos específicos sobre la amnesia anterógrada, afectando a memorias declarativas pero no a memorias no declarativas (Corkin 2002, Squire et al. 2004). Estas

observaciones llevaron a postular que la memoria no es un fenómeno que ocurre en un único lugar del sistema nervioso sino que existe más de un *sistema de memoria*. A partir de estos estudios neuropsicológicos, que asociaron déficits de memoria específicos con daños cerebrales en sitios delimitados, surge el concepto actual de *sistemas de memoria*, los cuales se definen como los distintos sustratos neuroanatómicos en el sistema nervioso central, y sus interrelaciones, que subyacen a diferentes clases de memorias (Gaffan 1974, Hirsh 1974, Nadel y O'Keefe 1974, Squire 1992, Frankland y Bontempi 2005).

Por otro lado, la amnesia retrógrada de H.M. también presentó una característica notable: la pérdida de las memorias pre-existentes no era completa, sino que era más pronunciada para memorias más recientes que para memorias remotas. Esta condición asociada con la pérdida de la memoria se denomina *amnesia temporalmente graduada* y fue caracterizada en muchos pacientes con lesiones similares a H.M. (Squire y Alvarez 1995, Nadel y Moscovitch 1997, Squire et al.2004). Este fenómeno se observó también en modelos animales de memoria declarativa utilizando aproximaciones farmacológicas (Quillfeldt et al.1996, Izquierdo et al.1997, Riedel et al.1999, Maviel et al.2004) o genéticas (Shimizu et al.2000, Wang et al.2003) con el fin de inducir lesiones tanto en el LT medial completo, como en áreas específicas del mismo, tales como hipocampo (Anagnostaras et al.1999, Clark et al.2002) y cortezas entorrinal (Cho et al.1993, Cho et al.1996) y perirrinal (Glenn et al.2003, Thornton et al.1997). El descubrimiento de la amnesia retrógrada temporalmente graduada debido a una lesión en la región del LT medial sugirió que esta región del cerebro podría tener un rol en el almacenamiento y/o la evocación de la memoria declarativa, pero que tal función era llevada a cabo en un tiempo acotado. Por lo tanto, la memoria debía luego almacenarse de manera permanente en otras regiones cerebrales fuera del LT. Esta idea fundó la teoría de la *consolidación sistémica*. En el campo de la neurobiología, se distingue entre dos tipos de consolidación de la memoria: la consolidación sináptica y la consolidación de sistemas (Frankland y Bontempi 2005). La consolidación sináptica se ha caracterizado por ser rápida e incluir

procesos neuronales tales como cambios morfológicos en las conexiones entre neuronas, en sinapsis preexistentes o sinaptogénesis, necesarios para la estabilización inicial de los circuitos que subyacen a la formación de la memoria. Estos cambios sinápticos se llevan a cabo en las primeras horas luego de la adquisición y dependen de procesos moleculares inducidos por el aprendizaje que son, en muchos casos, evolutivamente conservados en vertebrados e invertebrados (Squire y Kandel 1999). Por el contrario, la consolidación sistémica tiene la propiedad de ser más lenta, llevándose a cabo en tiempos prolongados luego del momento del aprendizaje. Este tipo de consolidación implica un proceso gradual de reorganización de distintas regiones del cerebro que subyacen al proceso global de formación de la memoria, pudiendo incluir núcleos cerebrales que no participaban de la fase de adquisición. Este tipo de consolidación ha sido observada en distintos modelos de memoria en vertebrados, tales como durante la formación de memoria declarativa y no declarativa en humanos (Scoville y Miller 1957, Schadmehr y Holcomb 1997) y en roedores (Kim y Fanselow 1992, Clark et al. 2002), así como también en algunos modelos de invertebrados (McBride et al. 1999, Menzel 2001).

IV.1.3 Descripción neuroanatómica del lóbulo temporal medial y sus relaciones con la corteza

Como ya se mencionó, la memoria explícita o declarativa depende de la integridad del LT medial del cerebro (Corkin et al. 1997). Además, el modelo de consolidación de sistemas durante la formación de la memoria declarativa propone que la formación de esta memoria depende inicialmente de hipocampo y luego se vuelve independiente de éste y dependiente de la corteza cerebral (Scoville y Milner 1957, Squire y Alvarez 1995). Por lo tanto, es pertinente describir con algún detalle las estructuras de esta región del LT medial y sus relaciones anatómicas y funcionales conocidas con la corteza cerebral. La descripción se expondrá para el sistema nervioso de primates ya que, a pesar de la considerable diversidad en otras

áreas corticales, la anatomía, la conectividad y el rol funcional del hipocampo y las áreas corticales vecinas son ampliamente conservadas entre las especies de mamíferos (Manns y Eichenbaum 2006).

El sistema nervioso central de un primate adulto puede dividirse según un criterio embriológico en siete regiones anatómicas, cada una de las cuales se desarrollan desde una porción diferente del tubo neural (Kandel, Schwartz y Jesell 1995). Estas siete regiones son: la médula espinal, el bulbo raquídeo, el puente tronco-encefálico (en latín, *pons*), el cerebro medio, el diencéfalo, el cerebelo, y los hemisferios cerebrales (Figura IV.1.2). Los hemisferios cerebrales forman la región más grande del cerebro y consisten en la corteza cerebral, la cual es la porción superficial de los mismos, los ganglios de la base, la amígdala y la formación hipocampal. Estos últimos tres núcleos conforman la porción más profunda de los hemisferios y están funcionalmente relacionados con la corteza. Los hemisferios cerebrales se encuentran divididos por una fisura que corre en el eje anterior-posterior del cerebro, dividiendo los hemisferios derecho e izquierdo que, en la mayoría de sus partes, consisten en imágenes especulares entre sí.

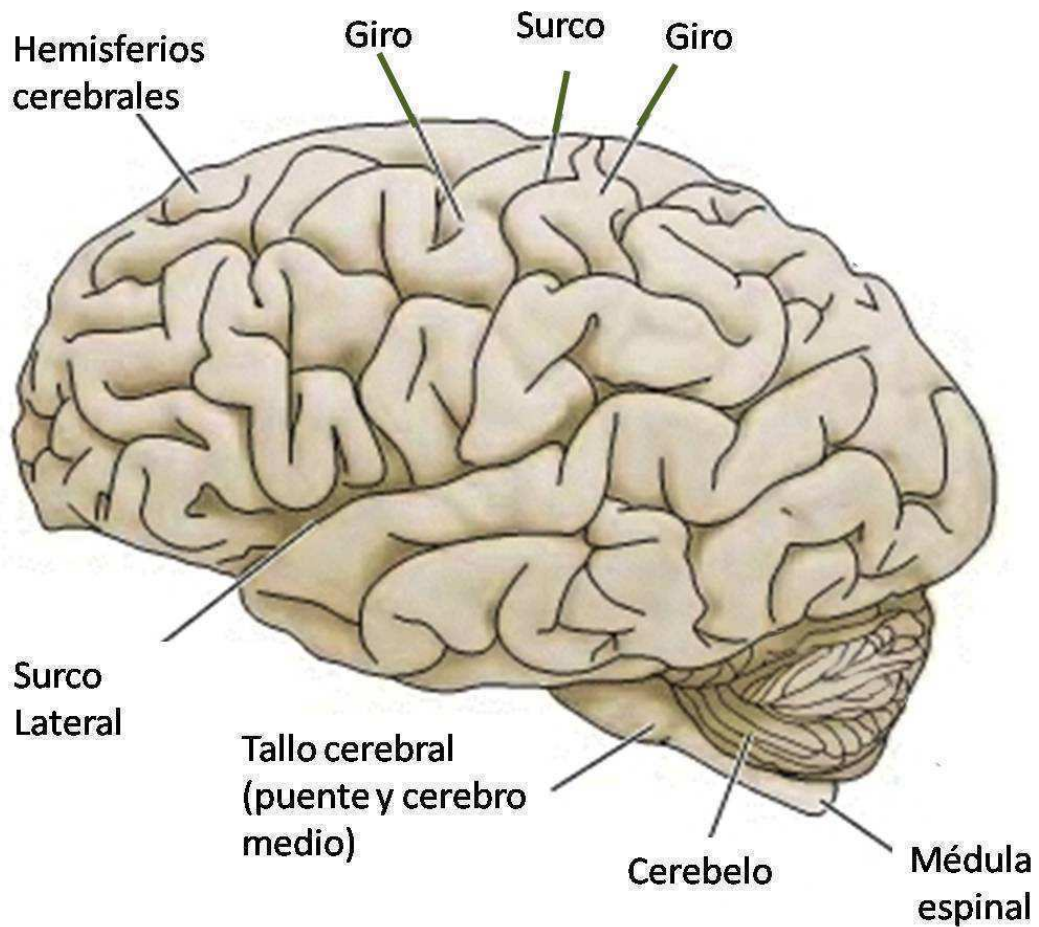


Figura IV.1.2: Dibujo de la vista lateral y superficial del cerebro humano. Se evidencia la existencia de surcos y giros. Se muestran las estructuras cerebrales visibles desde esta perspectiva. (Gráfico extraído desde Purves et al.2001).

La corteza cerebral de un primate es la estructura superficial de los hemisferios cerebrales. De su plegamiento surgen regiones elevadas llamadas giros (en latín, *gyrus*) y surcos que los separan (en latín, *sulci*) (Figura IV.1.2). Los surcos más pequeños varían entre individuos, mientras que aquellos más prominentes son consistentes en su posición entre individuos y, por lo tanto, pueden ser utilizados como líneas de referencia. Dos surcos principales, el surco lateral y el surco central, dividen a la corteza cerebral en 4 lóbulos: frontal, parietal, temporal y occipital (Figura IV.1.3). Existen otras subdivisiones de la corteza cerebral más internas, que no son visibles desde la superficie del cerebro, tal como

la corteza insular (Figura IV.1.4). La corteza insular (CI) ocupa la pared medial del surco lateral, línea de referencia que divide el lóbulo temporal del frontal y se extiende a lo largo del surco rinal, otra línea de referencia encontrada dentro del lóbulo temporal. Esta región del cerebro constituye la corteza gustativa primaria (Dudai 2002b) y ha sido postulada como un núcleo clave en la conducta de detección de novedad al gusto y en la codificación de memorias gustativas (Kiefer y Braun 1977, Rosenblum et al.1993 y 1997, Schafe y Bernstein 1998). Se han identificado mecanismos moleculares en la CI que son promovidos específicamente por exposición a un gusto novedoso, tales como la estimulación de receptores de glutamato del tipo NMDA y de receptores muscarínicos de acetilcolina, que promueven la activación de la vía de señalización de las MAPKs y la consecuente inducción de la expresión génica dependiente de Elk-1 (Rosenblum et al.1997, Berman et al.1998, Berman et al.2000). Se ha propuesto que estos mecanismos podrían estar codificando el evento, la saliencia del estímulo e iniciando el almacenamiento de la memoria gustativa de largo término en la CI (Berman et al.2000). Por otro lado, algunos estudios en humanos demostraron la participación de la CI en el reconocimiento de caras, el reconocimiento de un estímulo a través de la modalidad táctil, y en la formación de memoria de trabajo (Paller et al.2003, Reed y Means 2004). Los resultados en modelos animales fueron similares, reportando que la CI está implicada en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos y en la adquisición y consolidación de la memoria contextual (Bermudez-Rattoni et al.2005, Miranda y Bermudez-Rattoni 2007). A partir de estos resultados, se postuló que la CI juega un rol importante en la memoria declarativa.

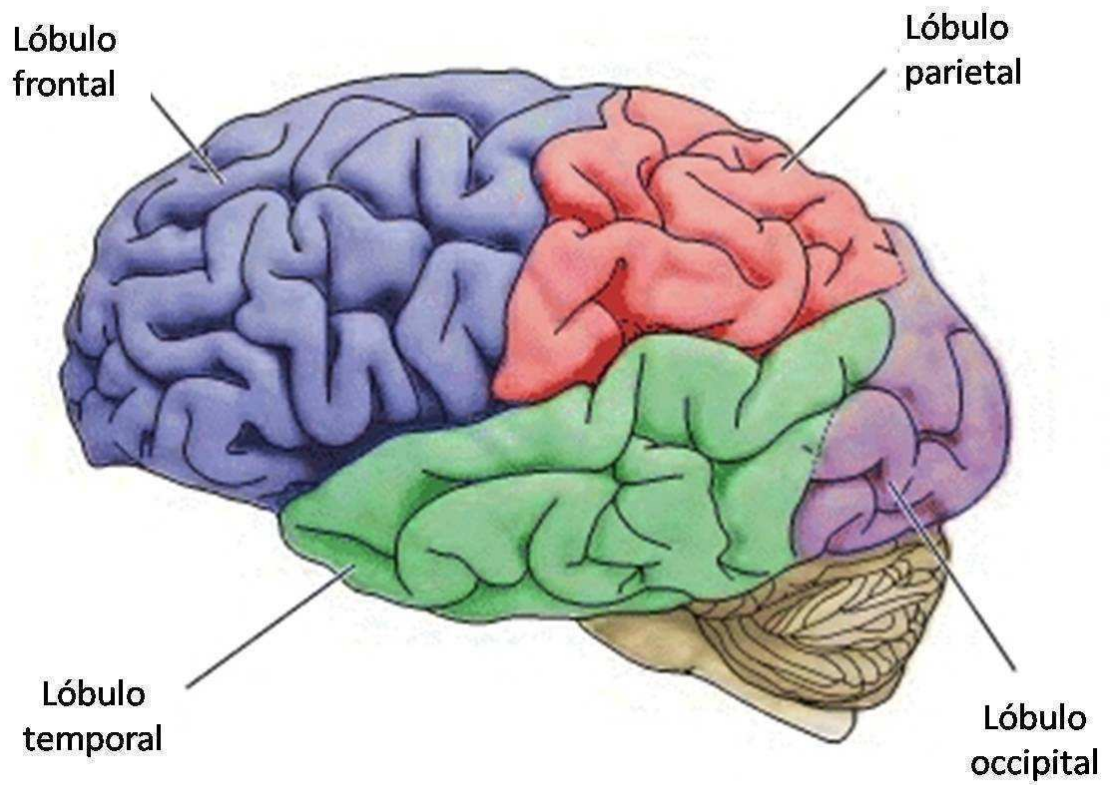


Figura IV.1.3: Dibujo de la vista lateral y superficial de la corteza cerebral. Se distinguen 4 de sus principales regiones: lóbulos frontal, parietal, temporal y occipital. (Gráfico extraído desde Purves et al.2001).

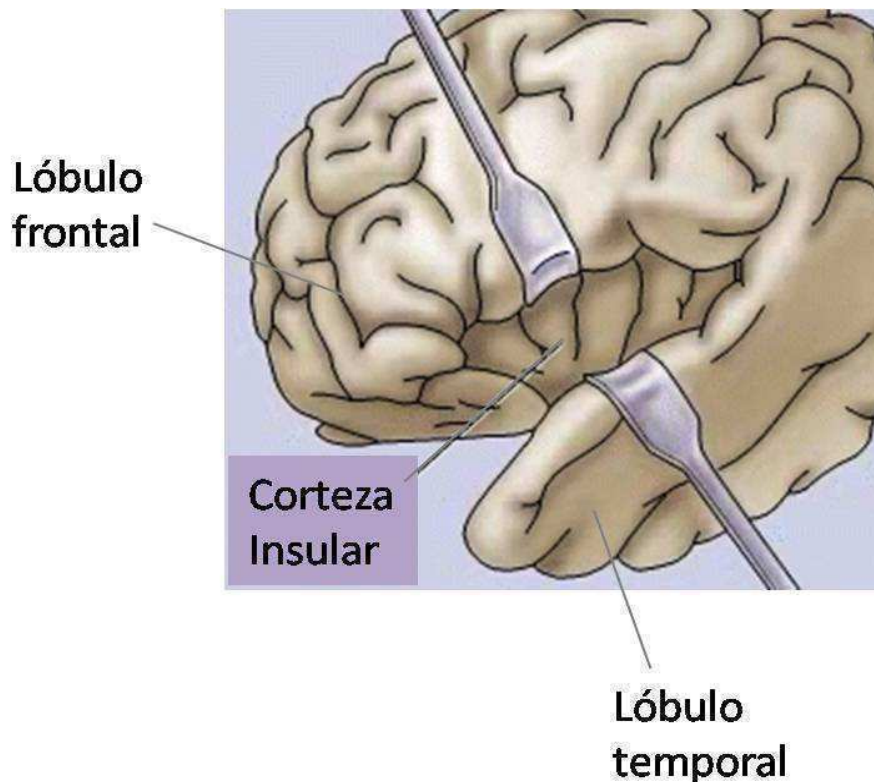


Figura IV.1.4: Dibujo de la vista lateral del cerebro, evidenciando la localización de la corteza insular al separar el lóbulo frontal del lóbulo temporal a través del surco lateral. (Gráfico extraído desde Purves et al.2001).

Muchas áreas de la corteza cerebral se dedican principalmente al procesamiento de la información sensorial de alguna modalidad o de comandos motores. Estas áreas son conocidas como cortezas sensorial o motora, y primaria, secundaria o terciaria, dependiendo del nivel de procesamiento de la información que lleven a cabo (Kandel, Schwartz y Jesell 1995). Circundantes a estas áreas, existen tres regiones de la corteza cerebral denominadas *áreas de asociación*. En primates, estas regiones ocupan una porción muy grande de la corteza cerebral. Se postula que su función preponderante es integrar información diversa proveniente de las áreas sensoriales y motoras llevando a cabo alguna función cognitiva: el *área de asociación pre-frontal* participa en la planificación y ejecución de tareas motoras complejas, el *área de asociación parietal-temporal-occipital* en la

integración de las funciones sensoriales y en el lenguaje, y el *área de asociación límbica* en la memoria y en los aspectos emocionales y motivacionales de la conducta. Este área de asociación límbica se localiza en la superficie medial y ventral de lóbulo frontal, medial del lóbulo parietal y anterior del lóbulo temporal. En ésta última subregión del área límbica se encuentra la corteza para-hipocampal, la cual recibe proyecciones desde áreas sensoriales y envía proyecciones a otras regiones corticales, tal como la corteza prefrontal. Esta última, a su vez, se encuentra directamente relacionada con el lóbulo límbico, es decir, la amígdala y el hipocampo.

El hipocampo es una estructura interna de los hemisferios cerebrales. Está integrado por (desde su interior hacia la porción más externa): el giro dentado, las áreas CA1 y CA3 y el complejo subicular o subiculum. Junto con las regiones corticales adyacentes, denominadas cortezas entorrinal, perirrinal y postrinal o parahipocampal (Dudai 2002b, Squire y Kandel 1999), conforman el denominado *LT medial* (Figura IV.1.5).

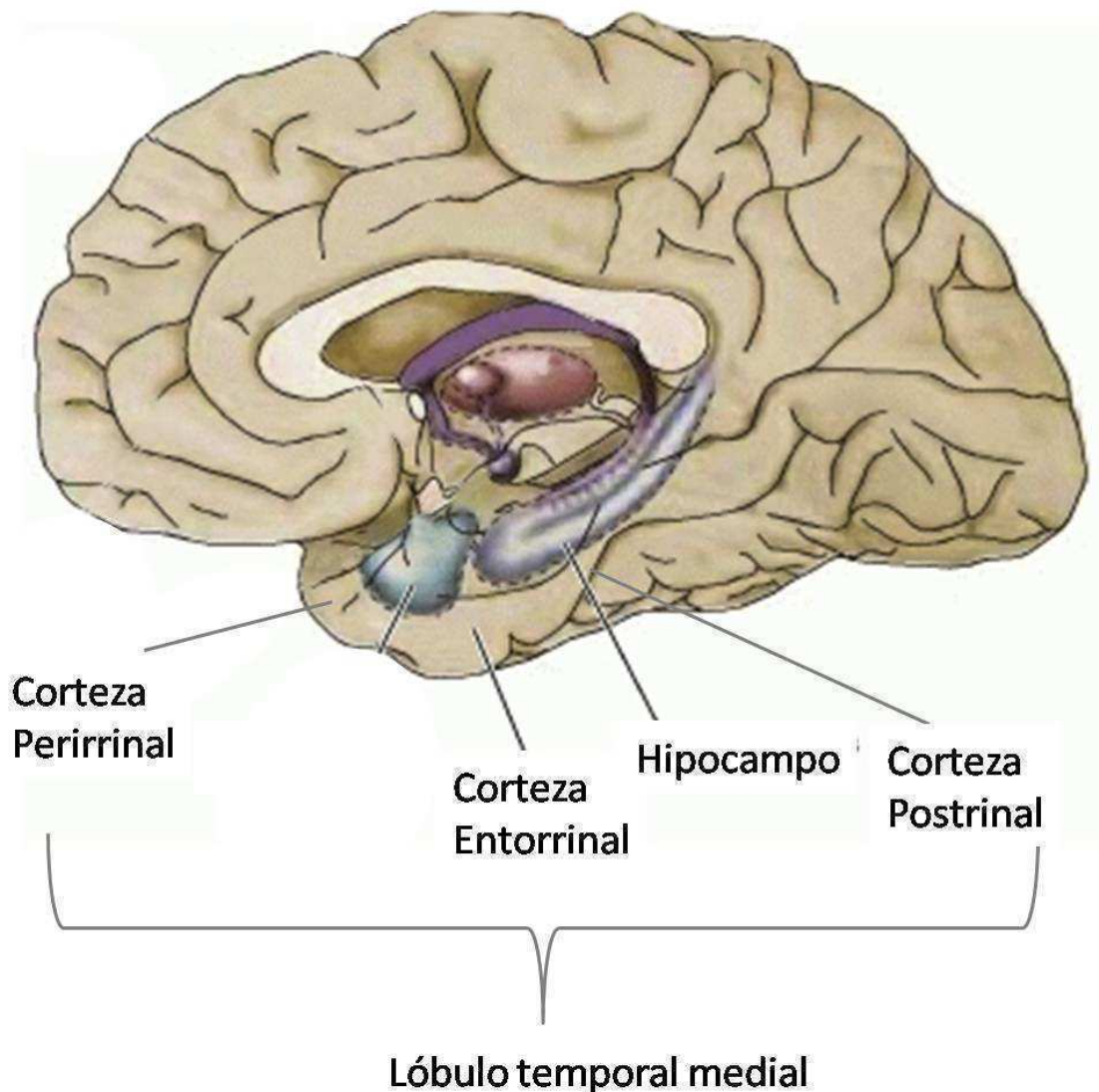


Figura IV.1.5: Vista lateral interna del cerebro, exhibiendo las estructuras que conforman el lóbulo temporal medial. (Gráfico extraído desde Purves et al.2001).

El hipocampo se interconecta directa e indirectamente con múltiples áreas corticales y subcorticales. La conectividad de la corteza circundante al hipocampo con otras áreas fuera del LT medial se ha descrito en primates y en roedores (Suzuki and Amaral 1994, Burwell y Amaral 1998). Debido a su alta conectividad con numerosas áreas del cerebro, se ha sugerido que el hipocampo funciona como

un área de operaciones globales durante el proceso de memoria (Dudai 2002b). De manera tal que, allí se generarían y procesarían representaciones internas que serían almacenadas parcial o totalmente y temporaria o permanentemente. A su vez, esta estructura ha sido ampliamente implicada en funciones específicas, tal como el almacenamiento de la información contextual durante la formación de la memoria (O'Keefe and Nadel, 1978, Pennick y Solomon 1991, Holland y Bouton 1999, Chun y Phelps 1999, Phillips y LeDoux 1992). Esta función también se condice con su anatomía, ya que el *contexto* es referido a la combinación de características provenientes de distintas modalidades sensoriales (Dudai 2002b), y tal información podría arribar al hipocampo desde las conexiones con las regiones de la corteza que procesan información sensorial. Un concepto importante a tener en cuenta cuando mencionamos la detección de un lugar determinado o contexto, es que tal función implica una representación configuracional o gestáltica que va más allá de los estímulos individuales (Fanselow 2009).

IV.1.4 Memoria de reconocimiento y su sustrato neuroanatómico

Un ejemplo de memoria declarativa ampliamente investigado es la memoria de *reconocimiento*, es decir, la habilidad para juzgar si un ítem recientemente encontrado, sea un objeto o un episodio, ya había sido previamente experimentado (Squire et al.2007). Se ha definido que la memoria de reconocimiento consiste de, al menos, dos componentes o subprocesos: *recolección* (en inglés, *recollection*) y *familiaridad*. El componente de recolección implica recordar detalles contextuales espacio-temporales específicos de la experiencia previa, en la cual se tuvo el primer encuentro con el ítem en cuestión. El componente de familiaridad se refiere a la capacidad de reconocer que un estímulo fue previamente presentado sin tener ninguna información adicional del episodio de aprendizaje. Estos dos componentes establecen dos rutas distintas para llegar al reconocimiento de un ítem. Por ejemplo, imaginemos que encontramos a una persona en la góndola del

supermercado. Esta persona se da vuelta y nosotros “le vemos cara conocida” pero no podemos advertir quién es. Estamos haciendo uso del componente de *familiaridad* de nuestra memoria de reconocimiento. Sin embargo, si al mismo tiempo que pensamos “yo a esta persona la conozco” nos damos cuenta de que es el vecino del 2 “A”, Felipe, a quien conocimos en una reunión de consorcio, un día lluvioso de verano, estaremos haciendo uso del componente de recolección.

Como ya se mencionó en el capítulo I, durante la formación de la memoria la información adquirida es codificada y almacenada mediante una representación interna en los circuitos neuronales, permaneciendo consolidada y potencialmente evocable para ser utilizada por el individuo. Entonces, como todo sistema de memoria, el sistema neuronal que subyace a la memoria de reconocimiento debe contener circuitos que almacenen la información y que sean capaces de evocarla (Dudai 2002b). Ha sido propuesta la hipótesis de que los dos subprocesos involucrados en la memoria de reconocimiento se valen de diferentes sustratos neuroanatómicos: el aspecto de recolección dependería de hipocampo y el aspecto de familiaridad dependería de la corteza perirrinal (Brown y Aggleton 2001). Mientras muchos trabajos apoyaron esta idea (Rugg y Yonelinas 2003, Aggleton y Brown 2006, Eichenbaum et al. 2007), otros estudios promovieron nuevas formulaciones sobre la naturaleza de la memoria de reconocimiento y su base neuroanatómico-funcional (Squire et al. 2004, Wixted 2007), siendo hoy ambos tópicos materia de debate.

Por otro lado, contrariamente a otras clases de memoria, la memoria de reconocimiento debe contener un sistema que le permita comparar el ítem recientemente encontrado con una representación interna almacenada y, en consecuencia, detectar familiaridad o novedad (Dudai 2002b). Se ha sugerido la existencia de un circuito de retroalimentación entre el tallo cerebral y la región talamo-cortical como elemento *comparador*, que lleva a cabo esta función (Berman et al. 2000).

Con respecto a la terminología a utilizar en este campo de estudio de la memoria, cabe aclarar aquí las diferencias entre el término recuperación (en inglés, *recall*, evocación (en inglés, *retrieval*) y el término reconocimiento (en inglés, *recognition*). Se suele definir como *recuperación* al proceso mnésico que involucra a la activación o reconstrucción de la representación interna de un ítem en ausencia del mismo, mientras que *reconocimiento* involucra un proceso de búsqueda en las representaciones internas de un ítem que es actualmente presentado. Ambos procesos mnésicos dependen de la *evocación* (Capítulo I) de detalles adicionales del ítem o contextuales (*recolección*), pero la memoria de reconocimiento también obedece al aspecto de *familiaridad*. Mientras que los sistemas o procesos que subyacen a ambos tipos de memoria pueden ser similares, la situación que distingue entre ambos conceptos es la evaluación de la retención de la información, evocada de manera diferente en cada caso.

IV.1.5 Paradigma de reconocimiento de objeto novedoso

El paradigma de reconocimiento de objeto novedoso (NOR, por sus siglas en inglés *novel object recognition*) es un modelo de memoria no declarativa ampliamente utilizado. Este paradigma comportamental toma ventaja, básicamente, de dos características de los roedores: la tendencia natural de estos animales a explorar un objeto novedoso, el cual, se asume, no tiene significancia particular para el animal y que nunca ha sido asociado con un refuerzo, y la preferencia innata a investigar un objeto novedoso por sobre un objeto familiar. Tanto las ratas como los ratones se aproximan ávidamente a los objetos y los exploran a través de tocarlos y olerlos, mediante el contacto con sus patas delanteras, vibrisas y nariz (Aggleton 1985). Este comportamiento puede ser fácilmente cuantificado y utilizado para estudiar la memoria de reconocimiento,

tanto en su forma simple como en modelos más complejos que tienen en cuenta características espaciales, temporales y episódicas (Dere et al.2007). Ha sido demostrado que los roedores son capaces de diferenciar entre un objeto novedoso de un objeto familiar (versión simple), detectar un error o discrepancia entre la localización de un objeto familiar en el presente y en el pasado (versión espacial) y de discriminar diferentes objetos en base a su novedad relativa (versión temporal).

Una gran ventaja del uso de éste sobre otros paradigmas de memoria de reconocimiento ampliamente utilizados, tales como tareas que implican aprendizaje relacional como igualación o distinción retardada entre estímulos (en inglés, *classical delayed matching o non-matching to sample*, respectivamente) (Mumby et al. 1996, Duva et al.1997, Prusky et al. 2004) reside en el hecho de no requerir de la instrucción ni de la retención de reglas ni de sesiones de entrenamiento múltiples, sino que utiliza la medición de una conducta espontánea del animal, haciendo que la fase de aprendizaje sea corta y única. Además, el uso de este modelo es más apropiado para aproximaciones que utilizan intervenciones farmacológicas y/o genéticas, ya que no afecta el nivel de estrés, ansiedad o atención (en inglés, *arousal*) del animal, que confundiría los efectos de una droga o de la eliminación (en inglés, *knock-out*) de un gen. Tal es el caso de tareas basadas en refuerzos negativos de la conducta o en establecer asociaciones con un estímulo incondicionado negativo, siendo ejemplos los paradigmas de evitación activa o pasiva a un choque eléctrico o de condicionamiento al miedo contextual o de clave (Pinel y Treit 1978, DeBoer y Koolhaas 2003, LeDoux 1996, Rogan y leDoux 1996). Más aún, ya que se trata de un paradigma no aversivo, se lo puede utilizar para evaluar los efectos de la liberación de hormonas relacionadas con el estrés en la formación de la memoria (Maroun y Akirav 2008). Además, si una manipulación experimental produce algún efecto en la regulación del peso corporal, la apetencia o valencia epicúrea, el apetito, o el proceso de recompensa y refuerzo, causaría que aquellos paradigmas utilizando al alimento como refuerzo no sean convenientes para observar cambios debido a las intervenciones, relacionados con el aprendizaje y la memoria. De igual manera, si las aproximaciones experimentales pueden

producir efectos en la percepción del dolor, susceptibilidad al estrés, ansiedad, o en la termorregulación, dificultan el uso de tareas motivadas por choque eléctrico o de navegación en el laberinto de agua o *water maze* (Morris 1981). En comparación con otros modelos de memoria, en el NOR los efectos inespecíficos de los diferentes tratamientos pueden ser fácilmente detectados por un análisis detallado de la conducta del animal durante la sesión de entrenamiento, en relación a la frecuencia de contactos con los objetos, el tiempo que transcurre explorando los objetos, número de “paradas en dos patas” (en inglés, *rearings*), posturas anormales, defecación, etc.

En su versión más simple, la tarea desarrollada en el paradigma de NOR para el modelo de ratón consiste en una sesión de entrenamiento, de 2 a 15 minutos de duración, durante la cual el animal explora dos objetos iguales en un contexto familiar, y una sesión de evaluación de 5 minutos de duración, en la cual el animal es colocado en el mismo contexto y enfrentado a dos objetos distintos entre sí, uno familiar (ya explorado durante la sesión de entrenamiento) y uno novedoso (Figura IV.2.1). De esta manera, durante la sesión de evaluación los animales recorren más tiempo explorando el objeto novedoso, sugiriendo que el objeto familiar fue reconocido (Dix y Aggleton 1999) (Figura IV.2.2). La respuesta del animal en la sesión de evaluación dependerá de la duración de la sesión de entrenamiento y del intervalo entre sesiones (de minutos a horas para evaluar MCT, mayor a 24 horas para evaluar MLT).

Se ha postulado que el paradigma de NOR es un tipo de tarea que depende substancialmente del componente de *familiaridad* de la memoria de reconocimiento, mediante el cual el objeto es reconocido independientemente del contexto. Por lo tanto, muchos trabajos inicialmente mostraron evidencias en favor de la hipótesis indicando que el hipocampo no participaría en este tipo de tarea, mientras que sí lo harían otras áreas del lóbulo temporal, tal como la corteza insular (Brown y Xiang 1998, Eldridge et al.2000). Sin embargo, actualmente existen controversias al respecto, con algunos estudios manifestándose en favor (Bermudez-Rattoni et al.2005, Balderas et al.2008) y otros en contra, éstos últimos

presentando al hipocampo como un área funcional en este paradigma (Kelly et al.2003, Rossato et al.2007, Squire et al.2007).

IV.1.6 Diferencias en el aprendizaje y tipos de memoria

En este modelo de memoria en un vertebrado, *Mus musculus*, al igual que en el modelo de MCS en el invertebrado *Chasmagnathus*, se pueden disociar entre memorias de corto y largo término en base a sus requerimientos de inducción durante el período de aprendizaje, presentado en la sesión de entrenamiento, y según su duración, manifestada por la extensión del intervalo entre las sesiones de entrenamiento y evaluación. Un protocolo de entrenamiento de 10 minutos (estándar) induce una MCT (90 minutos post entrenamiento) y una MLT (24 horas post entrenamiento), que no puede ser mejorada por la administración de inhibidores de KDACs (Stefanko et al.2009). Por otro lado, una sesión de entrenamiento de 3 minutos (débil) no induce una MCT (al menos, evaluada a 60 y 90 minutos post entrenamiento) ni MLT (24 horas). Sin embargo, se ha demostrado que este protocolo de entrenamiento débil sí puede ser facilitado para la inducción de una MLT, pero no de una MCT, por administración de inhibidores de fosfodiesterasas (Bourtchouladze et al.2003) o de KDACs inmediatamente post entrenamiento (Stefanko et al.2009), ambos suministrados vía intra-peritoneal. Además, un protocolo de entrenamiento de 15 minutos (fuerte) induce tanto MCT como MLT. Esta MLT requiere de la activación del factor de transcripción CREB (por sus siglas en inglés, *cAMP response binding element*) (Pittenger et al.2002). Con respecto a los mecanismos epigenéticos implicados en la memoria inducida por este protocolo de entrenamiento sólo se han realizado estudios del rol de la actividad acetiladora de lisinas (KAT) de CBP (por sus siglas en inglés, *CREB binding protein*) demostrando que mutaciones que afectan la actividad acetilante de esta proteína perturban la formación de la MLT inducida por 15 minutos de entrenamiento (Bourtchouladze et al.2003, Alarcon et al.2004). En un estudio

realizado en ratones mutantes se observó que la MLT inducida por un protocolo fuerte es afectada por una mutación en CBP que no permite a esta proteína ser reclutada por factores de transcripción como CREB y c-Myb, pero que mantiene su actividad de KAT intacta (Wood et al.2006a). Otra proteína con funciones similares a CBP, p300, ha sido involucrada también en la memoria de reconocimiento de largo término inducida por un entrenamiento de 15 minutos (Oliveira et al.2007).

IV.1.7 Mecanismos moleculares involucrados en la consolidación de la memoria de reconocimiento

Como ya se mencionó en la sección IV.1.5, existen controversias acerca de cuáles son las estructuras cerebrales que subyacen a la memoria de reconocimiento y cuál es su función en las distintas fases o subprocesos de la misma. De manera que la pregunta sobre cuáles son los mecanismos moleculares empleados por dicho sistema neuronal en sus diferentes funciones durante la formación de este modelo de memoria declarativa se encuentra abordada conjuntamente con el estudio del rol de estas áreas del cerebro.

Diferentes aproximaciones experimentales han evidenciado que la consolidación de la memoria de reconocimiento requiere de receptores de glutamato del tipo N-metil D-aspartato (NMDA-R), tanto en hipocampo (Baker y Kim 2002, Kemp y Vaughan 2004) como en corteza perirrinal (Winters y Bussey 2005), receptores de canabinoides (Maccarrone et al.2002), receptores de acetilcolina del tipo muscarínicos en la corteza insular (Bermudez-Rattoni et al.2005), transportador de GABA tipo 1 (Hu et al.2004), cascadas de señalización tales como la vía mediada por AMP cíclico en distintas áreas del cerebro (Bozon et al.2004) o en regiones más específicas como el hipocampo (Pineda et al.2004) o el cerebro anterior (Wang et al.2004) , la vía de las quinasas activadas por mitogenos (MAPKs, por sus siglas en inglés, *mitogen activated protein kinase*) en hipocampo

(Kelly et al.2003), el factor de transcripción CREB en distintas áreas del cerebro (Bourtchouladze et al.2003, Pittenger et al.2002), el cofactor con actividad de KAT CBP y la quinasa dependiente de Ca^{2+} y Calmodulina (CaMKII) (Miller et al.2002). Además, se ha evidenciado que la consolidación de esta memoria puede ser modulada por estrés (Maroun y Akirav 2008).

IV.1.8 Mecanismos epigenéticos y la consolidación de la memoria de reconocimiento

Hasta la fecha de escritura de esta tesis, pocos estudios han evidenciado la participación de mecanismos epigenéticos en la memoria de reconocimiento. Por un lado, la actividad de la proteína acetilasa de lisinas (KATs) CBP en la consolidación de la memoria de reconocimiento fue estudiada mediante el uso de ratones genéticamente modificados en el gen de *cbp* en el paradigma de *NOR*. Esta proteína lleva un rol doble en la activación de la transcripción: 1) ejerce como proteína de andamiaje que interactúa directamente con diversos factores de transcripción y varios componentes del complejo multi-proteico de la polimerasa de ARN II (en inglés *RNA Pol II*) y, de esta manera, promueve la incorporación de la maquinaria de transcripción al promotor, 2) actúa como KAT, contribuyendo de este modo a la activación transcripcional mediante la acetilación de histonas y el desarmado de la estructura de la cromatina. Estudios realizados en ratones que expresaban esta proteína con el dominio con actividad KAT truncado, demostraron que esta región de CBP es necesaria para la consolidación de la memoria de reconocimiento (Korzus et al.2004). Otros trabajos utilizando ratones que expresaban el gen de *cbp* mutado, cuya modificación afectó la región amino-terminal de la proteína, sugirieron que CBP es reclutada al ADN mediante la unión a factores de transcripción que interactúan con el cofactor a través de esa porción de la proteína, y que este mecanismo es necesario para la formación de la memoria de reconocimiento de objetos (Bourtchouladze et al.2003, Wood et al.2005). La

anulación (o *knock out*) del gen de *cbp* es letal, pero la *heterocigosis* del alelo nulo en ratones no afecta los niveles normales de actividad, motivación, ansiedad y memoria a corto término, aunque sí se ve impedida la formación de la MLT, tal como la consolidación de la memoria de reconocimiento (Alarcon et al.2004). En particular, un trabajo donde se evalúa la formación de la memoria de reconocimiento de objetos en ratones llevando el gen de *cbp* con una mutación que afecta el dominio de unión de este cofactor a CREB, muestra que esta interacción es importante para la consolidación de esta memoria (Wood et al.2006a).

Por otra parte, un estudio reciente ha demostrado que la inhibición de las desacetilasas, KDACs, mejora la memoria de reconocimiento evaluada en el paradigma de NOR (Stefanko et al.2009). Este trabajo muestra que la memoria de reconocimiento puede ser facilitada a una memoria de largo término cuando la administración del inhibidor de KDACs es proporcionada inmediatamente después de un protocolo de entrenamiento débil, pero no se observa mejora de la MLT inducida por un protocolo de entrenamiento estándar.

El presente capítulo tiene como objetivo estudiar los cambios en la acetilación de histonas durante la formación de la memoria de reconocimiento. Este modelo de marcado epigenético de memoria se utilizó también para investigar el rol de ciertas regiones del cerebro en este paradigma de memoria. El objetivo último fue encontrar evidencias que apoyen la hipótesis de la existencia de un código epigenético inherente a la consolidación de la memoria, conservado a lo largo de la evolución.

IV.2 Materiales y métodos

IV.2.1 Animales

Los animales utilizados fueron ratones C57 de la cepa BL/6J (Figura IV.2.1a), machos, de 6 a 9 semanas de edad y de un peso aproximado entre 25 a 30 gramos. Estos ratones eran provistos por el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, perteneciente a la Universidad Nacional de La Plata o por el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales perteneciente a la Universidad de Buenos Aires. En nuestro laboratorio, estos animales fueron alojados en cajas formando grupos, cómo máximo, de 4 individuos o, en el caso de que hayan sido quirúrgicamente canulados, eran albergados individualmente. Estas cajas de alojamiento contenían en su interior viruta, y en ellas se les proveía a los ratones de agua y comida *ad libitum*. Permanecían en todo momento en el cuarto de alojamiento, mantenidos en un ciclo de 12 horas de luz – 12 horas de oscuridad (luz de 8:00hs – 20:00hs). Sólo fueron llevados al cuarto de experimentación en los momentos en los se llevaba a cabo la experiencia o su sacrificio. Tanto el cuarto de alojamiento como de experimentación fueron mantenidos a una temperatura comprendida entre los 21 y 23 °C.

IV.2.2 Dispositivo de entrenamiento y evaluación para el paradigma de reconocimiento de objeto novedoso

La arena experimental consistió de una caja de madera (IV.2.1b), abierta en su parte superior, de paredes blancas (30 x 23 x 21.5 centímetros), que contenía en su interior viruta de iguales características a aquélla contenida en las cajas de alojamiento. Las sesiones de entrenamiento y evaluación fueron ambas filmadas mediante un cámara tipo web Logitech modelo Tesseract 2.0/3.7 2MP autofocus, colocada a 30 centímetros por arriba de la arena experimental. Luego, ambas sesiones fueron analizadas para determinar el tiempo de exploración de los objetos.

a



b



Figura IV.2.1: a) Ejemplares de macho adulto de la especie *Mus musculus*. B) Las cajas utilizadas para el paradigma de reconocimiento de objeto novedoso, conteniendo los objetos. A la izquierda, se observan las cajas con la disposición de los objetos en el entrenamiento. A la derecha, las cajas con los objetos en la disposición para realizar la sesión de evaluación.

IV.2.3 Procedimiento experimental

Los **enfoques metodológicos** utilizados para el desarrollo de este capítulo fueron similares a los descriptos en el Capítulo II y III. Las variaciones y especificaciones son detalladas a continuación.

Diseño experimental general

El paradigma de reconocimiento de objeto novedoso (en inglés *novel object recognition, NOR*) consiste en 4 sesiones (Wood et al.2006):

Sesión de manipulación (en inglés, *handling*): En los días previos a la sesión de entrenamiento los ratones fueron sometidos a una sesión de *handling*, la cual consiste en sostener al animal en ambas manos durante dos a tres minutos, durante dos a tres días de manera consecutiva, para que el sujeto experimental tome contacto con el experimentador, se familiarice con éste y, de esta manera, disminuya su nivel de estrés al momento de la manipulación del mismo durante las sesiones de entrenamiento y evaluación.

Sesión de habituación: Los animales fueron habituados a la arena experimental diariamente, durante tres días previos a la sesión de entrenamiento. Esta sesión consistió en colocar a cada animal en la caja de experimentación, durante cinco minutos cada día, sin ningún objeto presente. Durante esta sesión el animal se familiariza con el contexto. De igual modo que la sesión de *handling*, esta sesión disminuye el nivel de estrés por novedad de contexto al momento del entrenamiento (Okuda et al.2004). Además, durante la sesión de habituación el animal realiza el aprendizaje del nuevo contexto, separándolo temporalmente, de esta manera, del aprendizaje de los objetos durante las sesiones de entrenamiento y evaluación.

Sesión de entrenamiento: Los ratones fueron colocados en la arena experimental con dos objetos idénticos. Los objetos utilizados fueron vasos de precipitados de 100ml o bloques azules de juguete marca “Rasti”, ambos de tamaño similar (Figura IV.2.1b). Se les permitió explorar los objetos por 3 minutos (entrenamiento débil), 10 minutos (entrenamiento estándar) o 15 minutos (entrenamiento fuerte), según el experimento. Entre ensayos, los objetos son fregados con un papel embebido en alcohol 96° (marca Sanicol), para cerciorarse de que no haya señales olfativas presentes.

Sesión de evaluación: La retención de la memoria de largo término fue evaluada a 24 horas post entrenamiento. Durante la fase de evaluación, los ratones fueron reintroducidos en la arena experimental y se los enfrentó a 2 objetos distintos entre sí. Se les permitió explorar ambos objetos por 5 minutos. Para esta sesión, se utilizaron un objeto idéntico a aquellos a los cuales el ratón fue expuesto previamente durante la sesión de entrenamiento (el objeto familiar) y un objeto distinto (el objeto novedoso), los cuales eran expuestos en las mismas localizaciones de la arena experimental que en la sesión de entrenamiento. La localización del objeto novedoso fue intercambiada entre izquierda y derecha en distintos animales, de manera tal de evitar preferencias de lugar durante la sesión de evaluación. Tanto el entrenamiento y como la evaluación fueron filmados para ser analizados posteriormente.

El período entre sesiones fue de 24 horas.

Análisis de datos general

La actividad exploratorio de los objetos realizada por cada animal se registró y se grabó mediante un sistema de videocámara (cámara estilo web marca Logitech modelo Tessar 2.0/3.7 2MP autofocus), el cual estaba conectado a una computadora (marca Samsung), utilizando el programa Logitech Quicktime ®. Luego, los registros eran monitoreados para la cuantificación de la exploración de los animales. Para determinar la cantidad de tiempo que un dado ratón pasó explorando los objetos, se estableció como *exploración* a la acción de orientar su cabeza hacia el objeto a una distancia de 1 centímetro o cuando su nariz toca el objeto. No se tuvo en cuenta cuando el animal se posaba sobre el objeto. Durante la fase de entrenamiento se determinó el tiempo de exploración total y el tiempo de exploración porcentual de los objetos a izquierda y derecha de la posición inicial del ratón. Durante la sesión de evaluación se determinó el tiempo de exploración total y de cada objeto, y se calculó el tiempo relativo de exploración del objeto novedoso, expresado mediante un índice de discriminación: $ID = (t_{\text{novedoso}} - t_{\text{familiar}}) / (t_{\text{novedoso}} + t_{\text{familiar}}) (x 100\%)$. Se calcularon los valores promedio de los ID de los distintos grupos de animales. Para determinar diferencias significativas en la retención de la MLT, se realizaron comparaciones estadísticas entre los ID promedio de los grupos provenientes de los distintos tratamientos, usando la prueba T.

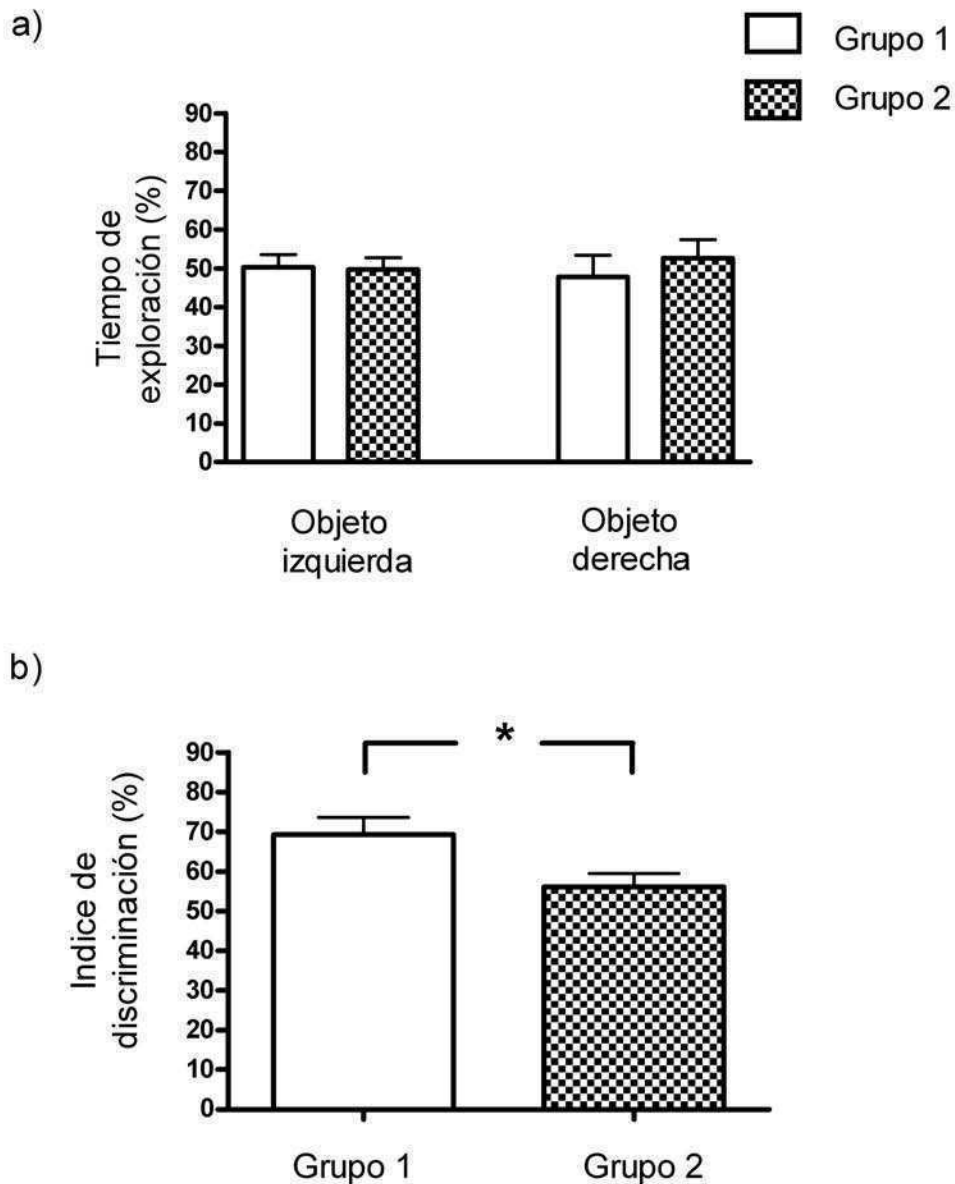


Figura IV.2.2. Paradigma de reconocimiento de objeto novedoso. a) Sesión de entrenamiento estándar. Se cuantificó el tiempo de exploración de los objetos a izquierda y derecha del animal, idénticos entre sí. Se calculó el porcentaje de tiempo que los ratones transcurren explorando cada objeto en relación al total de tiempo de exploración. b) Sesión de evaluación. El índice de discriminación se calculó como se describe en el texto.

Experimentos de análisis comportamental

Determinación de parámetros del entrenamiento

Diseño experimental

El experimento constó de dos grupos de animales, grupo *3 min* y grupo *15 min*. Todos los animales recibieron las siguientes sesiones en el siguiente orden: sesión de handling (2 días consecutivos), sesión de habituación (3 minutos durante 3 días consecutivos), sesión de entrenamiento (3 minutos para el grupo *3 min* y 15 minutos para el grupo *15 min*) y sesión de evaluación. El período entre sesiones fue de 24 horas. El análisis de los datos se realizó como ya se ha descrito anteriormente.

Experimentos de intervención farmacológica y análisis comportamental

Estudio del papel de distintas áreas del cerebro en el paradigma de NOR. Rol del factor de transcripción NF- κ B en la memoria de reconocimiento.

Diseño experimental

Cada experimento de esta serie constó de 5 sesiones, en el siguiente orden: *sesión de canulación*, *sesión de handling*, *sesión de habituación*, *sesión de entrenamiento* y *sesión de evaluación*.

Sesión de canulación: Los ratones fueron canulados el día previo al comienzo del experimento. Para la canulación se utilizó un atlas estereotáxico de ratón (Paxinos y Franklin 2001) y un aparato estereotáxico. La referencia externa utilizada fue el *bregma*, que es el punto de unión de las suturas sagital y coronal del cráneo (Figura IV.2.2). Como primer paso, cada animal fue anestesiado por medio de una inyección intraperitoneal de ketamina (marca Ketafine, concentración 5% P/V, 70 μ l) y clorhidrato de xilacina (marca Xilacina, concentración 20 mg/ml, 10 μ l). Una vez evaluado que el animal se encontraba totalmente anestesiado, mediante el ejercicio de una pequeña presión en la cola y la no detección de movimiento, se inició el procedimiento de implantación de las cánulas guía. Se colocó al animal en el aparato estereotáxico. Este dispositivo incluye un sustentáculo

para la cabeza que mantiene el cráneo del animal fijo y en la orientación adecuada, un soporte para la cánula guía, y un mecanismo calibrado que permite desplazar este soporte las distancias calculadas, a lo largo de los tres ejes espaciales: anterior-posterior (AP), dorsal-ventral (DV), y lateral-medial (LM). Inmediatamente después de colocar al animal, se cortó el cuero cabelludo, dejando expuesto el cráneo y permitiendo observar el bregma. Se situó la cánula guía en el punto de referencia y se desplazó la misma a lo largo de la distancia adecuada en los ejes AP y LM, hasta situarla en la región blanco del cerebro. Se marcaron puntos en el cráneo del animal con un lápiz marcador en los sitios determinados por las coordenadas AP y ML y se perforó el cráneo en tales puntos utilizando un taladro (marca Dremel, modelo Multipro 395PZ; fresa para trepanado: número de punta 105). En cada uno de los sitios perforados se instaló la cánula guía y se descendió la misma a través del tejido nervioso hasta la profundidad adecuada, utilizando la coordenada DV. De esta manera, la punta de la cánula se localizó en el lugar adecuado del cerebro. Las cánulas fueron fijadas al cerebro con un pegamento conteniendo hidróxido de calcio marca DYCAL. Las cánulas guía eran agujas 23 *gauge* cortadas a una longitud de 8mm y con extremos casi romos. Los animales fueron canulados unilateralmente en el ventrículo lateral izquierdo (para la inyección ICV), y bilateralmente en la corteza insular (para la inyección ICTI) o en el hipocampo dorsal (para la inyección IHP). Las coordenadas utilizadas para proceder con la canulación fueron: para ICV: AP-0.4, ML+1.0, DV 2.1; para ICTI: AP+1.7, ML±2.5, DV 3.5; para IHP: AP-1.9, ML±1.2, DV 1.2 (Paxinos & Franklin 2001, Figuras IV.2.3, IV.2.4 y IV.2.5). Luego del período de recuperación de los animales, a las 24 horas post operación se iniciaron los experimentos conductuales. Al cabo de cada experimento, los animales de los distintos grupos fueron sacrificados y los cerebros fueron extraídos cuidadosamente e inmediatamente fijados en PFA 4% (paraformaldehído), procediéndose al chequeo de la localización neuroanatómica de las cánulas mediante el análisis histológico.

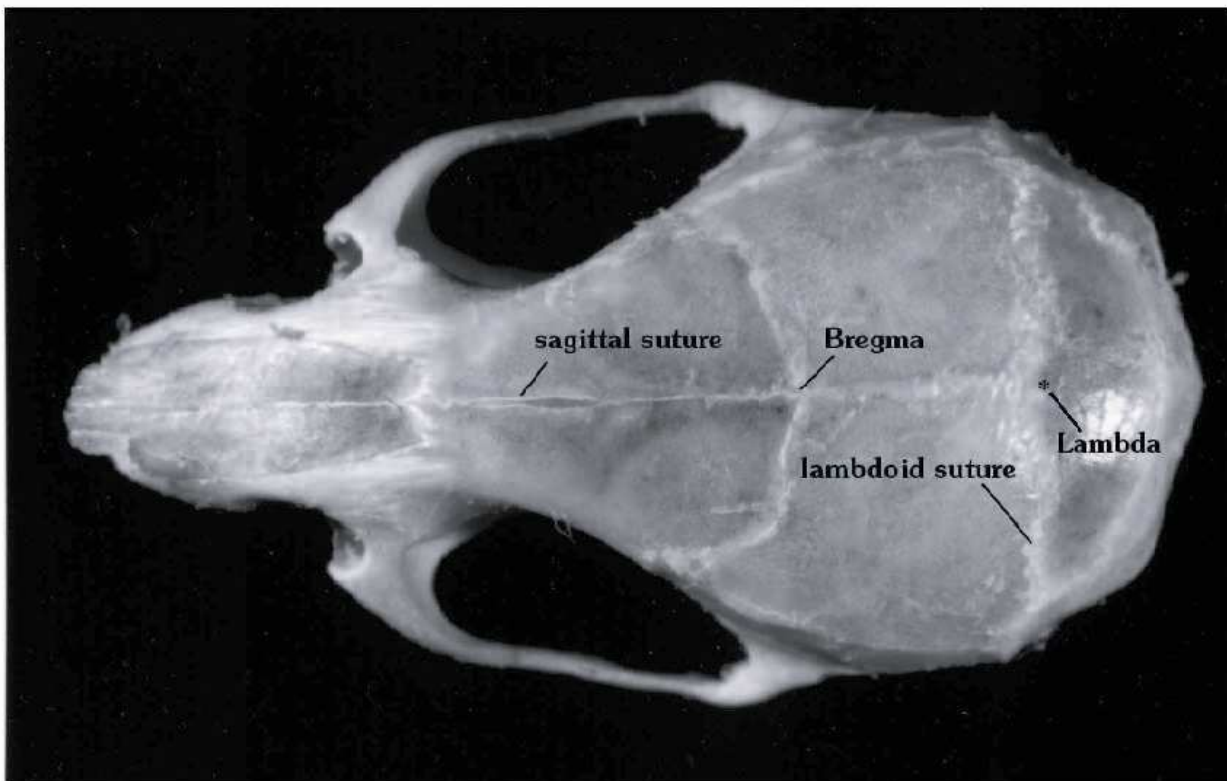


Figura IV.2.2: Diagrama del cráneo de ratón (Paxinos y Franklin 2001). La superficie dorsal del cráneo de ratón mostrando el *bregma*, el cual es el punto de referencia de los ejes espaciales utilizado en el procedimiento de canulación.

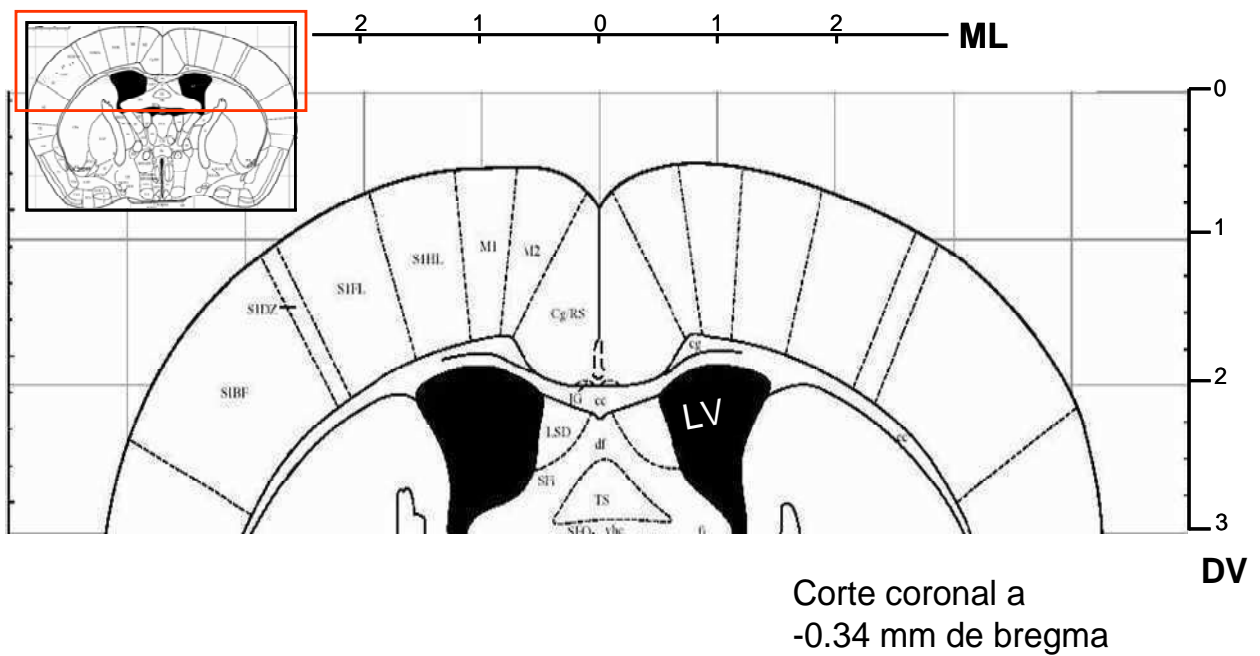
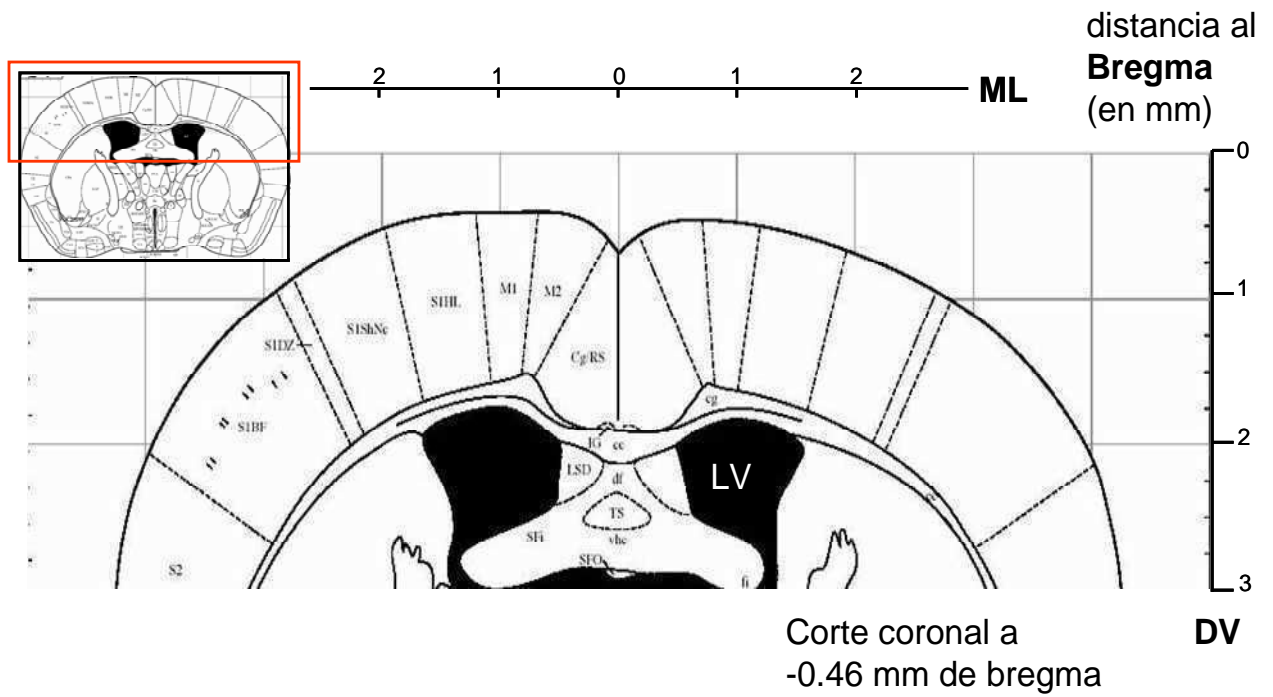


Figura IV.2.3: Figuras representativas de los cortes coronales del cerebro de ratón (extraídas del Atlas de cerebro de ratón, Paxinos y Franklin 2001), de las regiones a 0.34 mm y 0.46 mm posteriores al bregma. Las zonas en negro señalizadas por **LV** indican los ventrículos laterales. El ventrículo lateral izquierdo fue el área elegida para colocar la cánula utilizada para la administración intra-cerebro-ventricular (ICV) de la droga. ML y DV indican los ejes medial-lateral y dorsal-ventral, respectivamente.

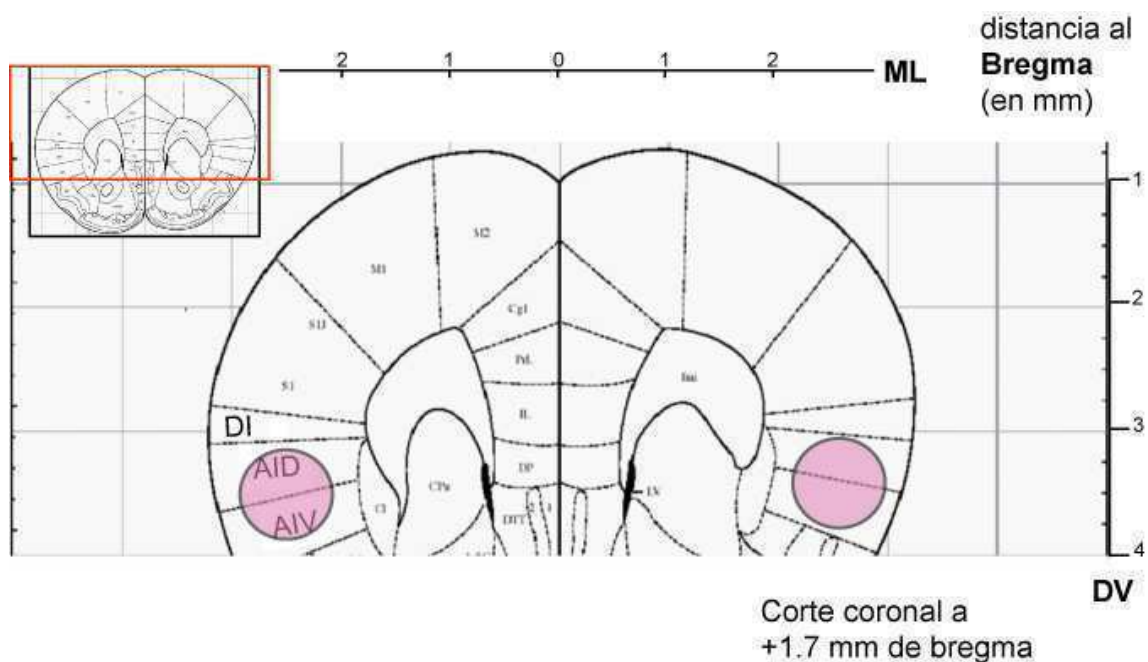


Figura IV.2.4: Figuras representativas de un corte coronal del cerebro de ratón (extraída del Atlas de cerebro de ratón, Paxinos y Franklin 2001), de la región a 1.7 mm anterior al bregma. Las zonas señalizadas por DI (corteza insular disgranular), AID (corteza insular agranular dorsal) y AIV (corteza insular agranular ventral) pertenecen a la corteza insular. Entre las zonas AID y AIV (círculos rosados), tanto el lado izquierdo como el lado derecho, fue el área elegida para colocar la cánula utilizada para la administración intra-corteza insular (ICTI) de la droga. ML y DV indican los ejes medial-lateral y dorsal-ventral, respectivamente.

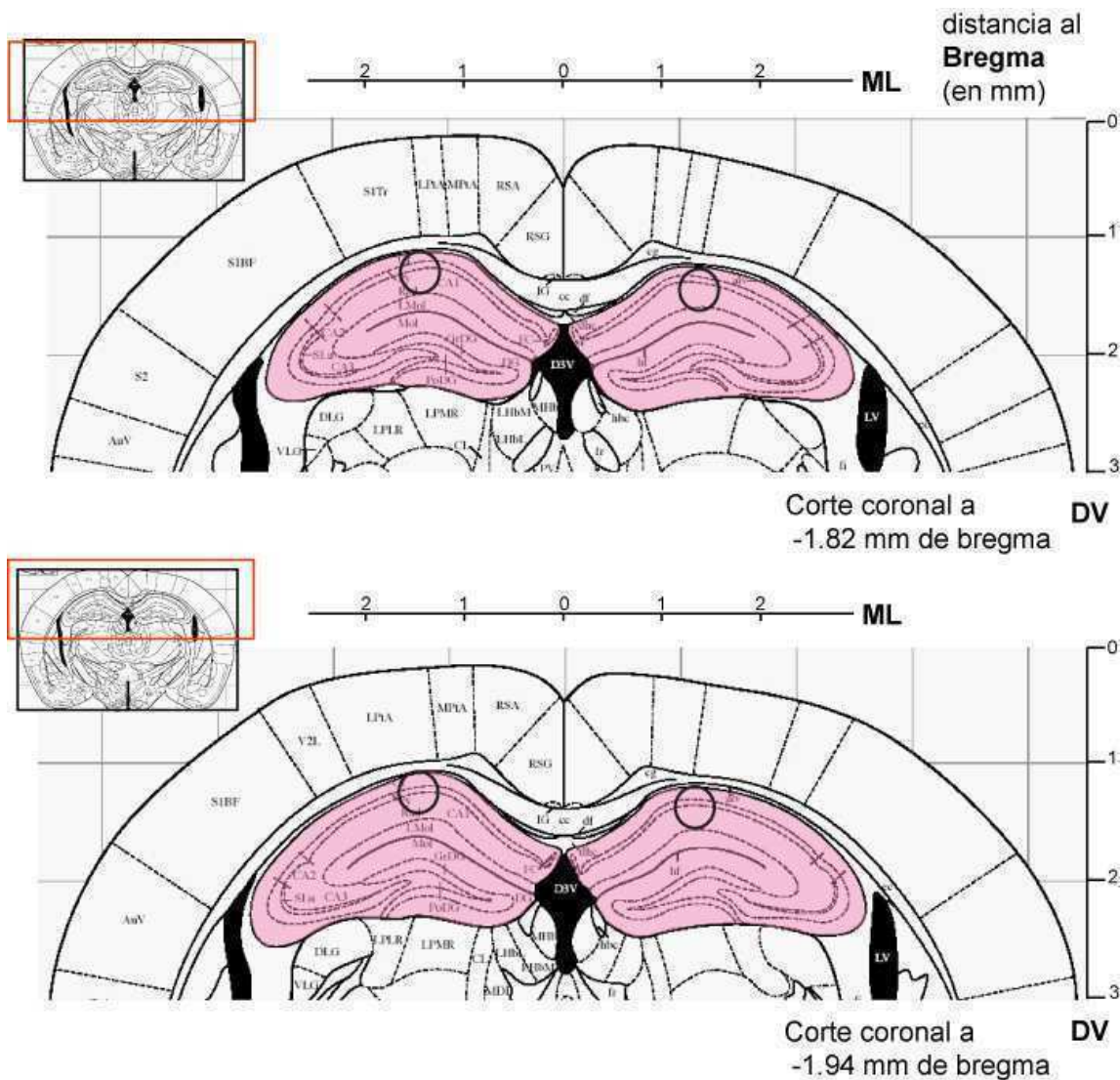


Figura IV.2.5: Figuras representativas de los cortes coronales del cerebro de ratón (extraídas del Atlas de cerebro de ratón, Paxinos y Franklin 2001) de las regiones a 1.82 mm y 1.94 mm posteriores al bregma. La región coloreada en rosado es el hipocampo. Ambos laterales del mismo fueron las áreas elegidas para colocar las cánulas utilizadas para la administración intra-hipocampal (IHP) de la droga (círculos). ML y DV indican los ejes medial-lateral y dorsal-ventral, respectivamente.

Luego, las sesiones de *handling* y *habitación* se llevaron a cabo como se describió en la sección anterior. Durante la *sesión de entrenamiento*, se le permitió explorar los objetos durante 10 minutos (EN estándar, primer experimento) o 15 minutos (EN fuerte, segundo y tercer experimento). Inmediatamente después del entrenamiento, los ratones fueron sometidos a una inyección intra-cerebro-ventricular (ICV) (Sección IV.3.3; Figura IV.3.3), intra-corteza insular (ICTI) (Sección IV.3.4; Figura IV.3.4) e intra-hipocampal (IHP) (Sección IV.3.4; Figura IV.3.5) de la droga, mediante una infusión de la misma a través de las cánulas colocadas con antelación (un día antes de la sesión de *handling*). Por último, se llevó a cabo la *sesión de evaluación*, como ya se ha descrito anteriormente. El período entre sesiones fue de 24 horas. El análisis de los datos se realizó de la misma manera que en los experimentos anteriores.

Método de inyección y drogas utilizadas

Inyección región de cerebro-específica: Las inyecciones se realizaron inmediatamente después de la sesión de entrenamiento. La administración de la droga se llevó a cabo con una aguja de 30 gauge y 9mm de longitud, la cual se introducía en la cánula guía instalada en la región del cerebro a tratar, y estaba conectada a través de un pequeño tubo a una jeringa marca Hamilton manipulada por el experimentador. La duración de la inyección de la droga duró de 30 segundos a 1 minuto, dependiendo del volumen a inyectar. Luego, se esperó 30 segundos para remover la aguja de inyección de la cánula guía, con el fin de evitar el reflujo de la solución.

Oligonucleótido decoy. Cada infusión consistió de un volumen total de 2 μ l en la inyección unilateral ICV, ó 0.5 μ l en cada lateral en las inyecciones ICTI y IHP. Para tal volumen de infusión se utilizó una dosis del inhibidor de NF-kB *oligonucleótido decoy* (Biosynthesis INC.) de 1 μ g/ μ l. Este oligonucleótido de ADN doble cadena contenía la secuencia consenso κ B: 5'-GAGGGGACTTTCCCA-3'. La solución utilizada como control negativo contenía también un oligonucleótido de ADN doble cadena pero que poseía la secuencia consenso de κ B con una base mutada: 5'-GAGGCGACTTTCCCA-3.

Efecto de la administración de drogas inhibidoras de KDACs sobre la consolidación de una memoria débil

Diseño experimental

Cada experimento constó de 2 grupos, los cuales recibieron las sesiones siguientes, en el siguiente orden: *sesión de canulación*, *sesión de handling* (3 días consecutivos), *sesión de habituación* (3 minutos durante 3 días consecutivos), *sesión de entrenamiento* (3 minutos, EN débil) e inyección intra-hipocampal (IHP) de solución fisiológica (Veh) o butirato de sodio (NaB) inmediatamente post entrenamiento, y *sesión de evaluación*. El período entre sesiones fue de 24 horas.

Método de inyección y drogas utilizadas

Butirato de sodio. En los experimentos en los que la administración de la droga fue IHP, cada infusión consistió en 0,5 µl de vehículo o de la solución del inhibidor de KDACS butirato de sodio (NaB) (Sigma Aldrich, EE.UU) administrados bilateralmente en esta región del cerebro. Se utilizó una dosis de NaB de concentración de 0,1 gr/ml disuelta en solución fisiológica. La solución inyectada como vehículo fue solución fisiológica.

Experimentos de correlación

Estudio de la acetilación de histona H3 durante la consolidación de la memoria de NOR luego de diferentes sesiones de entrenamiento

Diseño experimental

Cada experimento constó de 4 grupos. Todos los grupos recibieron las sesiones de *handling* (3 días consecutivos) y de *habituación* (3 minutos durante los 2 primeros días, 5 minutos el 3er día). Un grupo de animales recibió una *sesión de entrenamiento* de 15 minutos (ENfuerte), un segundo grupo de 10 minutos (ENestándar) y un tercer grupo de animales recibió una sesión de 3 minutos (ENdébil). El cuarto grupo no recibió sesión de entrenamiento, fue sometido a un cuarto día de sesión de habituación de 10 minutos y fue utilizado como control negativo (Hab). A 1 hora post sesión de entrenamiento (grupos ENfuerte, ENestándar y ENdébil) o posterior al último día de la sesión de habituación (grupo Hab), se sacrificaron los animales y se procedió a la disección del hipocampo, para la consecutiva extracción de histonas de esta región del cerebro.

Medición de los niveles de histona H3 acetilada en hipocampo de ratón mediante ensayos de Western Blot

Obtención de extractos nucleares enriquecidos en histonas: Luego de la disección del hipocampo, éste fue colocado inmediatamente en buffer A. Todos los procedimientos se realizaron a 4 ° C; el hipocampo fue homogeneizado en buffer A (HEPES 10mM, pH 7,8 - Cl₂Mg 1,5 mM - KCl 10mM - DDT 1mM - 5mM de butirato de sodio) con un homogeneizador teflón-vidrio que rotaba mediante un motor tipo taladro, realizando 12 bajadas del émbolo. El homogenato de tejido se centrifugó a 1000g durante 15 minutos. El precipitado fue resuspendido en buffer A hasta su máxima disolución, luego se añadió H₂SO₄ de manera tal de llegar a una concentración 0.4N y la solución permaneció 30 minutos a 4 ° C para extraer las histonas desde la fracción nuclear. La solución se centrifugó 5 minutos a 15000 rpm, el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y las proteínas se precipitaron en 10 volúmenes de acetona a -20 ° C, durante toda la noche. El precipitado de proteínas básicas nucleares fue recogido por centrifugación a 15.000 rpm por 15 min. El pellet fue resuspendido en agua destilada. Para el ensayo de Western blot, se añadió buffer de siembra y las muestras fueron incubadas a 100 °C durante 5 minutos, e inmediatamente luego colocadas en hielo. Diez microgramos de proteína de cada muestra se corrieron un gel de poliacrilamida, cuya solución del gel contenía 15% de acrilamida. Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF para la detección de proteínas por unión a anticuerpo específico. El ensayo de western blot se realizó con anticuerpos específicos anti histona H3 acetilada (reconoce las lisinas K9 y K14 acetiladas) y anti histona H3 total (CT, pan) (Upstate), siguiendo el protocolo del fabricante. Los anticuerpos fueron generados usando un péptido correspondiente a los aminoácidos 1-20 de la histona H3 del protozoo Tetrahymena como inmunógeno, ambos anticuerpos de conocida reactividad cruzada con humanos, ratón, rata, pollo y levadura. La detección fue realizada utilizando un kit de quimioluminiscencia Luminol (SCB) siguiendo el protocolo del fabricante y las señales fueron digitalizadas por el dispositivo lector de imágenes marca Fuji Film, modelo Intelligent Oscuro Recuadro II, utilizando el software LAS-1000.

Mediciones densitométricas: La densidad óptica relativa (DOR) se estimó a través del software ImageJ 1.29x., NIH Image. La intensidad de las bandas se comparó usando el valor de la densidad integrada, el cual representa la sumatoria de los valores de grises del área seleccionada menos el fondo. Entonces, para analizar las bandas de las tinciones de membranas, se realizó un perfil con los valores de intensidad de los grises y se midió el área del histograma así generado para cada banda. Ese es el valor de densidad óptica (DO). En todos los experimentos, y para cada grupo, se cuantificó el valor DOR de la siguiente

manera: cada membrana se realizó por duplicado y una membrana fue revelada con anticuerpo anti histona H3 acetilada y la otra con anticuerpo anti histona H3 total. Se cuantificó las señales de ambos anticuerpos tomando la DO de cada banda. Se relativizó en cada caso el valor DO proveniente del revelado con anticuerpo anti histona H3 acetilada a su correspondiente banda revelada en la otra membrana con anticuerpo anti histona H3 total. El valor de esta relación H3 acetilada/H3 total (DOR) de cada grupo fue normalizado al valor promedio del grupo Hab.

Análisis de datos

Para las comparaciones entre dos grupos se utilizó la prueba T, y en el caso de las comparaciones múltiples se realizó un ANOVA de una vía y se aplicó el test post hoc de Duncan. En todos los casos se usó un $\alpha=0.05$ como criterio de significancia.

IV.3 Resultados

IV.3.1 Determinación de parámetros del entrenamiento

Dado que existen diferentes protocolos de entrenamiento de NOR, los resultados provenientes de distintos estudios se vuelven difícilmente comparables. Por lo tanto, se planeó estudiar los parámetros del entrenamiento que conducen a una memoria débil o a una memoria fuerte. Se realizó un experimento con un abordaje comportamental, en el cual se tomaron dos grupos de animales. El primer grupo de animales recibió un protocolo de entrenamiento débil de 3 minutos (ENdébil). El otro grupo de animales fue entrenado por un protocolo de entrenamiento fuerte de 15 minutos (ENfuerte). A 24 horas post entrenamiento, se evaluó la memoria de reconocimiento de objetos y se calculó el ID de cada grupo, como se ha descrito en materiales y métodos (sección IV.2). Tal como muestra la

figura IV.3.1, se observaron diferencias significativas entre los ID de ambos grupos (Prueba T $p < 0,05$). Este resultado confirma que la duración de la sesión de entrenamiento es un parámetro útil a modificar para, en combinación con aproximaciones de intervención farmacológica, evaluar los efectos amnésicos (protocolo estándar y fuerte) y facilitadores (protocolo débil) de distintos agentes sobre esta memoria.

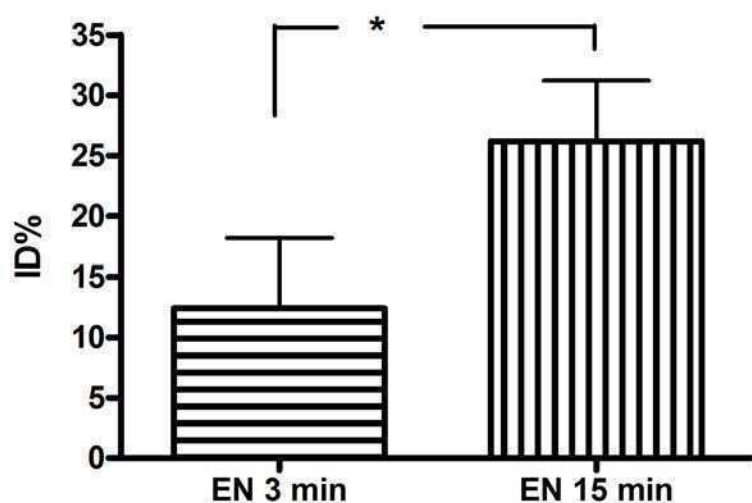


Figura IV.3.1: Efecto de la duración de la sesión de entrenamiento en la memoria de reconocimiento de objetos. Dos grupos de ratones fueron entrenados diferencialmente con una sesión de entrenamiento de 3 minutos (EN 3 min; $n=9$) o de 15 minutos (EN 15 min; $n=7$). En la figura se muestra el ID% de cada grupo en la sesión de evaluación, realizada a 24 horas post entrenamiento. El valor mostrado para cada grupo es la media \pm error estándar. * Prueba T < 0.05 .

IV.3.2 La actividad de NF- κ B está implicada en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos

Los mecanismos de regulación de la cromatina están íntimamente relacionados con la activación transcripcional en la formación de éste y otros tipos de memoria (Barret y Wood 2008, Roth y Sweatt 2009). Para poder correlacionar cambios en la acetilación de histonas con la formación de la memoria de reconocimiento, fue necesario, en primer lugar, estudiar el rol de regiones del cerebro en las que la actividad transcripcional participe en la consolidación de esta memoria. En un primer paso, el objetivo fue interrumpir la expresión génica necesaria para la fase de consolidación en la corteza insular y en el hipocampo. Posteriormente, en un segundo paso, evaluar si la implicancia de la activación transcripcional en dichas áreas involucra acetilación de histonas. Para evitar el uso de inhibidores generales de la transcripción que muestran numerosos efectos inespecíficos, se buscó impedir la actividad de un factor de transcripción, NF- κ B, que demostró ser clave para distintos modelos de memoria, tanto en vertebrados como en invertebrados (Romano et al.2006b, Alberini 2009). Con el objetivo de interrumpir la transcripción génica dependiente de NF- κ B, se aprovechó la disponibilidad de un inhibidor altamente específico y la experiencia de nuestro laboratorio en el estudio de NF- κ B en los modelos de memoria de evitación pasiva y condicionamiento de miedo en *Mus musculus* (Freudenthal et al.2005, Boccia et al.2007). El inhibidor de NF- κ B utilizado fue un oligonucleótido de ADN doble cadena, de 15 pares de bases, que contenía la secuencia consenso de unión a NF- κ B. Este oligonucleótido, denominado *κ B decoy* se une a NF- κ B activado secuestrando al factor de transcripción de sus sitios de unión en el genoma y anulando su función transcripcional. El mismo, fue utilizado tanto en administraciones intra-cerebro-ventricular (ICV) como en forma localizada en el cerebro de ratón, entrando en las células 15 minutos después de la inyección y permaneciendo por al menos 2 hs. Con la dosis utilizada en esta tesis se obtiene una inhibición de NF- κ B del 60 % (Freudenthal et al.2005, Boccia et al.2007, de la Fuente y Romano 2010, manuscrito enviado), la cual fue suficiente para observar un efecto amnésico en otros paradigmas. Si bien la actividad de este factor de transcripción es un rasgo evolutivamente conservado en la formación de la memoria (Romano et al.2006b),

aún no se ha estudiado su función durante la consolidación de la memoria de reconocimiento.

El primer experimento consistió en la administración ICV del inhibidor de NF- κ B, inmediatamente post entrenamiento estándar de 10 minutos de duración. El experimento contó con 2 grupos de animales. Ambos grupos recibieron un entrenamiento de 10 minutos, en el cual se les permitió explorar dos objetos idénticos. Luego de la sesión de entrenamiento a un grupo se le administró κ B *decoy* (*decoy*) y el otro grupo fue inyectado con un oligonucleótido control, conteniendo la secuencia de NF- κ B mutada en una base (*mdecoy*). La utilización del *mdecoy* es un control muy estricto del experimento, ya que la composición total de bases del ADN doble cadena de ambos oligonucleótidos es similar, pero se reemplaza una base G en la secuencia por una C, con el consiguiente reemplazo de una C por una G en la hebra complementaria. Con esta mutación, el oligonucleótido no es reconocido por NF- κ B, controlando el efecto de la administración de ADN en el cerebro. La evaluación de la memoria de reconocimiento de largo término se realizó a 24 horas post entrenamiento. Durante la sesión de evaluación, los animales fueron enfrentados a un objeto idéntico a aquellos presentados en la sesión de entrenamiento, el objeto *familiar*, y un objeto diferente, el objeto *novedoso*, dejándoles explorar ambos objetos durante 5 minutos. La retención de la memoria fue evaluada a través del índice de discriminación (ID). Los resultados muestran que existen diferencias significativas en la comparación entre los ID de ambos grupos (Figura IV.3.3, prueba T < 0.05). En primer lugar, este resultado demuestra que la administración ICV de κ B *decoy* tiene un efecto amnésico, sugiriendo un rol del factor de transcripción NF- κ B en este paradigma de memoria. En segundo lugar, este experimento verificó que es posible utilizar esta metodología para buscar detalladamente las áreas del cerebro implicadas en la memoria de reconocimiento de objetos.

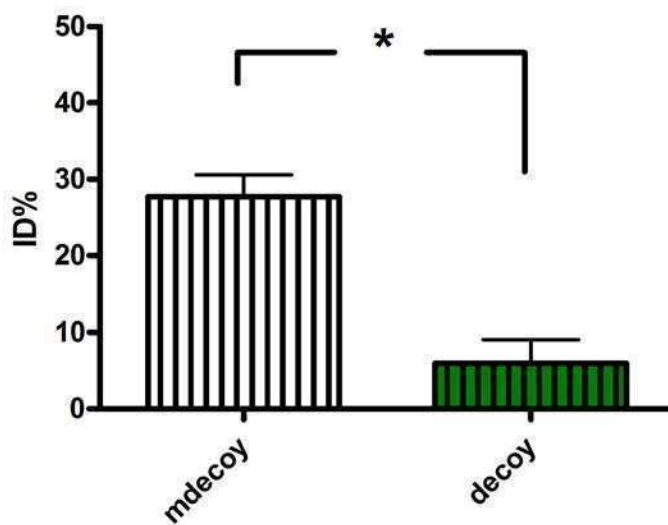


Figura IV.3.3: Efecto de la inyección ICV de oligonucleótido κ B decoy inmediatamente después del entrenamiento de NOR. Los animales entrenados para NOR por 15 minutos e inyectados inmediatamente con el oligonucleótido κ B decoy (decoy; n=7) muestran un índice de discriminación menor que aquellos animales que recibieron el mismo entrenamiento pero fueron inyectados con el oligonucleótido mutado (mdecoy; n=5). El valor mostrado para cada grupo es la media \pm error estándar. * Prueba T <0.05.

IV.3.3 La actividad de NF- κ B en la consolidación de la memoria de reconocimiento es necesaria en el hipocampo pero no en la corteza insular

Dados los resultados de la sección anterior, el siguiente experimento se realizó utilizando la misma metodología y el mismo diseño experimental, pero inyectando la droga en un área específica del cerebro. Antecedentes en un modelo experimental en rata del paradigma de NOR demostraron que la corteza insular tendría un rol en la memoria de reconocimiento (Balderas et al.2008). Por lo tanto,

se administró κ B *decoy* o *decoy* mutado en esta región del cerebro, inmediatamente luego de un entrenamiento fuerte de 15 minutos de duración. Como muestra la figura VI.3.4, no se encontraron diferencias significativas entre los ID de ambos (Prueba T NS). Por lo tanto, no se evidenció un efecto sobre la inhibición del factor NF- κ B en la corteza insular durante la consolidación de la memoria de NOR.

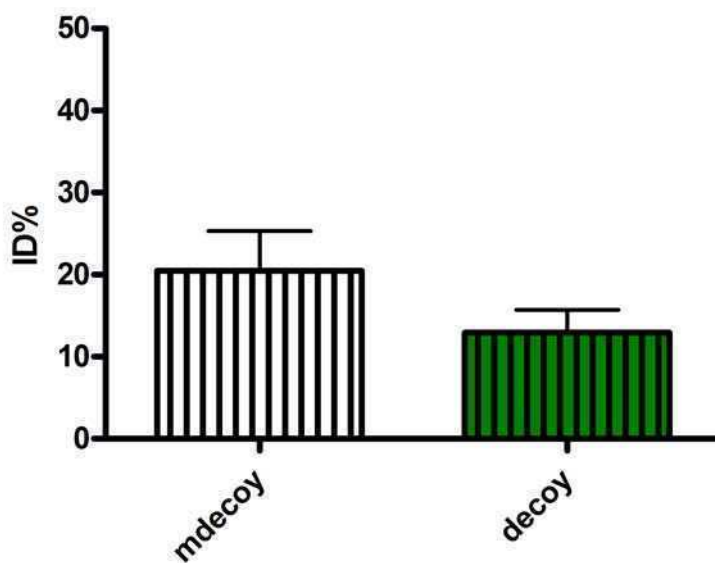


Figura IV.3.4: Efecto de la inyección del oligonucleótido κ B *decoy* en la corteza insular inmediatamente después del entrenamiento de NOR. Los animales entrenados para NOR por 15 minutos e inyectados con el oligonucleótido κ B *decoy* (*decoy*; n=5) muestran similar índice de discriminación que los animales que recibieron el mismo entrenamiento pero fueron inyectados con el oligonucleótido mutado (*mdecoy*; n=5). El valor mostrado para cada grupo es la media \pm error estándar. Prueba T = NS.

Por consiguiente, el tercer experimento se efectuó utilizando similar metodología y diseño experimental, pero inyectando la droga en un área diferente del cerebro, en el hipocampo. Como se discutió en la introducción, existen

resultados dispares en los estudios con respecto a la función del hipocampo en la memoria de reconocimiento (Clark et al.2000, Kelly et al.2003, Rossato et al.2007, Squire et al.2007). Por lo tanto, nos resultó importante aportar información en relación a este debate. Los resultados de este experimento se muestran en la figura IV.3.5. Se observa que el grupo de animales inyectado con κ B *decoy* en el hipocampo tienen un ID menor al grupo de animales control que fue inyectado con *decoy* mutado (prueba T $p < 0,01$). Este efecto amnésico observado en la memoria de NOR a largo término por administración del inhibidor de NF- κ B sugiere que, por un lado, el hipocampo cumple una función en la consolidación de esta memoria y, en segundo lugar, que el factor de transcripción NF- κ B en el hipocampo de cerebro de ratón está implicado en la regulación transcripcional que subyace a la formación de la memoria de reconocimiento de objeto novedoso a largo término.

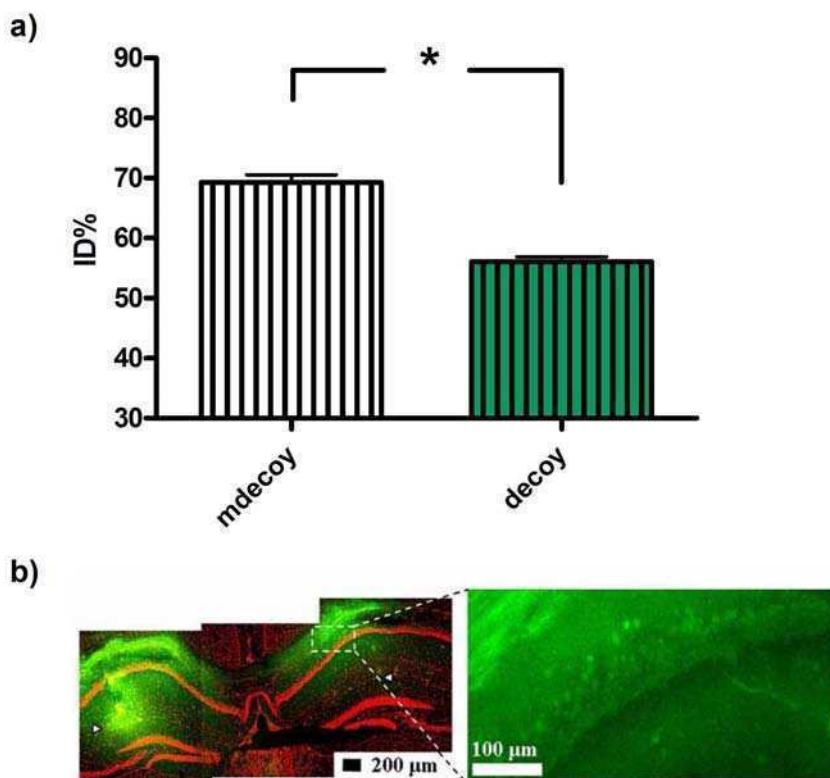


Figura IV.3.5: Efecto de la inyección del oligonucleótido κ B *decoy* en hipocampo inmediatamente después del entrenamiento de NOR. a) Los animales entrenados para

NOR por 15 minutos e inyectados con el oligonucleótido κB decoy (decoy; n=17) muestran un índice de discriminación menor que aquellos animales que recibieron el mismo entrenamiento pero fueron inyectados con el oligonucleótido mutado (mdecoy; n=12). El valor mostrado para cada grupo es la media ± error estándar. ** Prueba T $p < 0.01$. b) Microfotografías tomadas en un microscopio confocal extraídas de Boccia et al.2007. Se muestra la localización del decoy fluoresceinado en el hipocampo de ratón (en color verde fluorescente) 15 minutos después de la inyección IHP. Además, se observan los somas neuronales mediante la co-tinción con yoduro de propidio (en color rojo). Las pequeñas flechas blancas muestran la posición más profunda que alcanzó la cánula de inyección.

IV.3.4 Un entrenamiento débil concomitante con la inyección del inhibidor de KDACs NaB en hipocampo induce una memoria de reconocimiento de largo término

Experimentos previos utilizando este paradigma, han demostrado que una sesión de entrenamiento de 3 minutos de duración no induce memoria de corto ni de largo término, pero sí puede ser facilitada con la inyección inmediatamente post entrenamiento de inhibidores de deacetilasas de lisinas (KDACs) (Stefanko et al.2009), promoviendo la retención de la memoria de largo término, evidenciada en la sesión de evaluación a 24 horas. Sin embargo, en este estudio la administración de la droga fue intra-peritoneal, de modo tal que se espera que llegue a todo el cerebro. Teniendo en cuenta los experimentos anteriores, nos propusimos profundizar en el estudio del rol del hipocampo, analizando el efecto sobre la memoria de reconocimiento de la inhibición de las deacetilasas en esta región del cerebro. Para ello, se realizó el siguiente experimento, que contó con 2 grupos de animales, un grupo experimental y un grupo control. Todos los animales recibieron un entrenamiento de 3 minutos y fueron inyectados en el hipocampo inmediatamente post entrenamiento con el inhibidor de KDACs butirato de sodio (grupo NaB) o solución fisiológica (grupo Veh). A 24 horas post entrenamiento se llevó a cabo la sesión de evaluación y se calcularon los ID de ambos grupos como se

explicó anteriormente. La comparación entre los ID del grupo NaB y del grupo Veh muestra diferencias significativas (Figura IV.3.6; Prueba T $p < 0.05$). Este resultado muestra que la inhibición de KDACS en el hipocampo inmediatamente post entrenamiento facilita la memoria de reconocimiento de objetos. Éste y los resultados de la sección anterior apoyan fuertemente la hipótesis sobre la participación del hipocampo como un núcleo funcional durante la consolidación de la memoria de reconocimiento.

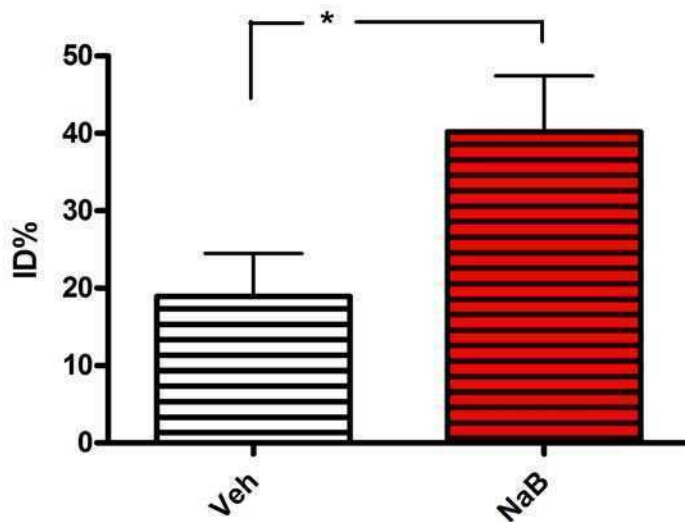


Figura IV.3.6: Efecto de la administración IHP de NaB inmediatamente después de un protocolo de entrenamiento débil. Dos grupos de ratones fueron entrenados con un protocolo de 3 minutos e inmediatamente luego del entrenamiento se les administró vehículo (Veh; $n=9$) o el inhibidor de KDACS (NaB; $n=7$). En la figura se muestra el ID% de cada grupo en la sesión de evaluación, realizada a 24 horas post entrenamiento. El valor mostrado para cada grupo es la media \pm error estándar. * Prueba T < 0.05 .

IV.3.5 La consolidación de una memoria fuerte implica cambios en los niveles de acetilación de la histona H3

Con el fin de investigar si el rol del hipocampo en la consolidación de la memoria de reconocimiento involucra el mecanismo de acetilación de histonas, se realizó un experimento comparando los niveles de histona H3 acetilada en este núcleo del cerebro, medidos a 1 hora post entrenamiento débil (3 minutos), estándar (10 minutos) y fuerte (15 minutos). El experimento constó de 4 grupos de animales: un grupo entrenado bajo un protocolo de 3 minutos (ENdébil), otro grupo con 10 minutos (ENestándar), otro grupo con 15 minutos (ENfuerte) y un último grupo que no fue entrenado, es decir, no se le presentó los objetos en la sesión de entrenamiento, pero sí fue colocado en la arena experimental por 10 minutos tal como en la sesión de habituación (HAB). A 1 hora post entrenamiento (para los grupos ENdébil, ENestándar y ENfuerte) o post habituación (para el grupo HAB), se realizó la disección de los hipocampos de estos animales y se efectuó la extracción de histonas. Los niveles de histona H3 acetilada fueron evaluados mediante la técnica de Western Blot. Como muestra la figura IV.3.7, se observó un aumento significativo en los niveles de histona H3 acetilada 1 hora post entrenamiento en el grupo ENfuerte en relación a los otros tres grupos (ANOVA general $F_{3, 38} = 2,852$; $p < 0,05$). Este resultado demuestra que el entrenamiento fuerte induce un incremento en la acetilación de histonas 1 hora post entrenamiento, que no fue inducido por un entrenamiento estándar (ENestándar) o débil (ENdébil). Además, dado que el grupo HAB tampoco presenta cambios en la acetilación de la histona H3, este resultado evidencia que no es la exposición al contexto *per se* la que induce el cambio en el nivel de H3 acetilada post entrenamiento fuerte.

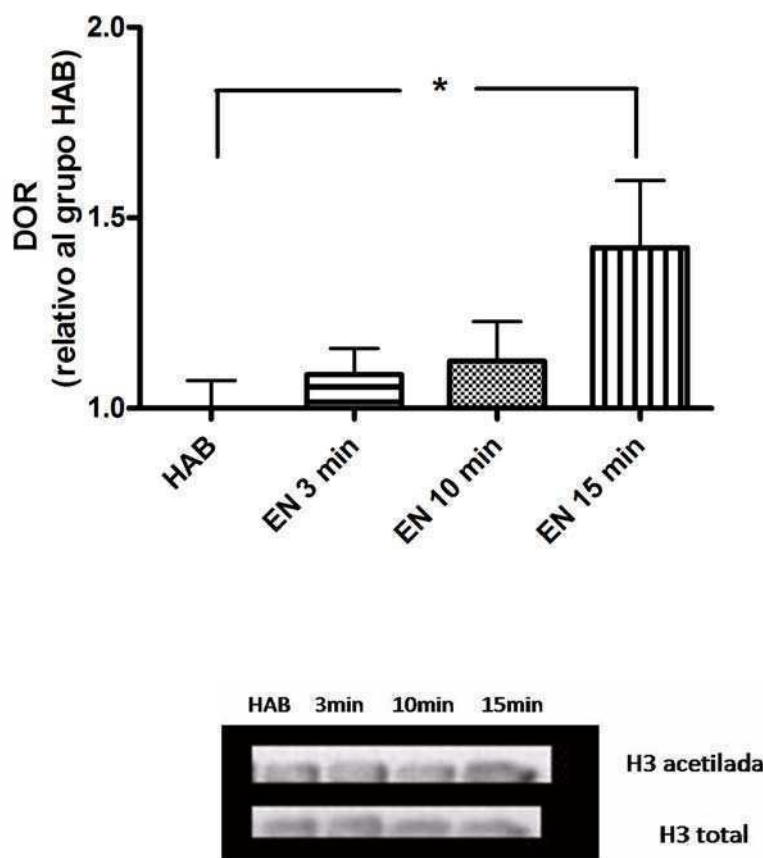


Figura IV.3.7: Niveles de acetilación de histona H3 en el hipocampo de ratón inducidos por diferentes entrenamientos. El valor mostrado para cada grupo es la media \pm error estándar de los valores específicos de la histonas H3 acetilada, normalizado al valor medio del grupo HAB (HAB n=9; EN3min n= 12; EN10min n=11; EN15min n=10). ANOVA *: $p < 0,05$.

IV. 4 Conclusiones y Discusión

En esta tercera y última parte de la tesis, se presentan dos líneas de evidencias provenientes de este modelo en vertebrados, que apoyan la hipótesis planteada sobre el papel de la acetilación de histonas de la clase H3 durante la consolidación de la memoria.

Las primeras evidencias experimentales provienen de los estudios farmacológicos en los que se administró el inhibidor de KDACs NaB. La administración de NaB directamente en el hipocampo, luego de un entrenamiento débil, produjo una facilitación de la memoria de reconocimiento de largo término (Figura IV.3.6). Este resultado indica que la acetilación de histonas en el hipocampo participa en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objeto novedoso.

En concordancia, la segunda línea de evidencia se origina del estudio de correlación entre cambios en los niveles de acetilación de histonas H3 y el tiempo de duración del entrenamiento (Figura IV.3.7). A 1 hora posterior al entrenamiento, se observó que sólo el entrenamiento fuerte de 15 minutos de duración induce un aumento en la acetilación de histonas H3. Por el contrario, tanto un entrenamiento débil de 3 minutos como un entrenamiento estándar de 10 minutos no producen este aumento en el nivel de acetilación de histonas H3. Estos datos apoyarían la hipótesis que fue sugerida a partir de los datos obtenidos en el modelo de memoria en *Chasmagnathus*, en la cual se postula que el marcado del genoma mediante la acetilación de histonas sería un proceso necesario para la activación transcripcional durante la consolidación de memorias fuertes, tanto en invertebrados como en vertebrados.

Aunque la memoria explícita es esencialmente dependiente del LT medial, la importancia relativa de ciertas áreas dentro del mismo, las interacciones con otras áreas del cerebro fuera de ella, la temporalidad de la función del hipocampo y la corteza, y el rol durante las distintas fases de la formación de esta clase de memoria no están claramente establecidas. En este capítulo de la tesis, utilizando como modelo de memoria declarativa el paradigma de reconocimiento de objetos en *Mus musculus*, aportamos información en los siguientes niveles: 1) En primer lugar, se muestran resultados que apoyan fuertemente la idea de la participación del hipocampo en la memoria de reconocimiento de objetos. Por un lado, la inhibición de la expresión génica dependiente del factor de transcripción NF- κ B en el hipocampo, inmediatamente luego del entrenamiento, impidió la formación de la

memoria de reconocimiento de largo término (Figura IV.3.5). Este resultado constituye la primera evidencia de que este factor de transcripción participa en la consolidación de la memoria de reconocimiento. A partir del mismo, se iniciará una línea de investigación para caracterizar la participación de este factor de transcripción en este paradigma. Por otro lado, se encontró que el entrenamiento fuerte indujo un aumento en los niveles de acetilación de histonas H3 en el hipocampo a 1 hora luego del entrenamiento (Figura IV.3.7). En su conjunto, estos resultados sugieren que el hipocampo podría participar tanto en la codificación como en el almacenamiento de la memoria de reconocimiento. Teniendo en cuenta la hipótesis sobre el rol transitorio del hipocampo durante la consolidación de sistemas en algunos modelos de memoria declarativa (Scoville y Milner 1957, Squire y Alvarez 1995), nuevos experimentos utilizando alguna metodología de lesión farmacológica o de ingeniería genética que afecten la función de esta región, podrían complementar la exploración acerca del rol temporal de esta estructura cerebral en este modelo de memoria. 2) En segundo lugar, los resultados expuestos en este capítulo provenientes de experimentos farmacológicos administrando el inhibidor de NF- κ B en la corteza insular (CI), no mostraron efectos sobre la memoria de reconocimiento (Figura IV.3.4). De este resultado surgen dos posibilidades: I) el factor de transcripción NF- κ B no posee una función clave en esta área cerebral o II) este núcleo no está involucrado en el paradigma de NOR. Dado que existen antecedentes que sugieren un papel de la corteza insular en la consolidación de la memoria de reconocimiento (Brown y Xiang 1998, Eldridge et al.2000, Bermudez-Rattoni et al.2005, Balderas et al.2008), la segunda posibilidad es descartada.

Conclusiones y discusión general

En la presente tesis se muestran evidencias experimentales a nivel comportamental y molecular que implican la participación del mecanismo de acetilación de histonas durante el proceso de formación de la memoria de largo término.

En el capítulo II y III se exponen los resultados provenientes del estudio de las fases de consolidación y reconsolidación de la memoria no declarativa en el modelo de *Chasmagnathus*. Se encontró que la acetilación de histonas es un proceso que se induce durante la consolidación y reconsolidación, correlacionándose con el proceso de transcripción génica ampliamente establecido como necesario para ambas fases de la memoria. Este es el primer estudio del curso temporal de la acetilación de histonas durante la consolidación de la MLT, mostrando la cinética de este proceso molecular durante la formación de la misma y evidenciando la naturaleza transitoria de este evento epigenético. A su vez, es el primer trabajo que demuestra a este proceso molecular como partícipe en la consolidación y la reconsolidación de la memoria en invertebrados.

En el capítulo IV se presentan los resultados obtenidos del estudio de la fase de consolidación de la memoria declarativa en el modelo de *Mus musculus*. Se encontró que la acetilación de histonas es un proceso implicado en la consolidación de la memoria de reconocimiento e inducido en el hipocampo. Estas evidencias apoyan la hipótesis de la participación del hipocampo en la memoria de reconocimiento. Además, en el marco de la correlación de este proceso epigenético con la transcripción génica necesaria para la formación de la MLT, se exhibe la primera evidencia de la participación del factor de transcripción NF- κ B en hipocampo durante la consolidación de la memoria inducida en este paradigma comportamental.

Por último, tanto en el modelo de invertebrado como en el modelo de vertebrado empleados en esta tesis, se observó que la acetilación de histonas se induce durante la consolidación de memorias generadas por entrenamientos fuertes, y no se observa en el caso de memorias de largo término (MLT) inducidas por entrenamientos de menor magnitud. Nosotros postulamos que el marcado del genoma mediante la acetilación transitoria de histonas es un proceso universal y necesario para la activación transcripcional durante la consolidación de memorias fuertes, pudiendo representar un código característico de la fuerza de la memoria.

V.1 Los mecanismos epigenéticos como “caracteres” moleculares de la fuerza de la memoria.

La transcripción génica ha sido universalmente implicada en la formación de la MLT (Agranoff 1972, Davis y Squire 1984, Goelet et al.1986, Pedreira et al.1996). Sin embargo, la función específica de la transcripción génica y los mecanismos que la regulan durante la formación de MLT es materia de debate (Alberini 2009, Dudai 2002b, Bekinschtein et al.2007).

En los dos modelos de memoria utilizados en esta tesis se observó que durante la consolidación de una memoria denominada *intermedia*, la acetilación de histonas no ocurre, mientras que en el caso de una memoria denominada *fuerte* sí. De estos resultados, surge la hipótesis de que la participación de la acetilación de histonas como un evento transitorio durante la consolidación de la MLT podría estar caracterizando la fuerza de una memoria. Si bien en ambos modelos se logró discernir de una manera mecanística, utilizando aproximaciones moleculares y farmacológicas, entre ambos tipos de MLT, no hemos demostrado aún que las memorias intermedia y fuerte se diferencien comportamentalmente. En experimentos conductuales planeados, se evaluará si ambos tipos de memoria, en

el modelo de *Chasmagnathus* la MLT inducida por 15 ensayos versus aquella inducida por 30 ensayos, y en el modelo de *Mus musculus* la MLT generada por un protocolo de entrenamiento de 10 minutos versus aquella inducida por un entrenamiento de 15 minutos, se diferencian por su persistencia en el tiempo. Esto nos permitirá confirmar si estamos hablando de dos memorias distintas, cuya persistencia estaría relacionada con los procesos moleculares que ocurren durante su consolidación. En un enfoque similar, podría estudiarse si ambas memorias se diferencian por su resistencia a la *extinción*. Esta variación comportamental de la MLT se induce a través de presentar el estímulo condicionado (EC) en ausencia del estímulo incondicionado (EI) en repetidos eventos o por un tiempo prolongado, resultando en la inhibición temporaria de la respuesta condicionada (Pavlov 1927). En esta nueva fase, se forma una nueva respuesta comportamental ante la presentación del EC, caracterizada por la reducción o inhibición de la respuesta condicionada. En dichos experimentos, se evaluará si las memorias muestran diferentes respuestas ante el mismo protocolo de extinción para poner a prueba la hipótesis de que se trata de memorias de fuerza diferente.

A su vez, otras estrategias experimentales podrían ayudar a encontrar ulteriores evidencias que sustenten la hipótesis apoyada por los experimentos expuestos en esta tesis. Por ejemplo, en la línea de los experimentos de correlación, se podría evaluar la actividad de las enzimas KATs y KDACs durante la consolidación y reconsolidación de la MLT, mediante la incorporación o disminución, respectivamente, del compuesto acetil coenzima A (acetil-CoA) marcado radiactivamente a un sustrato histona. La cantidad de proteína a utilizar como fuente de estas enzimas que es requerida para llevar a cabo el ensayo de actividad enzimática no nos permite aplicar esta metodología en el modelo de *Chasmagnathus*, donde las concentraciones promedio de extractos nucleares totales (provenientes de un conjunto de 20 ganglios supraesofágicos) son relativamente bajas. Con la utilización del modelo de memoria en *Mus musculus* puede ser posible franquear el desarrollo de la técnica. En cuanto al enfoque utilizando intervenciones farmacológicas, la inhibición de KATs durante la consolidación y reconsolidación de la MLT debería ser un próximo objetivo de

estudio. El impedimento del desarrollo de esta idea se debe a que, hasta la fecha, no ha sido confirmada la especificidad de los fármacos inhibidores de KATs, por ejemplo el ácido anacárdico, y que éstos sólo han sido utilizados en preparaciones de cultivos celulares (Kim et al.2009, Song et al.2010).

Por otro lado, en esta tesis se encontró un aumento transitorio de la acetilación de histonas en el ganglio supraesofágico del cangrejo *Chasmagnathus*, 1 hora después de un entrenamiento fuerte. Evidencias experimentales previas en este mismo modelo mostraron cambios en las respuestas electrofisiológicas de neuronas individuales en una región del sistema nervioso del cangrejo conectada al ganglio supraesofágico, denominada lóbula, en la región de los lóbulos ópticos (descrito en el Capítulo II) (Tomsic et al.2003). Estos cambios fueron inducidos inmediatamente después del entrenamiento y perduraron hasta 24 horas después del mismo, correlacionándose con la retención de la MLT. Las modificaciones en las respuestas electrofisiológicas de estas neuronas podrían ser mantenidas por mecanismos de plasticidad neuronal, tanto sinápticos como de otro tipo (ver sección V.4). Nosotros hemos planificado experimentos para evaluar si modificaciones en los niveles de acetilación de histonas en los núcleos de estas neuronas podrían promover el mantenimiento de los cambios en la respuesta neuronal, asociada al cambio conductual durante la formación de la MCS. Estos estudios podrían esclarecer la función de mecanismos epigenéticos en los cambios plásticos producidos en las neuronas individuales durante la formación de la memoria.

Ahora bien, con los resultados expuestos en esta tesis, ¿qué podríamos decir acerca de la diferencia existente entre dos MLT, cuando ambas son inducidas por el mismo tipo de asociación entre estímulos y ambas atraviesan por una fase de consolidación que recluta mecanismos moleculares básicos tales como transcripción génica y síntesis de proteínas? En el estudio planteado en esta tesis, ¿cuál fue el sentido de estudiar un mecanismo que colabora con la transcripción génica, si ya se sabe que este último proceso está implicado en la formación de la MLT?

Tal como han sugerido Davis y Squire (Davis y Squire 1984), es posible que las neuronas posean un comando genético para mantener las alteraciones moleculares y morfológicas que ocurren cuando la memoria es consolidada. Ya que la secuencia genómica de las neuronas no se espera que cambie, se ha postulado que las memorias pueden persistir, al menos en parte, gracias al patrón de expresión génica inducido durante la consolidación (Dudai 2000, Alberini 2009). Esta tesis apoya la idea del código epigenético para la memoria (Capítulo I, sección I.13). Nuestros resultados muestran evidencias acerca de la hipótesis sugerida por otros autores sobre el papel de la epigenética en el almacenamiento o potencial mantenimiento de las memorias consolidadas (Roth y Sweatt 2009, Wood et al. 2006b), por ejemplo, codificando transitoriamente características del fenómeno de aprendizaje, tal como número de ensayos o duración del entrenamiento. Nosotros postulamos que ambos tipos de MLT, ejemplificadas en esta tesis como memoria intermedia y memoria fuerte, requieren de síntesis de ARNm y proteínas pero es la *modulación o regulación* de la síntesis de macromoléculas la que induciría la diferencia de retención de la memoria a lo largo del tiempo (Dudai y Morris 2000).

V.2 Posible rol de las KDACs como reguladores negativos de la consolidación de la memoria.

Como ya se ha mencionado en la introducción del capítulo II, se ha sugerido la existencia de procesos moleculares coordinados que regularían tanto positiva como negativamente la formación de la MLT (Bartsch et al. 1995, Yin et al. 1994, Lisman et al. 1994, Mansuy 2003). Estudios realizados en ratones mutantes que tienen anulado el gen de *hdac5* han demostrado que el balance entre la actividad de activadores y represores, en particular el balance KAT/KDAC, es importante para

codificar la *saliencia* de un estímulo en un paradigma de condicionamiento de la preferencia de lugar (Renthal et al.2007), entendiéndose por *saliencia* al valor significativo que tiene, para el individuo, un determinado EI durante la sesión de aprendizaje. Así mismo, en una estrategia similar de ingeniería genética, utilizando ratones que cuyo gen de *hdac2* ha sido anulado en el cerebro anterior y ratones en los cuales la proteína HDAC2 es sobre-expresada en el sistema nervioso, han evidenciado que esta KDAC regula negativamente la formación de la MLT y la plasticidad sináptica (Guan et al.2009). Los resultados expuestos en esta tesis apoyan la hipótesis de que las KDACs estarían funcionando como reguladores negativos de la formación de la MLT. Nosotros postulamos que este papel de las KDACs es mediado, en parte, por su acción inhibitoria sobre un mecanismo epigenético clave para la estabilización de una memoria fuerte, como la acetilación de histonas.

V.3 Rol de la acetilación de histonas durante la reconsolidación. ¿Qué es la fuerza de una memoria?

Los resultados expuestos en esta tesis sugieren que los mecanismos epigenéticos, tales como la acetilación de histonas, podrían estar caracterizando molecularmente la fuerza de una memoria. Experimentos previos en el modelo de *Chasmagnathus* mostraron que una memoria débil puede ser facilitada durante la reconsolidación (Frenkel et al.2005). En estos estudios, los animales fueron entrenados débilmente y re-expuestos al contexto 24 horas después de manera concomitante a distintas condiciones que modifican los niveles endógenos de angiotensina II (ANGII). Estos resultados sugieren que esta memoria débil podría consolidarse y, luego, ser evocada y reactivada en condiciones en las cuales se induzca un aumento en los niveles de neuromoduladores endógenos como la

ANGII, de manera tal de inducir la fase de reconsolidación, que puede ser facilitada por estas manipulaciones mnésicas. En conjunto con estas evidencias, los resultados presentados en esta tesis (Capítulo III) sugieren que durante la consolidación y la reconsolidación de una memoria débil, no se observan cambios significativos en los niveles de acetilación de histona H3. En cambio, en el caso de memorias fuertes, tanto la consolidación como la reconsolidación de las mismas implicarían este mecanismo epigenético (Capítulo II y III), lo cual determinaría un rasgo distintivo, como su fuerza. Más aún, si la memoria es débil pero es facilitada por administración de inhibidores de KDACs durante la consolidación, puede ser transformada a una memoria más fuerte, tal como lo evidencian el incremento transitorio en los niveles de acetilación de histonas durante las fases de consolidación y reconsolidación, y la retención de la memoria en la sesión de evaluación (Capítulos II y III). Posteriores experimentos en los cuales se comparen características de la fuerza entre las memorias inducidas por el protocolo de entrenamiento débil concomitante a las diferentes intervenciones facilitadoras, el protocolo estándar y el protocolo fuerte, deberán ser realizados para poder confirmar que se tratan de memorias de distinta fuerza (ya mencionados en la sección anterior).

Por otra parte, estudios realizados en el modelo de memoria de miedo condicionado al contexto en *Mus musculus* muestran que las memorias inducidas por protocolos de entrenamiento que proporcionan mayor cantidad de presentaciones del estímulo incondicionado (EI) (choque eléctrico), muestran mayor resistencia a la inducción de la fase de reconsolidación post re-exposición al EC (contexto) que aquellas que son generadas por protocolos de entrenamiento de menor cantidad de presentaciones (Suzuki et al.2004). Los autores de este trabajo proponen que la MLT inducida por el protocolo de entrenamiento fuerte es una memoria más fuerte y podría estar siendo representada en la red neuronal de un modo más extenso que una memoria más débil. En el mismo sentido, un trabajo reciente, en el cual se utilizó el mismo paradigma de memoria en ratas, demostró que una experiencia estresante previa al aprendizaje es capaz de reforzar la memoria de miedo y, en tales condiciones, volverla resistente a la inducción de la

reconsolidación (Bustos et al.2009b). La hipótesis que surge es que la fuerza podría afectar la capacidad que tiene una memoria para re-activarse y labilizarse, es decir, para reconsolidar. Por lo tanto, un experimento que planeamos realizar es el de evaluar si la memoria inducida por el protocolo de 30 ensayos de EVP, denominada fuerte, reconsolidada en las mismas condiciones en las cuales lo hace una memoria intermedia (5 minutos de re-exposición). El experimento planificado implicará administrar un inhibidor de la transcripción general (anisomicina) o de la expresión génica dependiente de NF- κ B (sulfazalazina), drogas cuyos efectos mnésicos durante la fase de reconsolidación de la MCS han sido ampliamente demostrados (Merlo et al.2005, Romano et al.2006b).

En este sentido, varios trabajos sugieren que la edad de la memoria es otra variable importante que afecta la capacidad de una memoria para labilizarse luego de su reactivación (Milekic y Alberini 2002, Eisenberg y Dudai 2004, Suzuki et al.2004, Frankland et al.2006, Bustos et al.2009a). Cabe aclarar aquí, que la fuerza y la persistencia no son características equivalentes de una memoria. Sin embargo, así como un entrenamiento débil genera una memoria de corto término y un protocolo más fuerte induce una memoria de largo término, al incrementar la cantidad de presentaciones de los estímulos a asociar durante la fase de adquisición o aprendizaje, es lógico pensar que la memoria inducida podría hacerse cada vez más perdurable.

En relación a los eventos epigenéticos como caracteres de la fuerza de la memoria (discutido en la sección V.1), el hecho de que la memoria débil no puede ser facilitada en la fase de reconsolidación, aunque sí en la fase de consolidación evidencia que: 1) el mecanismo epigenético de acetilación de histonas está implicado en la consolidación inicial, tal vez en el almacenamiento y/o en parte de la codificación (leer sección V.4), de una memoria de largo término; 2) la consolidación y reconsolidación pueden incluir distintos procesos moleculares. En el marco del debate sobre los procesos compartidos entre consolidación y reconsolidación (Misanin et al.1968, Mactutus et al.1979, Sara 2000, Nader et al.2000, Pedreira et al.2002, Boccia et al.2004, Alberini 2005), y/o acerca de la

reconsolidación considerada como una fase de consolidación prolongada (Dudai y Eisenberg 2004, Bekinschtein et al.2007), este resultado cobra aún más importancia. Se muestra que, utilizando un mismo modelo de memoria, la intervención de un mismo mecanismo molecular, muestra efectos mnésicos diferentes sobre ambas fases de la memoria. Experimentos posteriores en los cuales se someta a prueba si las memorias intermedia y fuerte pueden ser facilitadas por administración de NaB durante la fase de reconsolidación deberán ser llevados a cabo para corroborar estas hipótesis.

Por último, en base a lo discutido en esta sección, cuando hablamos de la fuerza de la memoria, ¿a qué nos estamos refiriendo? Podríamos definir a la *fuerza* de una memoria como un concepto comparativo, pues es difícil de establecer en el caso de una memoria aislada, sino que surge al contrastar al menos dos memorias, inducidas por protocolos de entrenamiento diferentes, que podrían diferenciarse por su persistencia, por la capacidad de ser evocadas, por la capacidad de manifestarse comportamentalmente, y por la facilidad con la que son reactivadas y/o reactualizadas bajo ciertas condiciones paramétricas al momento de la evocación.

V.4 El mecanismo epigenético reversible de acetilación – desacetilación de histonas posee una función evolutivamente conservada en el proceso de formación de la memoria, ¿Cuál?

Se denomina *plasticidad neuronal* a la capacidad de cambiar las propiedades reactivas de las neuronas como resultado de una activación previa (Konorski 1948, Maldonado 2008). La teoría actual de aprendizaje y memoria postula que aquellos procesos de plasticidad neuronal que llevan a la reorganización de los contactos sinápticos de las neuronas involucradas durante la consolidación, constituyen los mecanismos neuronales básicos que dan sustento a la formación de la MLT. Siendo

la expresión génica un mecanismo molecular que ha sido demostrado como universal y necesario para la consolidación de la memoria, cabe preguntarse:

¿Son los cambios en las sinapsis las únicas modificaciones neuronales involucradas en el almacenamiento de la memoria de largo término? ¿Pueden los mecanismos que regulan la expresión génica mediar el almacenamiento de la MLT?

Siguiendo a la idea original de Ramón y Cajal y los postulados de Hebb en su teoría de trazo dual (Ramón y Cajal 1893, Hebb 1949), hoy en día se asume que la información aprendida durante un evento de aprendizaje se *codifica* en patrones espacio-temporales de actividad celular sincronizada dentro de extensas redes neuronales y que esta actividad reverberante resulta, progresivamente, en un alterado patrón de *conectividad* entre las neuronas co-activadas (Bruel-Jungerman et al.2007b). En este marco, y en los términos de la definición de *memoria* que se enunció en el Capítulo I, una determinada representación interna o memoria correspondería a un conjunto de patrones de actividad de extensas redes neuronales que se solapan. La dinámica de los patrones de actividad de las redes, transitoria en naturaleza, no puede ser el sustrato efectivo del almacenamiento de la memoria. Por lo tanto, ha sido ampliamente aceptado que los cambios en las *conexiones o sinapsis* entre las neuronas de las redes son los sitios donde se almacenan de manera perdurable las representaciones o trazas mnésicas, existiendo amplia evidencia correlacionando la MLT con cambios morfológicos en las sinapsis (Horn et al.1985, Bailey y Kandel 1993, Weiler et al.1995). La información así mantenida permanece en un estado durmiente o quiescente, conservando la capacidad de retornar a un estado activo, cada vez que parte de la información original o relacionada al evento de aprendizaje esté disponible, de tal manera que se *evocaría* la representación interna y, en consecuencia, el recuerdo o la memoria.

Sin embargo, además de la depresión o potenciación de una sinapsis o la generación de nuevas sinapsis, algunos trabajos sugieren que el sistema nervioso se

valdría de otros mecanismos para el almacenamiento de la información, tales como cambios en la excitabilidad intrínseca de las neuronas (*plasticidad intrínseca*) (McKay et al.2009, Lorenzetti et al.2006, Zhang y Linden 2003) o la generación de nuevas neuronas (Leuner et al.2006, Bruel-Jungerman et al.2007a). La mayoría de los trabajos sobre plasticidad y memoria se centran en la plasticidad sináptica como sustrato de las alteraciones físicas de las neuronas para formar y mantener la memoria (*trazo mnésico*). En cambio, rechazan la implicancia directa de los otros tipos de cambios en los circuitos neuronales por la pérdida de especificidad espacial y temporal, sí observada en la plasticidad sináptica, y la ausencia de correlación entre el curso de tiempo de los cambios en la plasticidad intrínseca y los procesos de aprendizaje y memoria. No obstante, estas otras formas de plasticidad neuronal también pueden incluir modificaciones en la modulación de la actividad de canales dependientes de voltaje o en su expresión en regiones restringidas dentro de las neuronas, provocadas por el evento de aprendizaje. Dichas modificaciones podrían afectar la excitabilidad de aquellas neuronas que conforman el trazo mnésico y contribuir, de este modo, al almacenamiento de la información adquirida.

En particular, en relación a la formación de la memoria declarativa, un tipo de memoria que puede llegar a durar toda la vida del individuo y que implica procesos de reorganización de circuitos neuronales posteriores al evento del aprendizaje durante la consolidación sistémica (Capítulo IV), un trabajo reciente (Arshavsky 2006) postula que las modificaciones sinápticas podrían ser utilizadas en las fases iniciales de la formación de la memoria. Mientras que otros mecanismos de plasticidad neuronal, relacionados con el núcleo de estas células, serían los encargados del almacenado persistente a más largo plazo de estas memorias duraderas. Este trabajo presenta un debate sobre ciertos conceptos controversiales de la teoría actual de plasticidad sináptica como único sitio de almacenamiento persistente de la memoria.

Algunos autores proponen roles alternativos para otros mecanismo de plasticidad neuronal diferentes de los cambios sinápticos (Dudai y Morris 2000,

Dudai 2002b), que cooperan en el proceso global de almacenamiento de la información. Durante la consolidación sináptica, los productos de los genes que se inducen durante la transcripción génica promueven la remodelación sináptica de largo término, mediante un mecanismo o “diálogo” entre la sinapsis y el núcleo (Dudai y Morris 2000, Romano et al.2006b). Consideremos una neurona que recibe cientos de conexiones aferentes desde un gran número de células. Esta neurona puede funcionar en distintos circuitos que se solapan y la distribución del *peso* o fuerza de esas conexiones debe reflejarse en todo momento. Ante un determinado cambio inducido por el aprendizaje en una sinapsis individual de esa neurona, la “decisión” de consolidar o no ese cambio probablemente no ocurra exclusivamente en el soma de la neurona, ya que el cambio es específico de un subconjunto de conexiones aferentes de esa neurona que han sido activadas. Sin embargo, lo que el soma sí puede hacer es efectuar una modificación que capacite a la neurona para una potencial consolidación, no obstante la decisión final sobre la ocurrencia o no de la consolidación, y dónde va a ocurrir, se realiza localmente (Dudai y Morris 2000). Existen modelos que especulan de qué manera se establecería el “diálogo” entre las sinapsis activadas y el núcleo: Primeramente, las sinapsis activadas enviarían “mensajes” al soma mediante proteínas que migran de la sinapsis al núcleo, tales como proteínas kinasas o factores de transcripción (Emptage y Carew 1993, Squire y Kandel 1999, Freudenthal y Romano 2000, Deisseroth et al.2003); 2) Estas proteínas promueven la inducción de la transcripción génica y otros cambios en el núcleo; 3) Por último, los ARNm recién transcritos se traducirían en el soma y las proteínas podrían ser capturadas específicamente en las sinapsis (Frey y Morris 1997) o los transcritos podrían viajar hasta las sinapsis y ser traducidos localmente (Martin et al.1997, Steward et al.1998, Martin y Zukin 2006).

En este sentido, especulamos que la información aprendida es consolidada por fenómenos que implican el almacenamiento de la memoria, en parte, mediante modificaciones en las conexiones sinápticas, y por otra parte, mediante cambios en otras regiones de las neuronas, tales como la excitabilidad en distintas regiones de la célula y modificaciones en el núcleo neuronal. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que cambios epigenéticos, tales como modificaciones en la estructura

de la cromatina de ciertos genes, en respuesta a experiencias individuales, podrían servir como fuente importante de variación de la expresión génica y de la función de esos genes durante la formación de la MLT. Considerando que muchos mecanismos epigenéticos, que pueden ser producto de un breve evento de señalización intracelular, son modificaciones reversibles pero potencialmente estables y perdurables a lo largo de la vida de una célula, estos procesos podrían estar mediando algún tipo de plasticidad neuronal durante la consolidación y mantenimiento de la memoria. Los resultados expuestos en esta tesis no muestran evidencias directas de mecanismos nucleares que posean esta particularidad. Sin embargo, otros mecanismos epigenéticos, de mayor persistencia que la acetilación de histonas, podrían estar involucrados en el mantenimiento del trazo mnésico. La acetilación de histonas es un mecanismo epigenético altamente correlacionado con la activación de la expresión génica. Por lo tanto, la terminación de la transcripción se encuentra inherentemente acompañada con la desacetilación de histonas. En esta tesis se expone que, por un lado, cambios transitorios de la expresión génica regulados por procesos epigenéticos dinámicos tales como la acetilación de histonas, sustentan la estabilidad de los cambios sinápticos de intermedio y largo plazo que suceden durante la consolidación o reconsolidación de la memoria. Por otro parte, la nueva hipótesis planteada propone que procesos epigenéticos con una dinámica más lenta, que se relacionan con la cualidad o cantidad de expresión génica, y no con su inducción, podrían acompañar temporalmente la duración o persistencia de la memoria.

En este marco, los componentes del código de histonas o de la conformación de la cromatina de más alto orden son esenciales para preservar la organización de distintos microdominios nucleares funcionales (Capítulo I) y para facilitar la fidelidad de procesos genómicos asociados, tales como la transcripción génica y su acople al procesamiento post-transcripcional del ARNm, incluyendo empalme (en inglés, *splicing*), estabilidad, detección de errores, localización y exporte nuclear (Mehler 2008). Además, dentro de las funciones de la cromatina relacionadas con la transcripción génica, se ha postulado la existencia de una “memoria” transcripcional que podría ser mantenida mediante la incorporación a los

nucleosomas de modo sitio-específico, de una variante de histona, la histona H2A.Z, y/o por cambios en la posición de los cromosomas en relación a los poros de la envoltura nuclear (Akhtar y Gasser 2007, Raisner y Madhani 2006, Kundu y Peterson 2009, Draker y Cheung 2009). En modelos de células en cultivo se ha observado que luego de un evento de expresión génica inducido por un estímulo extracelular, genes que han sido transcritos transitoriamente pueden incorporar variantes de histonas o interaccionar con proteínas de la envoltura nuclear, permaneciendo “marcados” por largo término y cebados o preparados, de esta manera, para una rápida activación posterior (Brickner et al.2007, Jhon et al.2008, Barski et al.2007). Para evaluar la nueva hipótesis planteada en el párrafo anterior, hemos planeado realizar experimentos en los cuales se evalúe si los procesos de incorporación de variantes de histonas, tales como H2A.Z, o el posicionamiento de los genes cerca o lejos de la envoltura nuclear, se encuentran implicados durante la consolidación de la MLT.

V. 5 La utilización de distintos abordajes experimentales para el acercamiento a procesos biológicos complejos

Como en otras áreas de la Ciencia, el estudio de sistemas complejos implica un gran desafío en materia del abordaje experimental necesario para su entendimiento, planteando la necesidad de una aproximación a cada uno de los distintos niveles de organización que subyacen a la función del sistema. El estudio de la memoria es un claro ejemplo donde el proceso se manifiesta desde niveles moleculares y subcelulares hasta el comportamiento de los organismos, pasando por el arreglo de la actividad individual de distintos tipos celulares, de grupos de células y de interconexión entre sistemas. Dada esta situación, resulta ventajosa la aproximación a distintos niveles de organización. En particular en este trabajo se

abordó el estudio de los mecanismos celulares que subyacen a la formación y destino de una memoria de largo término. Se utilizaron herramientas de análisis molecular y comportamental, donde las evidencias encontradas en cada caso sirven de base para el planteo de hipótesis en ambos niveles de organización, generando un fructífero encadenamiento lógico para el descubrimiento de los mecanismos biológicos generadores de una compleja propiedad emergente del organismo como la memoria.

Lejos de concentrarse en los eventos subcelulares implicados, el estudio con herramientas de biología molecular de procesos biológicos complejos tales como la memoria permite una apreciación más amplia de los mecanismos, ayudando a la confirmación o reformulación de hipótesis surgidas del análisis comportamental y dando lugar a la proposición de nuevos mecanismos candidatos.

Referencias bibliográficas

- ❖ Aggleton JP. 1985. One trial object recognition by rats. *Quarterly J Experim Psychol* 37:279-294.
- ❖ Aggleton JP, Brown MW. 2006. Interleaving brain systems for episodic and recognition memory. *Trends Cogn Sci* 10: 455-463.
- ❖ Agranoff BW. 1972. *The chemistry of mood motivation and memory*. Plenum Press, NY, USA.
- ❖ Agranoff BW, Davis RE, Casola L, and Lim R. 1967. Actinomycin D blocks formation of memory of shock shock avoidance in *Goldfish*. *Science* 158(808):1600-1601.
- ❖ Akhtar A y Gasser SM. 2007. The nuclear envelope and transcriptional control. *Nat Rev Genet* 8(7): 507-517.
- ❖ Alberini CM. 2005. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 28:51-56.
- ❖ Alberini CM. 2009. Transcription factors in long term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev* 89: 121-145.
- ❖ Alarcon JM, Malleret G, Touzani K, Vronskaya S, Ishii S, Kandel ER, and Barco A. 2004. Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron* 42(6): 947-959.
- ❖ Amaral DG y Witter MP. 1995. Hippocampal formation. Editor Paxinos G. *The Rat Nervous System*, 2da edición. Pp 443-493. Editorial Academic Press, New York, USA.
- ❖ Anagnostaras SG, Maren S y Fanselow MS. 1999. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J Neurosci* 19 : 1106-1114.
- ❖ Andersen JS, Lam YW, Leung AK, Ong SE, Lyon CE, Lamond Ai, Mann M. 2005. *Nature* 433:77-83.
- ❖ Arshavsky YI. 2006. "The seven sins" of the Hebbian synapse: can the hypothesis of synaptic plasticity explain long-term memory consolidation? *Prog Neurobiol* 80(3): 99-113.
- ❖ Bailey CH, Kandel ER. 1993. Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol* 55: 397-426.
- ❖ Baker KB y Kim JJ. 2002. Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. *Learn Mem* 9: 58-65.

- ❖ Balderas I, Rodriguez-Ortiz CJ, Salgado-Tonda P, Chavez-Hurtado J, McGaugh JL, Bermudez-Rattoni F. 2008. The consolidation of object and context recognition memory involves different regions of the temporal lobe. *Learn Mem* 15(9):618-24.
- ❖ Barondes SH. 1975. Protein synthesis-dependent and protein synthesis-independent memory storage processes. In *Short-Term Memory*. Editores: Deutsch D y Deutsch JA. Academic Press, NY, USA.
- ❖ Barret RM y Wood MA. 2008. Beyond transcription factors: the role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory. *Learn Mem* 15(7): 460-7.
- ❖ Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129(4): 823-837.
- ❖ Bartsch D, Ghirardi M, Skehel PA, Karl KA, Herder S, Chen M, Bailey CH, Kandel ER. 1995. *Aplysia* CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts a transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell* 83:979-992.
- ❖ Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH. 2007. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53(2): 261-277.
- ❖ 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: 10037-10044.
- ❖ Berman DE, Hazvi S, Neduva V, Dudai Y. 2000. The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *J Neurosci* 20(18): 7017-23.
- ❖ Bermudez-Rattoni F, Okuda S, Rozendaal, McGaugh J. 2005. Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learn Mem* 12: 447-449.
- ❖ Bernabeu R, Bevilaqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, Bianchin M, Izquierdo I y Medina J. 1997. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signalling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7041-7046.
- ❖ Berón de Astrada M y Maldonado H. 1999. Two related forms of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus* are differentially affected by scopolamine. *Pharmacol Biochem Behav* 63: 109-118.
- ❖ Berón de Astrada M. 2005. Caracterización de interneuronas visuales y su relación con el aprendizaje en el cangrejo *Chasmagnathus Granulathus*. Tesis de doctorado. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- ❖ Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A. 2007. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 14: 1008-1016.

- ❖ Blasco MA. 2007. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet* 8: 299–309.
- ❖ Bliss TVP y Lómo T. 1973. Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Londres)* 232: 331-356.
- ❖ Boccia MM, Acosta GB, Blake MG, Baratti CM. 2004. Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance response in mice: effects of i.c.v. injections of hemicholinium-3. *Neuroscience* 124(4):735-41.
- ❖ Boccia M, Freudenthal R, Blake M, de la Fuente V, Acosta G, Baratti C, Romano A. 2007. Activation of hippocampal nuclear factor-kappa B by retrieval is required for memory reconsolidation. *J Neurosci.* 27(49):13436-45.
- ❖ Bodart JF. 2010. Extracellular-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade: Unsolved issues. *J Cell Biochem*
- ❖ Borrelli E, Nestler EJ, Allis CD, Sassone-Corsi P. 2008. Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron* 60(6): 961–974
- ❖ Bourtchuladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K y Kandel ER. 1998. Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem* 5: 365-374.
- ❖ Bourtchouladze R, Lidge R, Catapano R, Stanley J, Gossweiller S, Romashko D, Scott R, Tully T. 2003. A mouse model of Rubinstein-Taybi syndrome: Defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of phosphodiesterase 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10518–10522.
- ❖ Bowden CL, Singh V. 2005. Valproate in bipolar disorder: 2000 onwards. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 426:13-20.
- ❖ Bozon B, Kelly A, Josselyn SA, Silva AJ, Davis S, Laroche S. 2004. MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Philo Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358: 805-814.
- ❖ Bredy TW, Wu H, Crego C, Zellhoefer J, Sun YE, Barad M. 2007. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learn Mem* 14: 268–276.
- ❖ Bredy TW y Barad M. 2008. The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learn Mem* 15: 39-45.
- ❖ Brickner DG, Cajigas I, Fondufe-Mittendorf Y, Ahmed S, Lee PC, Widom J, Brickner JH. 2007. H2A.Z-mediated localization of genes at the nuclear periphery confers epigenetic memory of previous transcriptional state. *PLoS Biol* 5(4):e81.
- ❖ Brown MW, Xiang JZ. 1998. Recognition memory: neuronal substrates of the judgement of prior occurrence. *Prog Neurobiol* 55(2): 149-89.

- ❖ Brown MW, Aggleton JP. 2001. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nature Rev Neurosci* 2: 51-61.
- ❖ Bruel-Jungerman E, Rampon C, Laroche S. 2007a. Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses. *Rev Neurosci* 18(2): 93-114.
- ❖ Bruel-Jungerman E, Davis S, Laroche S. 2007b. Brain plasticity mechanism of memory: a party of four. *The neuroscientist* 13(5): 492-505.
- ❖ Brunner D y Maldonado H. 1988. Habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. Effect of morphine and naloxone. *J Comp Physiol* 162: 687-694.
- ❖ Burwell RD, Suzuki WA, Insausti R, Amaral DG. 1996. Perception, memory, and emotions: *Frontiers in neuroscience*. Editores: Ono T, McNaughton BL, Molotchnikoff S, Rolls ET, Nishijo H. Editorial Elsevier, Nueva York. Pp 95-110.
- ❖ Burwell RD y Amaral DG. 1998. Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *J Comp Neurol* 398: 179-205.
- ❖ Bustos SG, Maldonado H, Molina VA. 2009a. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology* 34(2): 446-457.
- ❖ Bustos SG, Giachero M, Maldonado H, Molina VA. 2009b. Previous Stress Attenuates the Susceptibility to Midazolam's Disruptive Effect on Fear Memory Reconsolidation: Influence of Pre-Reactivation D-Cycloserine Administration. *Neuropsychopharmacology*. 1-12.
- ❖ Carbó Tano M, Molina VA, Maldonado H, Pedreira ME. 2009. Memory consolidation and reconsolidation in an invertebrate model: the role of the GABAergic system. *Neurosci* 158(2):387-401.
- ❖ Carew TJ, Pinsky HM, Kandel ER. 1972. Long-Term Habituation of a Defensive Withdrawal Reflex in *Aplysia*. *Science*. 175(4020): 451-454.
- ❖ Carew TJ. 2000. *Behavioural neurobiology: The cellular organization of natural behavior*. Sinauer Asociados, Editorial Sunderland , Massachussets, USA.
- ❖ Chen LF y Greene WC. 2004. Shaping the nuclear action of NF-κB. *Mol Cell Biol Rev* 5: 392-401.
- ❖ Chawla S, Vanhoutte P, Arnold FJ, Huang CL, Bading H. 2003. Neuronal activity-dependent nucleocytoplasmic shuttling of HDAC4 and HDAC5. *J Neurochem* 85: 151-159.
- ❖ Cho YH, Berachoea D y Jaffard R. Extended temporal gradient for the retrograde and anterograde amnesia produced by ibotenate entorhinal cortex lesion in mice. *J Neurosci* 13: 1159-1766.
- ❖ Cho YH y Kesner RP. Involvement of entorhinal cortex or parietal cortex in long term spatial discrimination memory in rats: retrograde amnesia. *Behav Neurosci* 110: 436-442.
- ❖ Chun MM y Phelps EA. 1999. Memory deficits for implicit contextual information in amnesic subjects with hippocampal damage. *Nature Neurosci* 2: 845-847.

- ❖ Chwang WB, O' Riordan KJ, Levenson JM, Sweatt JD. 2006. ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. *Learn Mem* 13: 322-328.
- ❖ Chwang WB, Arthur JS, Schumacher A, Sweatt JD. 2007. The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation. *J Neurosci* 27(46): 12732-12742.
- ❖ Clark RE, Zola SM, Squire LR. 2000. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci* 20(23):8853-60.
- ❖ Clark RE, Broadbent NJ, Zola SM, Squire LR. 2002. Anterograde amnesia and temporally graded retrograde amnesia for a nonspatial memory task after lesions of hippocampus and subiculum. *J Neurosci* 22: 4663-4669.
- ❖ Colvis CM, Pollock JD, Goodman RH, Impey S, Dunn J, Mandel G, Champagne FA, Mayford M, Korzus E, Kumar A, Renthal W, Theobald DE, Nestler E.J. 2005. Epigenetic mechanisms and gene network in the nervous system. *J Neurosci* 25(45): 10379-10389.
- ❖ Corkin S, Amaral DG, Gonzalez RG, Johnson KA, Hyman BT. 1997. H. M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *J Neurosci* 17:3964-3979.
- ❖ Corkin S. 2002. What's new with the amnesic patient HM? *Nat Rev Neurosci* 3: 153-160.
- ❖ Cryan JF, Holmes A. 2005. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* 4(9): 775-90.
- ❖ Crow T y Forrester J. 1990. Inhibition of protein synthesis blocks long-term enhancement of generator potentials produced by one-trial in vivo conditioning in *Hermissenda*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4490-4494.
- ❖ Davis S, Laroche S. 2006. Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review. *Genes Brain Behav* 5 Suppl 2:61-72.
- ❖ Davis HP y Squire LR. 1984. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 96(3):518-59.
- ❖ Debiec J, LeDoux JE y Nader K. 2002. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36: 527-538.
- ❖ DeBoer SF y Koolhas JM. 2003. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *European Journal of Pharmacology* 463 (1-3): 145-161.
- ❖ Deisseroth K, Mermelstein PG, Xia H, Tsien RW. 2003. Signaling from synapse to nucleus: the logic behind the mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 13(3): 354-365.
- ❖ Delorenzi A, Pedreira M E, Romano A, Pirola C J, Nahmod V E y Maldonado H. (1995). Acute administration of angiotensin II improves long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurosci Lett* 196: 193-196.

- ❖ Delorenzi A, Pedreira M E, Romano A, García S I, Pirola C J, Nahmod V E & Maldonado H. 1996. Acute administration of angiotensin II enhances long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res Bull* 41: 211-220.
- ❖ Delorenzi A, Dimant B, Frenkel L, Nahmod VE, Nässel 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): 3369-3379.
- ❖ Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. 2007. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Reviews* 31: 673-704.
- ❖ Dokmanovic M, Marks PA. 2005. Prospects: histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem* 96(2):293-304.
- ❖ Draker R, Cheung P. 2009. Transcriptional and epigenetic functions of histone variant H2A.Z. *Biochem Cell Biol* 87(1):19-25.
- ❖ Dudai Y. 2002a. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin in Neurobiol* 12: 211-216.
- ❖ Dudai Y. 2002b. *Memory from A to Z. Keywords, concepts and beyond.* Oxford UP, Oxford, UK.
- ❖ Dudai Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55: 51-86.
- ❖ Dudai Y, Eisenberg M. 2004. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44(1): 93-100.
- ❖ Dudai Y. 2006. Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Curr Opin Neurobiol* 16(2):174-178.
- ❖ Dukas R. 2008. Evolutionary biology of insect learning. *Annu Rev Entomol* 53: 145-160.
- ❖ Duncan CP. 1949. The retroactive effect of electroconvulsive shock. *J Comp Physiol Psychol* 42: 32-44.
- ❖ Duva CA, Floresco SB, Wunderlich GR, Lao TL, Pinel JP, Phillips AG. 1997. Disruption of spatial but not object recognition memory by neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus in rats. *Behav Neurosci* 111: 1184-1196.
- ❖ Duvarci S, Nader K, LeDoux JE. 2008. De novo mRNA synthesis is required for both consolidation and reconsolidation of fear memories in the amygdala. *Learn Mem* 15(10):747-55.
- ❖ Eichenbaum H, Yonelinas A, Ranganath C. 2007. The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu Rev Neurosci* 30: 123-152.
- ❖ Eisenberg M y Dudai Y. 2004. Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in *Medaka*: Old fears don't die. *Eur J Neurosci* 20: 3397-3403.

- ❖ Eldridge LL, Knowlton BJ, Furmanski CS, Bookheimer SY, Engel SA. 2000. Remembering episodes: a selective role for the hippocampus during retrieval. *Nat Neurosci* 3(11): 1149-52.
- ❖ Emptage NJ, Carew TJ. 1993. Long-term synaptic facilitation in the absence of short-term facilitation in *Aplysia* neurons. *Science* 262(5131): 253-256.
- ❖ Fansholl MS. 2009. *Trends in Cognitive Sciences* 14 (1): 7-15.
- ❖ Feld M, Dimant B, Delorenzi A, Coso O, Romano A. 2005. Phosphorylation of extranuclear ERK/MAPK is required for long term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Behav Brain Res* 158(2):251-261.
- ❖ Feng J, Fouse S, Fan G. 2007. Epigenetic regulation of neural gene expression and neuronal function. *Pediatr Res* 61: 58R-63R.
- ❖ Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M., and Tsai, L.H. 2007. Recovery of learning and memory associated with chromatin remodelling. *Nature* 447(7141): 178-182.
- ❖ Flexner JB, Flexner LB y Stellar E. 1963. Memory in mice as affected by intracerebral puromycin. *Science* 141: 57-59.
- ❖ Flexner LB, Flexner JB y Stellar E. 1965. Memory and cerebral protein synthesis in mice as affected by graded amounts of puromycin. *Exp Neurol* 13: 264-272.
- ❖ Frankland PW y Bontempi B. 2005. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6: 119-130.
- ❖ Frankland PW, Ding HK, Takahashi E, Suzuki A, Kida S, Silva AJ. 2006. Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learn Mem* 13(4): 451-457.
- ❖ Freeman FM, Rose SPR y Scholey AB. 1995. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiol Learn Mem* 63: 291-295.
- ❖ Frenkel L, Freudenthal R, Romano A, Nahmod E, Maldonado H, Delorenzi A. 2002. Angiotensin II and the transcription factor REL/NF- κ B link environmental water shortage with memory improvement. *Neuroscience* 115(4): 1079-1087.
- ❖ Frenkel L, Maldonado H, Delorenzi A. 2005. Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water deprivation via brain angiotensin II. *European J Neurosci* 22: 1757-1766.
- ❖ 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 y Romano A. 2000. Participation of Rel/NF-kappaB transcription factors in long term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res* 855(2):274-81.
- ❖ Freudenthal R, Boccia MM, Acosta GB, Blake MG, Merlo E, Baratti CM, Romano A. 2005. NF-kappaB transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice. *Eur J Neurosci* 21(10):2845-52.

- ❖ Frey U y Morris RGM. 1997. Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385: 533-536.
- ❖ Gabrieli JD, Corkin S, Mickel SF, Growdon JH. 1993. Intact acquisition and long term retention of mirror-tracing skill in Alzheimer's disease and in global amnesia. *Behav Neurosci* 107: 899-910.
- ❖ Gaffan D. 1974. Recognition impaired association intact in the memory of monkeys after transection of the fornix. *J Comp Physiol Psychol* 86: 1100-119.
- ❖ Glenn MJ, Nesbitt C y Mumby DG. 2003. Perirhinal cortex lesions produce variable patterns of retrograde amnesia in rats. *Behav Brain Res* 141: 183-193.
- ❖ Gleeson RA, Zubkoff PL. 1977. The determination of the hemolymph volume in the blue crab *Callinectes sapidus*, utilizing ¹⁴C-thiocyanate. *Comp Biochem Physiol* 56A: 411-413.
- ❖ Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. 2005. Acetylation and deacetylation of non histone proteins. *Gene* 363: 15-23.
- ❖ Goebel P, Castelucci VF, Schacher S, Kandel ER. 1986. The long and the short of long term memory – a molecular framework. *Nature* 322: 419-422.
- ❖ Gold PE y McGaugh JL. 1975. En *Short-Term Memory*, pp. 355–378. Editores: Deutsch D & Deutsch JA. Academic Press, New York, USA.
- ❖ Gordon WC y Spear NE. 1973. Effect of reactivation of a previously acquired memory on the interaction between memories in the rat. *J Exp Psychol* 99: 349–355.
- ❖ Guan Z, Giustetto M, Lomvardas S, Kim JH, Miniaci MC, Schwartz JH, Thanos D, Kandel ER. 2002. Integration of long term memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell* 111(4): 483-493.
- ❖ Guan JI, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, Nieland TJF, et al. 2009. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459: 55-63.
- ❖ Hall J, Thomas KL, Everitt BJ (2001a) Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala. *Eur J Neurosci* 13(7):1453-8.
- ❖ Harzsch S, Miller J, Benton J y Beltz B. 1999. From embryo to adult: persistent neurogenesis and apoptotic cell death shape the lobster deutocerebrum. *J Neurosci* 19: 3472–3485.
- ❖ Haushalter, KA y Kadonaga JT. 2003. Chromatin assembly by DNA-translocating motors. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4:613-619.
- ❖ Hebb DO. 1949. *The organisation of behaviour*. Editor: JohnWiley. NY, USA.
- ❖ Hermitte G, Pedreira M E, Tomsic D y 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: 34-49.

- ❖ Hirsh R. 1974. The hippocampus and contextual retrieval of information from memory: a theory. *Behav Biol* 12: 421-444.
- ❖ Hoeger U, Florey E. 1989. Catecholamine degradation in the hemolymph of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Comp Biochem Physiol* 92, 323-327.
- ❖ Holland PC y Bouton ME. 1999. Hippocampus and context in classical conditioning. *Curr Opin Neurobiol* 9: 195-202.
- ❖ Horn G, Bradley P, McCabe BJ. 1985. Changes in the structure of synapses associated with learning. *J Neurosci* 5(12): 3161-3168.
- ❖ Howell DC. 1987. *Statistical methods of psychology*, second Ed Boston, Duxbury.
- ❖ Hsieh J, Gage FH. 2004. Epigenetic control of neural stem cell fate. *Curr Opin Genet Dev* 14:461-469.
- ❖ Hsieh J, Gage FH. 2005. Chromatin remodeling in neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 17:664-671
- ❖ Hu JH, Ma YH, Jiang J, Yang N, Duan SH, Jiang ZH, Mei ZT, Fei J, Guo LH. 2004. Cognitive impairment in mice overexpressing gamma aminobutyric acid transporter 1 (GAT1). *Neuroreport* 15: 9-12.
- ❖ Hupbach A, Gomez R, Hardt O, Nadel L. 2007. Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information. *Learn Mem* 14(1-2): 47-53.
- ❖ 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: 6781-6789.
- ❖ Insausti R, Marcos P, Arroyo-Jimenez MM, Blaizot X, Martinez-Marcos A. 2002. Comparative aspects of the olfactory portion of the entorhinal cortex and its projection to the hippocampus in rodents, nonhuman primates, and the human brain. *Brain Res Bull* 57: 557-560.
- ❖ Izquierdo I, Quillfeldt JA, Zanutta MS, Quevedo J, Schaeffer E, Schmitz PK, Medina JH. 1997. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur J Neurosci* 9(4): 786-93.
- ❖ Jenuwein T y Allis CD. 2001. Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080.
- ❖ John S, Sabo PJ, Johnson TA, Sung MH, Biddie SC, Lightman SL, Voss TC, Davis SR, Meltzer PS, Stamatoyannopoulos JA, Hager GL. 2008. Interaction of the glucocorticoid receptor with the chromatin landscape. *Mol Cell* 29(5): 611-624.
- ❖ Kandel ER, Schwartz JH y Jesell TM. 1995. *Essentials of neural science and behavior*. Editorial Appleton & Lange, Connecticut, USA.
- ❖ Kandel ER. 2000. *Principles of neural science*. Editorial McGraw-Hill, Division miembros de la salud, NY, USA.

- ❖ Kandel ER. 2001. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294: 1030–1038.
- ❖ Kelly A, Laroche S, Davis S. 2003. Activation of mitogen activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci* 12(23): 5354-5360.
- ❖ Kemp A y Manahan-Vaughan D. 2004. Hippocampal long term depression and long term potentiation encode different aspects of novelty acquisition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8192-8197.
- ❖ Kida S, Josselyn S A, de Ortiz S P, Kogan J H, Chevere I, Masushige S. & Silva A J. 2002. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci* 5: 348-355.
- ❖ Kiefer SW, Braun JJ. 1977. Absence of differential associative responses to novel and familiar taste stimuli in rats lacking gustatory cortex. *J Comp Physiol Psychol* 91: 498 –507.
- ❖ Kim MK, Shin JM, Eun HC, Chung JH. 2009. The role of p300 histone acetyltransferase in UV-induced histone modifications and MMP-1 gene transcription. *PLoS One* 4(3): e4864.
- ❖ Kim JJ y Fanselow MS. 1992. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256: 675-677.
- ❖ Kondo T. 2006. Epigenetic alchemy for cell fate conversion. *Curr Opin Genet Dev* 16: 502–507.
- ❖ Konorski J. 1948. Conditioned reflexes and neuronal organization. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- ❖ Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M. 2004. CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron* 42(6): 961-972.
- ❖ Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their functions. *Cell* 128: 693-705.
- ❖ Kundu S, Peterson CL. 2009. Role of chromatin states in transcriptional memory. *Biochim Biophys Acta* 1790(6):445-455.
- ❖ Kumar A, Choi KH, Renthal W, Tsankova NM, Theobald DEH, Truong HT, Russo SJ, LaPlant Q, Sasaki TS, Whistler KN, Neve RL, Self DW, Nestler EJ. 2005. Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron* 48 303–314.
- ❖ Kurdistani S y Grunstein M. 2003. Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 276-284.
- ❖ LeDoux JE . 1996. The emotional brain. The mysterious underpinnings of emotional life. Editores Simon y Shuster, New York.
- ❖ Lee J L, Everitt BJ y Thomas KL. 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*. 304: 839-843.

- ❖ Leister P, Burgdorf S, Scheidtmann KH. 2003. Apoptosis antagonizing transcriptional factor AATF is a novel coactivator of hormone receptor. *Signal Transduction* 1-2:17-25.
- ❖ Leuner B, Gould E, Shors TJ. 2006. Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus* 16(3): 216-224.
- ❖ Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD. 2004. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* 279(39): 40545-40559.
- ❖ Levenson JM, Sweatt JD. 2005. Epigenetic mechanism in memory formation. *Nat Rev Neurosci* 6(2): 108-118.
- ❖ Levenson JM, Sweatt JD. 2006. Epigenetic mechanisms: a common theme in vertebrate and invertebrate memory formation. *Cell Mol Life Sci* 63(9):1009-1016.
- ❖ Linseman DA, Bartley CM, Le SS, Laessig TA, Bouchard RJ, Meintzer MK, Li M, Heidenreich KA. 2003. Inactivation of the myocyte enhancer factor-2 repressor histone deacetylase-5 by endogenous Ca²⁺ //calmodulin-dependent kinase II promotes depolarization-mediated cerebellar granule neuron survival. *J Biol Chem* 278: 41472–41481.
- ❖ Lisman J. 1994. The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci* 17(10): 406-412.
- ❖ Locatelli F, Lafourcade C, Maldonado H, Romano A. 2000. Characterization of cAMP-dependent protein kinase isoforms in the brain of the crab *Chasmagnathus*. *J Comp Physiol* 171:33-40.
- ❖ Locatelli F, Maldonado H, Romano A. 2002. Two critical periods for cAMP-dependent protein kinase activity during long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem* 77(2):234–49.
- ❖ Locatelli F, Romano A. 2005. Differential activity profile of cAMP-dependent protein kinase isoforms during long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem* 83(3):232-42.
- ❖ Lorenzetti FD, Mozzachiodi R, Baxter DA, Byrne JH. 2006. Classical and operant conditioning differentially modify the intrinsic properties of an identified neuron. *Nat Neurosci* 9(1): 17-19.
- ❖ Lozada M, Romano A, Maldonado H. 1990. Long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Physiology Behavior* 47, 35-41.
- ❖ Lubin, F.D., Sweatt, J.D. 2007. The IκB kinase regulates chromatin structure during reconsolidation of conditioned fear memories. *Neuron* 55, 942-957.
- ❖ Lubin FD, Roth TL, Sweatt JD. 2008. Epigenetic regulation of bdnf gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci* 28: 10576–10586.
- ❖ Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å⁰ resolution. *Nature* 389:251-260.

- ❖ Maldonado H, Romano A y Tomsic D. 1997. Long-term habituation (LTH) in the crab *Chasmagnathus*: a model for behavioral and mechanistic studies of memory. *Brazil J Med Biol Res* 30: 813-826.
- ❖ Maldonado H. 2002. Crustacean as a model to investigate memory illustrated by extensive behavioral and physiological studies in *Chasmagnathus*. En el libro *The crustacean memory system*: 314-327. K. Wiese, Editorial Springer, Berlin.
- ❖ Maldonado H. 2008. *La memoria animal. Adquisición, persistencia y olvido*. Buenos Aires, Eudeba.
- ❖ Maccarone M, Valverde O, Barbaccia ML, Castane A, Maldonado R, Ledent C, Parmentier M, Finazzi-Agro A. 2002. Age-related changes of andamide metabolism in CB1 cannabinoid receptor knock out mice, correlation with behaviour. *Europ J Neurosci* 15: 1178-1186.
- ❖ Mactutus CF, Riccio DC, Ferek JM. 1979. Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. *Science* 204(4399):1319-20.
- ❖ Manns JR y Eichenbaum H. 2006. Evolution of declarative memory. *Hippocampus* 16: 795-808.
- ❖ Mansuy IM. 2003. Calcineurin in memory and bidirectional plasticity. *Biochem Biophys Res Commun* 311(4): 1195-1208.
- ❖ Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK. 2004. Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res* 91:137-68.
- ❖ Maroun M y Akirav I. 2008. Arousal and stress effects on consolidation and reconsolidation of recognition memory. *Neurpsychopharm* 33: 394-405.
- ❖ Martin KC, Casadio A, Zhu H, Yaping E, Rose JC, Chen M, Bailey CH, Kandel ER. 1997. Synapse-specific, long-term facilitation of *Aplysia* sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* 91(7): 927-938.
- ❖ Martin KC y Sun YE. 2004. To learn better, keep the HAT on. *Neuron* 42: 879-881.
- ❖ Martin KC, Zukin RS. 2006. RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *J Neurosci* 26(27):7131-4.
- ❖ Maviel T, Durkin TP, Menzhagi F y Bontempi B. 2004. Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305: 96-99.
- ❖ Maurice T, Duclot F, Meunier J, Naert G, Givalois L, Meffre J, Celerier A, Jacquet C, Copois V, Mechti N, et al. 2007. Altered memory capacities and response to stress in p300/CBP-associated factor (PCAF) histone acetylase knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 33: 1584-1602.
- ❖ McBride SM, Giuliani G, Choi C, Krause P, Correale D, Watson K, Baker G, Siwicki KK. 1999. Mushroom body ablation impairs short-term memory and long-term memory of courtship conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Neuron* 24(4): 967-77.

- ❖ McCarthy MM, Auger AP, Bale TL, De Vries GJ, Dunn GA, Forger NG, Murray EK, Nugent BM, Schwarz JM, Wilson ME. 2009. The epigenetics of sex differences in the brain. *J Neurosci* 29(41):12815-23.
- ❖ McGaugh JL y Petrinovich LF. 1966. Neural consolidation and electroconvulsive shock reexamined. *Psychol Rev* 73(4):382-7. Review
- ❖ McGaugh JL y Krivanek JA. 1970. Strychnine effects on discrimination learning in mice: effects of dose and time of administration. *Physiol Behav* 5: 1437-1442.
- ❖ McGaugh JL. 1983. Preserving the presence of the past. Hormonal influences on memory storage. *Am Psychol* 38(2): 161-174.
- ❖ McKay BM, Matthews EA, Oliveira FA, Disterhoft JF. 2009. Intrinsic neuronal excitability is reversibly altered by a single experience in fear conditioning. *J Neurophysiol* 102(5): 2763-2770.
- ❖ Mehler MF. 2008. Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease. *Progress in Neurobiol* 86(4): 305-341.
- ❖ Menzel R. 2007. Phylogeny and evolution: on comparing species at multiple levels. *Science of Memory: concepts*. Pp 371-375. Editores: Roediger HL, Dudai Y, Fitzpatrick SM. Prensa de la Universidad de Oxford, UK.
- ❖ Menzel R. 2001. Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn Mem* 8: 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.
- ❖ Merlo E, Freudenthal R, Maldonado H, Romano A. 2005. Activation of the transcription factor NF-kappaB by retrieval is required for long-term memory reconsolidation. *Learn Mem* 12(1):23-9.
- ❖ Milekic MH y Alberini CM. 2002. Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron* 36: 521-525.
- ❖ Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Bernstein BE, et al. 2007. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448: 553-560.
- ❖ Miller RR y Matzel LD. 2000. Memory involves far more than 'consolidation'. *Nat Rev Neurosci*. 1(3):214-6.
- ❖ Miller S, Yasuda M, Coats JK, Jones Y, Martone ME, Mayford M. 2002. Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron* 36:507-519.
- ❖ Milner B. 1972. Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clin Neurosurg* 19:421-446.

- ❖ Milner B, Squire LR, Kandel ER. 1998. Cognitive Neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20: 445-468.
- ❖ Miranda MI, Bermúdez-Rattoni F. 2007. Cholinergic activity in the insular cortex is necessary for acquisition and consolidation of contextual memory. *Neurobiol Learn Mem* 87(3): 343-51.
- ❖ Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ. 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 160(827):554-5.
- ❖ Morris RGM. 1981. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv* 12: 139-260.
- ❖ Mueller GE y Pilzecker A. 1900. Experimentelle beitrage zur lehre von gedachtni. *Z Psychol Sinnesoy Ergänzungsband*. 1: 1-300.
- ❖ Mumby DG, Wood ER, Duva CA, Kornecook TJ, Pinel JP, Phillips AG. 1996. Ischemia-induced object recognition deficits in rats are attenuated by hippocampal ablation before or soon after ischemia. *Behav Neurosci* 11: 266-281.
- ❖ Myers KM y Davis M. 2002. Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* 36: 567-584.
- ❖ Nadel L y O'Keefe J. 1974. *Essays on the nervous system*. Editores BElairs y Gray. Clarendon, Oxford, UK. Pp: 367-390.
- ❖ Nadel L y Moscovitch M. 1997. Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* 7: 217-227.
- ❖ Nadel L y Land C. 2000. Memory traces revisited. *Nat Rev Neurosci* 1(3):209-212.
- ❖ Nader K y Hardt O. 2009. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nature Rev Neurosci* 10: 224-234.
- ❖ 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.
- ❖ Nader K. 2003. Memory traces unbound. *Trends Neurosci* 26: 65-72.
- ❖ Nassel, DR. y Elofsson R. 1987. Comparative anatomy of the crustacean brain. En: *Arthropod Brain: Its Evolution, Development, Structure, and Functions*. Gupta Editores, Wiley and Sons, New York, USA.
- ❖ Norton VG, Imai BS, Yau P, Bradbury EM. 1989. Histone acetylation reduce nucleosome core particle linking number change. *Cell* 108(3): 449-457.
- ❖ Okuda S, Roozendaal B, McGaugh JL. 2004. Glucocorticoid effects on object recognition memory require training associated emotional arousal. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 853-858.
- ❖ O'Keefe J y Nadel L. 1978. *The hippocampus as a cognitive map*. Prensa de la Universidad de Oxford, Oxford, UK.

- ❖ Ooi L y Wood IC. 2007. Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST. *Nat Rev Genet* 8: 544–554.
- ❖ Paller KA, Ranganath C, Gonsalves B, LaBar KS, Parrish TB, Gitelman DR, Mesulam MM, Reber PJ. 2003. Neural correlates of person recognition. *Learn Mem* 10: 253-260.
- ❖ Pavlov I P. 1927. *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. Oxford University Press, London, UK.
- ❖ Paxinos G y Franklin KBJ. 2001. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, London, UK.
- ❖ Pedreira ME, Dimant B, Tomsic D, Quesada-Allue L A y Maldonado H. 1995. Cycloheximide inhibits long-term habituation and context memory in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav* 52: 385-395.
- ❖ 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: 611–7.
- ❖ Pedreira ME, Romano A, Tomsic D, Lozada M, Maldonado H. 1998. Massed and spaced training build up different components of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Anim Learn Behav* 26: 34-38,
- ❖ Pedreira ME, Pérez-Cuesta LM, Maldonado H. 2002. Reactivation and reconsolidation of long term memory in th crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA type glutamatergic receptors. *J Neurosci* 22:8305-8311.
- ❖ Pedreira ME y Maldonado H. 2003. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* 38: 863-869.
- ❖ Penick S y Solomon PR. 1991. Hippocampus, context, and conditioning. *Behav Neurosci* 105: 611-617.
- ❖ Pereyra P, de la Iglesia H y Maldonado H. 1996. Training to testing intervals different from 24 hours impairs habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Physiology and Behavior* 59: 19-25.
- ❖ Phillips RG y LeDoux JE. 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106: 274-286.
- ❖ Pineda VV, Athos JI, Wang H, Cerver J, Ippolito D, Boulay G, Birnbaumer L, Storm DR. 2004. Removal of G(iα1) constraints on adenylyl cyclase in the hippocampus enhances LTP and impairs memory formation. *Neuron* 41: 153-163.
- ❖ Pinel JP y Treit D. 1978. Burying as a defensive response in rats. *J Comp Physiol Psychol* 92: 708–712
- ❖ Pittenger C, Huang YY, Paletzki RF, Bourtchouladze R, Scanlin H, Vronskaya S, Kandel ER. 2002. Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus dependent spatial memory. *Neuron* 34: 447-462.

- ❖ Prusky GT, Douglas RM, Nelson L, Shabanpoor A, Sutherland RJ. Visual memory task for rats reveals essential role of hippocampus and perirhinal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 5064-5068.
- ❖ Przybylski J y Sara SJ. 1997. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* 84: 241-246.
- ❖ Przybylski J, Roulet P y Sara SJ. 1999. Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J Neurosci* 19: 6623-6628.
- ❖ Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM. 2001. *Neuroscience*. Sinauer Asociados. Sunderland (MA), USA.
- ❖ Quillfeldt JA, Zanatta MS, Schmitz PK, Quevedo J, Schaeffer E, Lima JB, Medina JH, Izquierdo I. 1996. Different brain areas are involved in memory expression at different times from training. *Neurobiol Learn Mem* 66(2):97-101.
- ❖ Quinn WG. 2006. Neurobiology: memories of a fruitfly. *Nature* 439(7076):546-8.
- ❖ Ramón y Cajal S. 1893. Neue Darstellung vom histologischen Bau des Central nerven systems, *Arch Anat Physiol Anat Abt Suppl*: 319-428.
- ❖ Raisner RM, Madhani HD. 2006. Patterning chromatin: form and function for H2A.Z variant nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev* 16(2): 119-124.
- ❖ Reed JM, Means LW. 2004. Human implicit memory for irrelevant dimension values is similar to rats' incidental memory in simultaneous discrimination tasks. *Behav Processes* 67: 383-393.
- ❖ Renthal W, Maze I, Krishnan V, Covington HE 3rd, Xiao G, Kumar A, Russo SJ, Graham A, Tsankova N, Kippin TE, Kerstetter KA, Neve RL, Haggarty SJ, McKinsey TA, Bassel-Duby R, Olson EN, Nestler EJ. 2007. Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron* 56(3): 517-529.
- ❖ Rescorla RA y Wagner AR. 1972. En *Clasical Conditioning II: Current Research and Theory*. Pp 64-99. Editores: Blak AH y Prokasky WF. Appleton century Crofts, NY, USA.
- ❖ Rescorla DA. 1988. Pavlovian conditioning: It's not what you think it is. *American Psychologist* 43: 151-160.
- ❖ Resta-Lenert S, Truong F, Barrett KE, Eckmann L. 2001. Inhibition of epithelial chloridesecretion by butyrate: role of reduced adenylyl cyclase expression and activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 281(6): C1837-1849.
- ❖ Riedel G, Micheau J, Lam AG, Roloff EL, Martin SJ, Bridge H, de Hoz L, Poeschel B, McCulloch J, Morris RG. 1999. Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat Neurosci* 2(10): 898-905.
- ❖ Rogan MT y LeDoux JE. 1996. Emotion: Systems, cells, synaptic plasticity. *Cell* 85: 469-475.

- ❖ Romano A, Lozada M, Maldonado H. 1990. Effects of naloxone pretreatment on habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Behav Neur Biol* 53: 113-122.
- ❖ Romano A, Locatelli F, Delorenzi A, Pedreira ME, Maldonado H. 1996a. Effects of activation and inhibition of cAMP-dependent protein kinase on long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res* 735(1): 131-140
- ❖ Romano A, Delorenzi A, Pedreira ME, Tomsic D, Maldonado H. 1996b. 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): 119-125.
- ❖ Romano A, Locatelli F, Freudenthal R, Merlo E, Feld M, Ariel P, Lemos D, Federman N, Fustiñana MS. 2006a. Lessons from a crab: molecular mechanisms in different memory phases of *Chasmagnathus*. *Biol Bull* 210(3): 280-288.
- ❖ Romano A, Freudenthal R, Merlo E, Routtenberg A. 2006b. Evolutionarily-conserved role of the NF-kappaB transcription factor in neural plasticity and memory. *Eur J Neurosci* 24(6): 1507-1516.
- ❖ Rosenblum K, Meiri N, Dudai Y. 1993. Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol* 59: 49 –56.
- ❖ Rosenblum K, Berman DE, Hazvi S, Lamprecht R, Dudai Y. 1997. NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *J Neurosci* 17: 5129 –5135.
- ❖ Rosenthal R y Rosnow RL. 1985. Contrast analysis focused comparisons in the analysis of variance. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- ❖ Rosenzweig M. 1998. Historical perspectives on the development of the biology of memory. *Neurobiology of learning and Memory*. Editores: Martinez J y Kesner R. Academic Press, USA.
- ❖ Rossato JI, Bevilaqua LR, Myskiw JC, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. 2007. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem* 14: 36-46.
- ❖ Roth TL y Sweatt JD. 2009. Regulation of chromatin structure in memory formation. *Curr Opin Neurobiol* 19(3):336-342.
- ❖ Rugg MD y Yonelinas A. 2003. Human recognition memory: a cognitive neuroscience perspective. *Trends Cogn Sci* 7: 313-319.
- ❖ Saccani S, Pantano S, Natoli G. 2001. Two waves of nuclear factor kappaB recruitment to target promoters. *J Exp Med* 193(12): 1351-9.
- ❖ Sandeman DC, Scholtz GS, Sandeman RE. 1993. Brain evolution in decapod crustacea. *J Exp Zool* 265: 112-133.
- ❖ Sandeman DC. 1982. Organization of the central nervous system. En: *The Biology of the crustacea*. Vol. 4. págs. 1-31. Editores Sandeman y Atwood. Academic Press, New York, USA.

- ❖ Sara S.J. 2000a. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* 7: 73-84.
- ❖ Sara SJ. 2000b. Strengthening the shaky trace through retrieval. *Nat Rev Neurosci.* 1(3): 212-213.
- ❖ Schafe GE, Bernstein IL. 1998. Forebrain contribution to the induction of a brainstem correlate of conditioned taste aversion. II. Insular (gustatory) cortex. *Brain Res* 800: 40-47.
- ❖ Schacter DL y Tulving E. 1994. What are the memory systems of 1994? *Memory systems*. Editores: Schacter DL y Tulving E. Prensa de MIT, Cambridge, MA. Pp 1-38.
- ❖ Schor IE, Rascovan N, Pelisch F, Alló M, Kornbliht AR. 2009. Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci* 106(11): 4325-30.
- ❖ Scoville WB. 1954. The limbic lobe in man. *J Neurosurg* 11: 64-66.
- ❖ Scoville WB y Milner B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Psychiatry* 20: 11-21.
- ❖ Serota RG. 1971. Acetoxycycloheximide and transient amnesia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68(6): 1249-1250.
- ❖ Shadmehr R y Holcomb HH. 1997. Neural correlates of motor memory consolidation. *Science* 277: 821-825.
- ❖ Shi Y, Sun G, Zhao C, Stewart R. 2007. Neural stem cell self-renewal. *Crit Rev Oncol Hematol* 65: 43-53.
- ❖ Shimizu E, Tang YP, Rampon C y Tsien JZ. NMDA receptor dependent- synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science* 290: 1170-1174.
- ❖ Song C, Kanthasamy A, Anantharam V, Sun F, Kanthasamy AG. 2010. Environmental neurotoxic pesticide increases histone acetylation to promote apoptosis in dopaminergic neuronal cells: relevance to epigenetic mechanisms of neurodegeneration. *Mol Pharmacol.* En prensa.
- ❖ Squire LR y Barondes SH. 1970. Actinomycin-D: effects on memory at different times after training. *Nature* 225(5233): 649-650.
- ❖ Squire LR. 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys and humans. *Psychol Rev* 99: 195-231.
- ❖ Squire LR, Knowlton B, Musen G. 1993. The structure and organization of memory. *Annu Rev Psychol* 44: 453-495.
- ❖ Squire L R y Alvarez P. 1995. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol* 5: 169-177.
- ❖ Squire LR y Kandel ER. 1999. *Memory: from mind to molecules*. Scientific American Library, Nueva York.

- ❖ Squire LR, Stark CEL, Clark RE. 2004. The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci* 27: 279-306.
- ❖ Squire LR, Wixted JT y Clark RE. 2007. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nature Reviews Neuroscience*, 8, 872-883.
- ❖ Stefanko DP, Barret R, Ly A, Reolon G, Wood M. 2009. Modulation of long term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(23):9447-52.
- ❖ Sterner DE, Berger SL. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 435-459.
- ❖ Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF. 1998. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21(4): 741-751.
- ❖ Strahl, BD, Allis CD. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45.
- ❖ Suarez L. 2004. Dinámica de la formación de nuevas asociaciones durante la consolidación de la memoria en *Chasmagnathus granulatus*. Tesis de licenciatura. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- ❖ Suzuki WA y Amaral DG. 1994. Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: Cortical afferents. *J Comp Neurol* 350: 497-533.
- ❖ Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24(20): 4787-4795.
- ❖ Sweatt JD. 2009. Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 65:191-197.
- ❖ Taniura H, Sng JC, Yoneda Y. 2007. Histone modifications in the brain. *Neurochem Int* 51: 85-91.
- ❖ Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM. 2001 The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci* 4(8):813-8.
- ❖ Thornton JA, Rothblat LA, Murray EA. 1997. Rhinal cortex removal produces amnesia for preoperatively learned discrimination problems but fails to disrupt postoperative acquisition and retention in rhesus monkeys. *J Neurosci* 17(21): 8536-49.
- ❖ 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.
- ❖ Tomsic D Maldonado H y 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: 694-706.

- ❖ Tomsic D, Massoni V y Maldonado H. 1993. Habituation to danger stimulus in two semiterrestrial crabs: Ontogenic, ecological and opioids modulation correlates. *J Comp Physiol (A)* 173: 621-633.
- ❖ Tomsic D, Berón de Astrada M, Sztarker J. 2003. Identification of individual neurons reflecting short- and long-term visual memory in an arthropodo. *J Neurosci* 23(24):8539-46.
- ❖ Troncoso J y Maldonado H. 2000. Two related forms of memory in the crab *Chasmagnathus* are differentially affected by NMDA receptor antagonists. *Pharmacol Biochem Behav* 72: 251-265.
- ❖ Tronson NC, Schrick C, Guzman YF, Huh KH, Srivastava DP, Penzes P, Guedea AL, Gao C, Radulovic J. 2009. Segregated populations of hippocampal principal CA1 neurons mediating conditioning and extinction of contextual fear. *J Neurosci* 29(11):3387-94.
- ❖ Tsankova N, Kumar A, Nestler EJ. 2004. Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *J Neurosci* 24:5603-5610.
- ❖ Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ. 2007. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8: 355-367.
- ❖ Tully T, Preat T, Boynton SC, Del Vecchio M. 1994. Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79(1):35-47.
- ❖ Umka J, Mustafa S, Elbeltagy M, Thorpe A, Latif L, Bennett G, Wigmore PM. 2009. Valproic acid reduces spatial working memory and cell proliferation in the hippocampus. *Neurosci En prensa*.
- ❖ Utting M, Agricola HJ, Sandeman R, Sademan D. 2000. Central complex in the brain of crayfish and its possible homology with that of insects. *J Comp Neurol*. 416: 245-261.
- ❖ Vecsey CG, Hawk JD, Lattal KM, Stein JM, Fabian SA, Attner MA, Cabrera SM, McDonough CB, Brindle PK, Abel T, Wood MA. 2007. Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *J Neurosci* 27(23): 6128-6140.
- ❖ Vettese-Dadey M, Grant PA, Hebbes TR, Crane-Robinson C, Allis CD, Workman JL. 1996. Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *Embo J* 15(10): 2508-2518.
- ❖ Waddington CH. 1957. *The strategy of the genes*. New York: MacMillan.
- ❖ Wang H, Shimizu E, Tang YP, Cho M, Kyin M, Zuo W, Robinson DA, Alaimo PJ, Zhang C, Morimoto H, Zhuo M, Feng R, Shokat KM, Tsien JZ. 2003. Inducible protein knockout reveals temporal requirement of CaMKII reactivation for memory consolidation in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(7): 4287-92.

- ❖ Wang H, Ferguson GD, Pineda VV, Cundiff PE, Storm DR. 2004. Overexpression of type 1 adenylyl cyclase in mouse forebrain enhances recognition memory and LTP. *Nature Neurosci* 7:635-642.
- ❖ Wayman GA, Lee YS, Tokumitsu H, Silva AJ, Soderling TR. 2008. Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron* 59(6):914-31.
- ❖ Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. 2004. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 7(8): 847-854.
- ❖ Weiler IJ, Hawrylak N, Greenough WT. 1995. Morphogenesis in memory formation: synaptic and cellular mechanisms. *Behav Brain Res. Jan* 23;66(1-2):1-6.
- ❖ Whitlow JW y Wagner AR. 1984. Memory and habituation. Habituation, sensitization and behavior. Pp 103-153. Editores: Peeke VS y Petrinovich R. Academic Press, NY, USA.
- ❖ Winter BD y Bussey TJ. 2005. Glutamate receptors in perirhinal cortex mediate encoding, retrieval and consolidation of object recognition memory. *J Neurosci* 25: 4243-4251.
- ❖ Wixted JT. 2007. Dual process theory and signal detection theory of recognition memory. *Psychol Rev* 114: 152-176.
- ❖ Wood MA, Kaplan MP, Park A, Blanchard EJ, Oliveira AM, Lombardi TL, Abel T. 2005. Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage. *Learn Mem* 12(2): 111-119.
- ❖ Wood MA, Attner MA, Oliveira AM, Brindle PK, Abel T. 2006a. A transcription factor-binding domain of the coactivator CBP is essential for long-term memory and the expression of specific target genes. *Learn Mem* 13(5): 609-617.
- ❖ Wood MA, Hawk JD, Abel T. 2006b. Combinatorial chromatin modifications and memory storage: A code for memory? *Learn Mem* 13: 241-244. Review
- ❖ Yang XJ y Seto E .2008. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(3): 206–218
- ❖ Yeh SH, Lin CH, Gean PW. 2004. Acetylation of Nuclear Factor-kB in Rat Amygdala Improves Long-Term but not Short-Term Retention of Fear Memory. *Mol Pharmacol* 65(5): 1286-1292.
- ❖ Yin JCP, Wallach JS, Del Vecchio M, Wilder EL, Quinn WG, Tully T. 1994. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 79: 49-58.
- ❖ Zeng L y Zhou MM. 2002. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS letters* 513 (1): 124-128.
- ❖ Zhang W, Linden DJ. 2003. The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nat Rev Neurosci* 4(11): 885-900.

- ❖ Ztlatanova J, Bishop TC, Victor JM, Jackson V, Van Holde K. 2009. The nucleosome family: dynamic and growing. *Structure* 17:160-171.