

Tesis Doctoral

# Mecanismos celulares y moleculares involucrados en las distintas fases de la memoria de condicionamiento de miedo en ratones

de la Fuente, Verónica

2012

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

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

Cita tipo APA:

de la Fuente, Verónica. (2012). Mecanismos celulares y moleculares involucrados en las distintas fases de la memoria de condicionamiento de miedo en ratones. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

de la Fuente, Verónica. "Mecanismos celulares y moleculares involucrados en las distintas fases de la memoria de condicionamiento de miedo en ratones". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**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

**Mecanismos celulares y moleculares involucrados en las distintas  
fases de la memoria de condicionamiento de miedo en ratones**

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área  
Ciencias Biológicas

Lic. Verónica de la Fuente

Director de Tesis: Dr. Arturo Romano

Consejero de estudios: Dr. Daniel Tomsic

Lugar de trabajo: Laboratorio de Neurobiología de la Memoria, Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires - Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIByNE), CONICET.

Buenos Aires, 2012



# Mecanismos celulares y moleculares involucrados en las distintas fases de la memoria de condicionamiento de miedo en ratones

## Resumen

En el aprendizaje asociativo, la reactivación de la memoria por la presentación de un recordatorio puede inducir dos procesos mnésicos aparentemente opuestos, la reconsolidación o la extinción. En esta Tesis describimos un *switch* molecular entre mecanismos de transcripción que se inducen diferencialmente en el hipocampo en la determinación de dichos procesos. Encontramos que NF- $\kappa$ B es necesario para la reconsolidación, mientras que para la extinción su activación se ve restringida por la fosfatasa calcineurina. El factor de transcripción NFAT es activado a su vez por calcineurina durante la extinción, y es necesario para que este proceso tenga lugar. Por el contrario, NFAT parecería no tener ningún rol en la reconsolidación. La actividad de calcineurina también es necesaria para que se lleve a cabo el proceso de extinción. Esta fosfatasa jugaría entonces un doble papel: 1) induciendo la activación y translocación de NFAT desde el citoplasma hacia el núcleo, 2) bloqueando a la vez la activación de NF- $\kappa$ B.

Asimismo, nuestros resultados en el estudio de la consolidación sugieren fuertemente que calcineurina actúa como limitante negativo en la formación de memorias, y su mecanismo de acción involucra la regulación del estado de activación de NF- $\kappa$ B. Profundizamos entonces el modelo en el que quinasas y fosfatasas dependientes de calcio controlan activamente el procesamiento neuronal, mediante un equilibrio finamente regulado en el que se oponen entre sí.

Por último, estudiamos el rol de NF- $\kappa$ B en plasticidad estructural relacionada a procesos de memoria, y resultados preliminares nos indican que el mismo tendría un rol clave en el aumento de densidad de espinas asociado al aprendizaje.

**Palabras clave:** NF- $\kappa$ B, calcineurina, NFAT, condicionamiento de miedo, ratón, hipocampo, memoria.



# **Cellular and molecular mechanisms involved in the different phases of the memory of fear conditioning in mice**

## **Abstract**

In associative learning, memory reactivation by the presentation of a reminder can induce two behaviorally opposing memory processes, reconsolidation or extinction. In this PhD Thesis, using the fear conditioning paradigm in mice, we describe a molecular switch between transcriptional mechanisms that are induced differentially in the hippocampus by these two processes. We found that NF- $\kappa$ B is necessary for reconsolidation, whereas in extinction, its activation is constrained by the phosphatase calcineurin. The transcription factor NFAT is, in turn, necessary for the extinction process to take place, and it seems to have no role in reconsolidation. Calcineurin activity is also necessary for extinction. This phosphatase plays then a dual role: inducing the activation and translocation of NFAT from the cytoplasm to the nucleus, while blocking activation of NF- $\kappa$ B.

Furthermore, our results in the study of the consolidation phase strongly suggest that calcineurin acts as a negative constraint in memory formation, and its mechanism of action involves the regulation of NF- $\kappa$ B activation. Thus, we support the model in which kinases and phosphatases actively control calcium-dependent neuronal processing through a finely regulated balance in which they oppose each other.

Finally, preliminary results from our study on the role of NF- $\kappa$ B in structural plasticity related to memory processes indicate that it has a key role in the increase in spine density associated with learning.

**Key Words:** NF- $\kappa$ B, calcineurin, NFAT, fear conditioning, mice, hippocampus, memory.



# Agradecimientos

A Arturo, por permitirme formar parte de su grupo. Por su generosidad y dedicación. Por preocuparse por el bienestar de las personas que trabajamos con él. Por darme la libertad y el espacio para plantear ideas nuevas. Por las discusiones memorísticas eternas.

A Euge, por siempre ver el bosque y no dejarme perder en el árbol. ¡Por leer mi tesis!

A Noe, por la sana convivencia que logramos juntas y que nos permitió trabajar sinérgicamente en el *bioter*. Por la ayuda en los experimentos, por la discusión de ideas, y por ser siempre la que mantiene en alto la bandera de los Seminarios Romaniles.

A Sol, por la ayuda en los experimentos. Por estar siempre en el labo dispuesta a más, por contribuir enérgicamente al bienestar del LNM en su conjunto.

A Marian, por los cafecitos, lágrimas y juguitos. Por nuestras charlas de madres, porque es un gusto compartir el ministerio de laboratorio con vos.

A Gise, por sus ganas contagiosas de aprender y ayudar.

A Ramiro, por la ayuda con los EMSAs y las marcaciones.

A MarianSolGabyMache, por los buenos momentos y no tan buenos, pero así, juntas.

A Héctor, porque si bien trabajo con “esperpentos” (mis queridos ratones), sigue siendo maestro, cada vez más.

A todo el LNM, pasados y presentes, por generar un espacio de trabajo funcional, pero *sobre todo* alegre y con buen clima, siempre. Por los viernes de torta (¡que vuelvan!), por los almuerzos y sobremesas cargados de política, historias y anécdotas.

A los científicos no-LNM: A Pedro, por enseñarme mucho de lo que sé sobre cómo trabajar con ratones/ratas. Por su visión de la ciencia. Por ser ejemplo.

A Lucas Pozzo-Miller, por dejarme llevar adelante en su laboratorio los experimentos de espinas, mi gran capricho doctoral. Por la ayuda y buena predisposición (de su familia también). A Gastón, por enseñarme a usar la *gene gun* y sus truquillos experimentales. A ambos por incluirme en sus familias temporalmente.

A todos aquellos que me abrieron la puerta y me respondieron alguna duda experimental, o me sacaron las papas del fuego por ejemplo prestándome alguna alícuota de anticuerpo. A Estela del bioterio de La Plata, porque siempre le pido más, ¡y ella lo consigue todo!



A los de *la facu*, Nuñez, Beck, In, Cyn, Vero, Anita, la Colo, Torito, Lucas, y otros. Porque por más que la vida y el tiempo nos fue separando y nos vemos poco y nada, cada vez que nos juntamos pareciera que seguimos teniendo veinte.

A la UBA, por formarme. Al Estado, por pagar mi formación, de grado y de posgrado. A los tantos profesores y alumnos que enseñan y hacen pensar. Al jardín de infantes Mi Pequeña Ciudad, porque sin ellos, me hubiese sido tanto más difícil.

Y ahora...A los míos...que son necesariamente coautores imprescindibles de este trabajo. A mi mamá, por ser ejemplo de persona, madre y trabajadora. Porque siempre sé que puedo recurrir a ella. Porque siempre me empuja hacia adelante. A mi papá, porque me apoya sin importar bien de qué se trate, porque siempre se entusiasma cuando le cuento en qué trabajo, sólo por ver que a mí me entusiasma. A los dos, por bancarme en *todo* (no sé si ponerlo en cursiva o mayúsculas...quiero la opción que sea más abarcativa). Por adorar a mis hijas, y porque ellas los adoran.

A mis hermanos, Diego y Fepo, porque cada vez que los veo me muestran sin decirlo, que existen otras posibilidades.

A mis hijas. Poli, Juli y la que se está moviendo justo ahora en mi panza. Por soportar las oleadas de trabajo intenso –y ausencias- que a veces requiere la ciencia. Por las horas de juego adeudadas. Por las mañanas remolonas, los planes familiares, los mimos, la dulzura. Y por sobre todas las cosas, gracias por portar las sonrisas que inspiran mi día y me hacen feliz.

A Juan, por ser incondicional (otra palabra que me queda chica). Por la ayuda imprescindible para que pudiera terminar la tesis, por las discusiones sobre la memoria. Por ser mi cable a tierra. Porque no hay nada que me dé más paz que estar cerca suyo. Por crear juntos esta familia hermosa que tenemos.

A mi mamá y a mi papá

A Juan, Po, Ju, y Porota



# Publicaciones

Algunos de los resultados mostrados en esta Tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones/manuscritos:

**CALCINEURIN INHIBITION FACILITATES CONSOLIDATION OF MEMORY BY MEANS OF NF- $\kappa$ B ACTIVATION.**

de la Fuente V, Federman N, Fustiñana MS, Romano A. Manuscrito en preparación.

**RECONSOLIDATION OR EXTINCTION: TRANSCRIPTION FACTOR SWITCH IN THE DETERMINATION OF MEMORY COURSE AFTER RETRIEVAL.**

de la Fuente V, Freudenthal R, Romano A. J Neurosci. 2011 Abril 13; 31(15):5562-73.

**ACTIVATION OF HIPPOCAMPAL NUCLEAR FACTOR-KAPPA B BY RETRIEVAL IS REQUIRED FOR MEMORY RECONSOLIDATION.**

Boccia M, Freudenthal R, Blake M, de la Fuente V, Acosta G, Baratti C, Romano A. J Neurosci. 2007 Dic 5; 27(49):13436-45.



# Índice

Abreviaturas .....	1
CAPÍTULO I.....	3
Introducción general.....	3
I.1. Aprendizaje y memoria .....	5
I.2. Condicionamiento <i>pavloviano</i> de miedo.....	5
I.3. Tipos de memoria.....	7
I.4. Fases de la memoria .....	9
I.4.1. Consolidación.....	9
I.4.2. Reconsolidación .....	11
I.4.3. Extinción .....	13
I.5. Fases de la memoria. Resumen: .....	17
I.6. Mecanismos subyacentes al almacenaje información.....	22
I.7. Calcineurina .....	25
I.8. Factor nuclear de células T activadas.....	27
I.9. Factor nuclear kappa B.....	31
Objetivos e hipótesis.....	35
CAPÍTULO II.....	39
Materiales y métodos.....	39
II.1. Sujetos experimentales.....	41
II.2. Ensayos conductuales. Condicionamiento de miedo.....	42
II.3. Cirugía e infusión de drogas .....	46
II.4. Drogas .....	47
II.5. Extracción de proteínas.....	48
II.6. Ensayos bioquímicos: electroforesis en geles de poliacrilamida y <i>Westen-blot</i> . 49	
II.7. Ensayos bioquímicos: medición de actividad de unión al ADN .....	50
II.8. Histología.....	51
II.9. Preparación de cortes de cerebro para la metodología de <i>DiOlistics</i> .....	52
II.10. <i>DiOlistics</i> .....	52
II.11. Microscopía Confocal.....	54
II.12. Análisis estadístico .....	54
CAPÍTULO III .....	59
NF- $\kappa$ B, CaN y NFAT en reconsolidación y extinción .....	59
III.1. ROL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- $\kappa$ B EN LA RECONSOLIDACIÓN Y EXTINCIÓN DE LA MEMORIA.....	61

III.1.1. NF- $\kappa$ B es necesario para la reconsolidación de la memoria de miedo al contexto .....	61
III.1.2. La inhibición de NF- $\kappa$ B facilita la extinción de la memoria .....	70
III.2. ROL DE LA FOSFATASA CaN EN LA EXTINCIÓN Y RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA .....	75
III.2.1. La fosfatasa CaN es necesaria para que ocurra la extinción de la memoria	76
III.2.2. La fosfatasa CaN no sería necesaria para que ocurra la reconsolidación de la memoria .....	81
III.2.3. CaN inhibe a NF- $\kappa$ B cuando se induce la extinción de la memoria.....	83
III.3. ROL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NFAT EN LA EXTINCIÓN Y LA RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA.....	84
III.3.1 El factor de transcripción NFAT es necesario para que ocurra la extinción de la memoria .....	84
III.3.2. El factor de transcripción NFAT no estaría implicado en la reconsolidación de la memoria .....	89
III.3.3. CaN activa a NFAT, y no a la inversa.....	92
CAPÍTULO IV .....	95
NF- $\kappa$ B, CaN y NFAT en la consolidación .....	95
IV.1. NF- $\kappa$ B es necesario para la consolidación de la memoria de miedo contextual	97
IV.2. Calcineurina actúa como limitante negativo de la consolidación de la memoria de miedo contextual.....	101
IV.3. La facilitación de la memoria dada por la inhibición de calcineurina es dependiente de la activación de NF- $\kappa$ B.....	103
IV.4. NFAT no actuaría como limitante negativo en la consolidación de la memoria de miedo contextual.....	107
CAPÍTULO V .....	111
Rol de NF- $\kappa$ B en la plasticidad estructural. Consolidación y reconsolidación .....	111
V.1. La consolidación de una memoria de condicionamiento de miedo contextual induce cambios en la densidad de espinas en dendritas basales y apicales de la región CA1 .....	114
V.2. El aumento en la densidad de espinas apicales luego de un aprendizaje es dependiente de NF- $\kappa$ B .....	116
V.3. El aumento en la densidad de espinas en dendritas basales y apicales de la región CA1 observado 24 h luego del entrenamiento sigue presente 48 h después del entrenamiento .....	118
V.4. El aumento de la densidad de espinas en dendritas apicales de la CA1 debido al aprendizaje se ve impedido con la inhibición intrahipocampal de NF- $\kappa$ B luego de la reactivación de la memoria.....	120
CAPÍTULO VI.....	125
Discusión .....	125
VI.1 Sobre el <i>switch</i> de factores de transcripción entre la reconsolidación y extinción de la memoria .....	127

VI.2	Sobre CaN, NF- $\kappa$ B y NFAT y sus relaciones .....	128
VI.3	Sobre la competencia entre reconsolidación y extinción .....	130
VI.4	Sobre amnesias permanentes y transitorias, y su aplicación al tratamiento de desórdenes de miedo.....	131
VI.5	Sobre el papel del hipocampo en la extinción.....	133
VI.6	Sobre el papel de calcineurina como limitante negativo en procesos de memoria.....	134
VI.7	Sobre la comparación de procesos mnésicos con LTP / LTD.....	136
VI.8	Sobre la plasticidad morfológica.....	137
VI.9	Sobre la naturaleza de la extinción.....	140
Conclusiones.....		145
Referencias .....		147





# Abreviaturas

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AP-1:	Proteína activadora 1, del inglés <i>activating protein 1</i>
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
BDNF:	Factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés <i>brain derived neurotrophic factor</i>
CaMKII:	Proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina de tipo II, del inglés <i>Ca<sup>++</sup>/calmodulin dependent protein kinase II</i>
CaM	Calmodulina
CaN:	Calcineurina (=PP2B)
CREB:	Proteína de unión al elemento que responde a AMP cíclico, del inglés <i>cAMP response element binding protein</i>
Dec:	$\kappa$ B-Decoy
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DOR:	Densidad óptica relativa
E:	Hace referencia a animales que recibieron el protocolo de extinción
EC:	Estímulo condicionado
EGR:	Factor de respuesta a crecimiento temprano, del inglés <i>early growth response factor</i>
EI:	Estímulo incondicionado
EMSA:	Ensayo del cambio en la movilidad electroforética, del inglés <i>electrophoretic mobility shift assay</i>
FK:	FK506
FT:	Factor de transcripción
FTs:	Factores de transcripción
IKK:	Quinasa de I $\kappa$ B
I $\kappa$ B:	Proteína inhibitoria $\kappa$ B
LTD:	Depresión de largo término, del inglés <i>long term depression</i>
LTP:	Potenciación de largo término, del inglés <i>long term potentiation</i>
MAPK:	Proteína quinasa activada por mitógenos, del inglés <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCT:	Memorias de corto término
mDec:	$\kappa$ B-Decoy con una base mutada (ver Materiales y métodos)

MLT:	Memorias de largo término
MMP:	Metaloproteasas de la matriz extracelular, del inglés <i>matrix metalloproteinases</i>
NCAM:	Molécula de adhesión celular neural, del inglés <i>neural cell adhesion molecule</i>
NGF:	Factor de crecimiento nervioso, del inglés <i>nerve growth factor</i>
NFAT:	Factor nuclear de células T activadas, del inglés <i>nuclear factor of activated T cells</i>
NFAT <sub>inh</sub> :	Inhibidor del FT NFAT (ver Materiales y métodos)
NF- $\kappa$ B:	Factor nuclear kappaB, del inglés <i>nuclear factor kappaB</i>
NLS:	Señal de localización nuclear, del inglés <i>nuclear localization signal</i>
PKA:	Proteína quinasa dependiente de AMPc, del inglés <i>cAMP dependent protein kinase</i>
PKC:	Proteína quinasa C, del inglés <i>protein kinase C</i>
PP1:	Proteína fosfatasa I, del inglés <i>protein phosphatase I</i>
PP2B:	Proteína fosfatasa 2B, del inglés <i>protein phosphatase IIB (=CaN)</i>
R:	Hace referencia a animales que fueron reexpuestos por 5 min al contexto de entrenamiento
RC:	Respuesta condicionada
RI:	Respuesta incondicionada
RHD:	Dominios homólogos a Rel, del inglés <i>Rel homology domains</i>
SEM:	Error estándar de la media, del inglés <i>standard error of the media</i>
T <sub>CTX</sub> :	Sesión de evaluación de la memoria contextual
T <sub>CUE</sub> :	Sesión de evaluación de la memoria de clave
TNF:	Factor necrótico de tumores, del inglés <i>tumor necrosis factor</i>
TR:	Entrenamiento
Veh:	Vehículo
YFP:	Proteína fluorescente amarilla, del inglés <i>yellow fluorescent protein</i>
1SH:	1 choque eléctrico
3SH:	3 choques eléctricos

# CAPÍTULO I

## Introducción general



## I.1. Aprendizaje y memoria

Toda aquella información que uno adquiere a lo largo de la vida, y que luego puede servirnos en algún otro momento para guiar nuestro comportamiento, forma parte de lo que coloquialmente llamamos aprendizaje y memoria. Esa capacidad de aprendizaje y memoria representa un gran valor adaptativo para un individuo pues le permite resolver situaciones nuevas en base a experiencia previa, lo que claramente aumenta las probabilidades de éxito, y en casos extremos, de supervivencia.

Desde el punto de vista de la psicología experimental, un aprendizaje implica la adquisición de información del entorno durante una experiencia comportamental. Desde un punto de vista neurobiológico, se define aprendizaje como el proceso a través del cual una experiencia comportamental se codifica espacio-temporalmente en circuitos neuronales. La memoria es la capacidad de retener esa información en el tiempo, manteniéndola disponible para ser eventualmente recuperada o evocada, permitiendo guiar el comportamiento. Más formalmente, la memoria es entendida como el almacenamiento de la información adquirida mediante cambios en las propiedades reactivas de las neuronas. Estas representaciones internas, entendidas como cambios físicos en los circuitos neuronales subyacentes al aprendizaje, pueden tener distinta duración (Kandel *et al.*, 2000; Dudai, 2002b; Dudai, 2002a).

Por definición, no obstante, no todas las representaciones internas que guían el comportamiento son memorias. Existen también aquellas innatas, codificadas genéticamente y establecidas en el desarrollo, es decir no adquiridas mediante un aprendizaje (Dudai, 2002b).

## I.2. Condicionamiento *pavloviano* de miedo

Uno de los tipos de aprendizaje más elementales es aquel que consiste en aprender de un *único estímulo* (memorias no asociativas). Por ejemplo, es el caso de la habituación, que se caracteriza por la disminución de la probabilidad o intensidad de respuesta ante la presentación repetida de un estímulo determinado. El estudio de este tipo de memorias es imprescindible para la comprensión y estudio de memorias más complejas. No obstante, considerando que vivimos en un mundo donde para cualquier ser vivo los estímulos son innumerables, resulta muy enriquecedor también el estudio de la respuesta animal ante la presentación de más de un estímulo, y por ende, la eventual asociación entre estímulos (memorias asociativas). Estos estudios datan de hace más de

cien años, cuando Pavlov<sup>1</sup> comenzó a indagar sobre la respuesta de un animal (en ese caso un perro) que ante la presentación reiterada de un estímulo neutro (sonido de campana) seguida de la presentación de un refuerzo (comida), generaba luego una respuesta anticipada (salivación) ante la sola presentación del sonido de la campana. Este experimento fundacional de la psicología experimental resultó una herramienta muy importante para la neurobiología de la memoria y dio lugar a un sinnúmero de trabajos basados en el que luego sería formulado como un modelo de condicionamiento clásico (Sweatt, 2003).

En los últimos años se ha avanzado mucho en cuanto al conocimiento de características comportamentales y mecanismos neuronales de la adquisición de memorias de miedo. Parte de este progreso se debe a la utilización por parte de muchos investigadores del mismo modelo de estudio de comportamiento como paradigma de memoria, el condicionamiento *pavloviano* de miedo (Wehner y Radcliffe, 2004). En una definición más formal, dicho condicionamiento es una forma de aprendizaje que consiste en la presentación de un estímulo neutro (estímulo condicionado, EC) al que lo sucede la presentación de un estímulo innatamente aversivo para el individuo (estímulo incondicionado, EI). El EI puede producir en el individuo la generación de una primera respuesta refleja o innata denominada respuesta incondicionada (RI). Ante los sucesivos ensayos de EC-EI, el animal detecta la contingencia entre los mismos, le asigna un valor predictivo al EC, y la RI puede transformarse entonces en una respuesta condicionada (RC), de manera que la sola presentación del EC puede desencadenar la RC. Un ejemplo de condicionamiento clásico muy utilizado actualmente es el de condicionamiento de miedo al contexto o a un tono (del inglés, *contextual fear conditioning / cued fear conditioning*), en el que el sujeto experimental, típicamente un ratón o una rata, es colocado en una caja con determinadas características contextuales (EC<sub>1</sub>); luego de un tiempo de habituación, puede presentarse o no, un tono (EC<sub>2</sub>) que finaliza conjuntamente con un choque eléctrico suave en las patas (EI). Ante dicha situación, los animales suelen responder inicialmente con una locomoción mayor, o con un comportamiento de congelamiento (del inglés, *freezing*; RI). Si el animal vuelve a ser colocado en su caja de alojamiento, y un tiempo después se lo vuelve a colocar en la misma caja de entrenamiento (EC<sub>1</sub>) o en otra diferente pero se le presenta el tono (EC<sub>2</sub>), el mismo muestra un conjunto de comportamientos de miedo, entre ellos el de *freezing*

---

<sup>1</sup> Iván Petróvich Pavlov (1849-1936), fisiólogo y psicólogo ruso.

(RC), y así, evidencia la memoria de la asociación EC-EI (Blanchard y Blanchard, 1969). La existencia de un condicionamiento de miedo puede también ser evaluada ante la presentación del EC utilizando otros parámetros además del *freezing*, por ejemplo un incremento en la presión sanguínea, cambios en la respiración, respuestas de sobresalto ante otros estímulos, evitar el lugar en donde ocurrió el evento aversivo, entre otros (LeDoux, 2000).

Este paradigma de condicionamiento de miedo es utilizado en la presente Tesis como modelo de memoria, por lo que volveremos sobre él más adelante.

### I.3. Tipos de memoria

Muchos de los avances que se han realizado sobre el aprendizaje y la memoria han sido llevados a cabo utilizando animales de experimentación. Sin embargo, históricamente algunos de los avances más relevantes en el campo de la neurobiología de la memoria surgieron de estudios en humanos, más específicamente en pacientes con alguna patología como epilepsia o accidentes cerebrales [revisado en (Milner *et al.*, 1998)].

El primer caso más conocido y revelador, estudiado por Brenda Milner<sup>2</sup> y William Scoville<sup>3</sup>, fue el del paciente HM, quien sufrió una remoción bilateral del lóbulo temporal medial, incluyendo la formación hipocampal, corteza entorrinal, perirrinal y amígdala, con la intención de disminuir sus ataques de epilepsia. A pesar de que los ataques efectivamente disminuyeron, el paciente HM presentó un profundo déficit de memoria bastante específico. Si bien conservaba intacta la memoria de muy corto plazo (segundos o minutos), no podía transferirla a una memoria más duradera o permanente (denominada amnesia **anterógrada**). A su vez tenía cierto grado de amnesia para la información adquirida en los años cercanos a la cirugía (denominada amnesia **retrograda**). Retenía por un período de tiempo muy corto la nueva información relacionada a lugares, personas u objetos, y además, tenía grandes dificultades de orientación espacial, tantas que le tomó casi un año reconocer los lugares de su nueva casa. Sin embargo, había otras habilidades cognitivas o mnésicas que no se vieron alteradas. Recordaba su nombre y eventos de su niñez, y su vocabulario y

---

<sup>2</sup> Brenda Milner fue colaboradora de Wilder Penfield, cirujano que en 1950 comenzó a realizar remociones de distintas zonas cerebrales para reducir ataques de epilepsia. Los síntomas de amnesia presentados por sus pacientes fueron determinantes para el estudio de la memoria.

<sup>3</sup> William B. Scoville, fue el cirujano que operó a H.M., y que luego de enterarse de los estudios de Milner y Penfield, continuó el estudio con la primera.



coeficiente intelectual no se perjudicaron, a la vez que su capacidad atencional permaneció intacta [revisado en (Milner *et al.*, 1998)].

En base a esta sintomatología observada, se realizó una de las primeras clasificaciones existentes sobre *tipos* de memorias [revisado en (Sweatt, 2003)]. Dentro de las memorias que se consideran duraderas en el tiempo están las memorias **explícitas** (también llamadas declarativas) y las **implícitas** (también llamadas no declarativas). Las memorias explícitas, que incluyen todo tipo de memoria que implica en humanos un proceso consciente, se subdividen en dos grupos, las **semánticas** (hechos; memorias acerca del conocimiento del mundo) y las **episódicas** (eventos; recuerdos conscientes de eventos pertenecientes al pasado propio de cada persona). Por su parte, las memorias implícitas son aquellas de las que no se tiene conciencia de que se hacen o se aprenden, como tareas automáticas, hábitos o tareas que no requieren comparación ni evaluación, por ejemplo andar en bicicleta. En función de los síntomas mnésicos presentados por HM y otros pacientes, se determinó que la memoria explícita, y no la implícita, depende del lóbulo temporal medial (Sweatt, 2003).

Algunas de estas definiciones originales de la memoria presentan dificultades a la hora de investigar en animales no humanos los mecanismos neurales subyacentes. El problema radica en que la clasificación realizada implica determinar un estado de conciencia, y no fue recién hasta hace poco que se empezó a estudiar la conciencia en roedores (Kepecs *et al.*, 2008; Abbott, 2010). Además, por definición, las memorias declarativas dependen del lóbulo medial temporal (que incluye el hipocampo). Es claro que esta área cerebral está involucrada en varios tipos de memorias en estos animales, pero eso no implica necesariamente procesos conscientes. Asimismo, casi todas las memorias tienen un componente dependiente del lóbulo temporal medial en cuanto siempre hay un contexto en el que se las adquiere. La mayoría de los neurobiólogos (excepto los que tienen a los humanos como sujetos experimentales) estudian mecanismos neurales subyacentes a la memoria sin pretender encasillarla en este tipo de clasificación particular.

Los estudios realizados en humanos con patologías o lesiones cerebrales dieron lugar también a la idea actualmente aceptada, de que existen **múltiples sistemas de memorias**. Así, la palabra “memoria” sería sólo un nombre genérico que engloba varios sistemas de cognición y comportamiento. Estos distintos componentes de la memoria a veces interactúan entre sí, o a veces resultan totalmente independientes, requiriendo de distintas zonas cerebrales para su adquisición, almacenaje y evocación [identificables en

humanos con lesiones en regiones determinadas; (Tulving, 1987)]. Por ejemplo, si bien H.M. presentaba claros síntomas de inhabilidades para aprender tareas de comparación, pudo resolver perfectamente tareas que involucraban habilidades motoras complejas como la tarea de dibujo en espejo [Milner 1962, revisado en (Milner *et al.*, 1998)]. Estos estudios dieron fundamento neurobiológico a postulados filosóficos en los que ya se diferenciaba una memoria del *qué* (explícita) y una memoria del *cómo* [implícita o de procedimiento; Gilbert Ryle, 1949, revisado en (Milner *et al.*, 1998)].

Asimismo, de los estudios en pacientes surgió a su vez la necesidad de caracterizar las memorias en base a su duración en el tiempo. Las memorias pueden durar desde segundos a días, o incluso toda la vida de un individuo, dependiendo de la fuerza y frecuencia del estímulo que les dio origen y de la relevancia de la información que codifican. Distinguimos entonces las **memorias de corto término** (MCT), de las **memorias de largo término** (MLT). Es importante mencionar que, si bien es posible caracterizar y diferenciar cada una en base a diferentes criterios, estas son parte de un proceso gradual, no discreto de adquisición y almacenamiento de información. ¿Qué implica decir **corto** o **largo término**? Depende del enfoque de estudio: para un médico neurólogo **largo término** podría significar unos minutos, mientras que para un neurofisiólogo, meses o años. Para los neurobiólogos celulares y moleculares que investigan en animales no humanos, por convención, implica tiempos mayores a 24 h (Dudai, 2002a).

## I.4. Fases de la memoria

### I.4.1. Consolidación

Otra de las grandes contribuciones de los estudios realizados en humanos fue el aporte de la idea de **consolidación de la memoria**. A principios del siglo XX, Müller y Pilzecker realizaron una serie de experimentos de interferencia en humanos sin patologías cerebrales, de los que concluyeron que luego de un entrenamiento existe un proceso interno que fija las asociaciones que se han formado, al que le asignaron el término de *consolidación* (Lechner *et al.*, 1999, Maldonado, 2008). Para ese entonces, Ribot<sup>4</sup> (1882) ya había notado que los pacientes con amnesia orgánica global<sup>5</sup> tenían más afectada la memoria de los hechos más cercanos en el tiempo que la de los más

---

<sup>4</sup> Théodule-Armand Ribot (1839-1916).

<sup>5</sup> La amnesia global implica daño en el hipocampo y el sistema límbico en general.

lejanos. Esta idea fue abandonada por más de 50 años hasta que Hebb [revisado en (Maldonado, 2008)] replanteó el estudio y se retomaron a su vez los experimentos en animales no humanos (Duncan, 1949). La presencia de amnesia al introducir un factor de interferencia dentro de un intervalo de tiempo previo o posterior al entrenamiento, pero no cuando se lo presentaba fuera de ese intervalo, se consideró como evidencia de la existencia de un proceso discreto de estabilización de la memoria. Este fenómeno de amnesia dentro de una ventana temporal discreta se comprobó luego en especies muy diversas tanto en invertebrados como en vertebrados, utilizando diversos factores de interferencia. Entre ellos podemos mencionar otros aprendizajes, trauma, inactivación neuronal, lesiones cerebrales, electrochoques convulsivos, hipotermia, inhibidores generales de la transcripción o de factores de transcripción (FTs) específicos, y la inhibición de la traducción o de ciertas vías moleculares específicas [revisado en (Maldonado, 2008; Alberini, 2009)].

Hasta hace algunos años, el término consolidación era utilizado haciendo referencia al proceso necesario para estabilizar la memoria y hacerla perdurable. Justamente este concepto de perdurabilidad era incuestionable: una vez formada, la memoria residiría en cierta/s región/es del cerebro para poder evocarla en el momento necesario. Los estudios de amnesia anterógrada en pacientes con ablaciones en el lóbulo temporal confirmaban esta hipótesis. No obstante, la existencia de una amnesia retrógrada temporalmente *graduada* (limitada a los recuerdos más recientes) daba lugar a su vez a otra incógnita, justamente relacionada con el lugar en donde residirían las memorias más remotas.

Con el tiempo la concepción original de consolidación fue mutando y hoy en día se distingue aquel proceso inicial que permite la estabilización de la memoria en primera instancia, de otros procesos celulares y circuitales que siguen ocurriendo a medida que pasa el tiempo (y sin intervenciones comportamentales). Es decir, una memoria no dependería siempre del mismo lugar del cerebro sino que existirían diferentes localizaciones según la edad de la memoria. Se definió entonces como *consolidación sináptica* o *celular* al proceso inicial en el que ocurren cambios a nivel de expresión génica y de síntesis proteica necesarios para llevar adelante los cambios fisiológicos y morfológicos de largo término. La *consolidación sistémica*, en cambio, implica la reorganización de la información a nivel de circuitos en áreas cerebrales de procesamiento y almacenaje de la información (Dudai, 1996, 2002a; Medina *et al.*, 2008).

### ***1.4.2. Reconsolidación***

La teoría de la consolidación, que establece que la memoria es inicialmente lábil pero luego perdura indefinidamente siendo insensible a agentes amnésicos (McGaugh, 1966; McGaugh y Petrinovich, 1966; Davis y Squire, 1984) comenzó a ser cuestionada con algunos trabajos publicados a fines de la década de 1960, ante la evidencia de que una vez evocada y si se presentaba un electrochoque convulsivo, la memoria podía ser bloqueada (Misanin *et al.*, 1968; Lewis *et al.*, 1972; Lewis y Bregman, 1973). Resultados similares se obtuvieron usando como interferencia un choque hipotérmico (Mactutus *et al.*, 1979; Richardson *et al.*, 1982). La presentación de un recordatorio del entrenamiento generaba una *relabilización* de la memoria, haciéndola susceptible de ser bloqueada por los mismos factores de interferencia que afectaban la consolidación. Luego de esta relabilización, se debía atravesar por un nuevo período de *reestabilización*, o reconsolidación, que haría perdurar la traza mnésica [revisado en (Maldonado, 2008)].

Considerando sus resultados, Lewis propuso que existiría un estado activo de la memoria en el que la misma sería sensible a agentes amnésicos (estado lábil), y un estado inactivo en el que sería resistente a dichos agentes (estado estable). Según su teoría, la memoria no tendría una dinámica unidireccional en función del tiempo, desde un estado inicial lábil hacia un estado final consolidado, sino que seguiría una dinámica bidireccional. Así, podría pasar desde un estado consolidado a un estado lábil en función de la actividad mnésica [(Lewis, 1979); revisado en Nader 2003].

Estos trabajos con ideas tan innovadoras para ese entonces como la posibilidad de una relabilización de la memoria, quedaron relegados por varios motivos. En primer lugar había trabajos con resultados contradiciendo los hallazgos previamente descritos (Dawson y McGaugh, 1969; Davis y Squire, 1984). Además, existían críticas metodológicas y teóricas a la nueva propuesta. Dentro de las primeras, los agentes amnésicos utilizados eran relativamente inespecíficos. Dentro de las segundas, una de las objeciones teóricas más importantes residía en el *sinsentido* del valor adaptativo del retorno de una memoria ya consolidada a un estado inestable por su simple evocación, con la posibilidad de poner en riesgo la memoria original ante potenciales interferencias. Además requeriría de una nueva inversión energética incluyendo la

activación de procesos celulares y moleculares para su reestabilización en el sistema nervioso. Por último, y no menos importante, el dogma prevalente era muy fuerte.

No obstante, varios grupos de trabajo continuaron estudiando la nueva propuesta. Por ejemplo el de Sara, quien mostró que la presentación de un recordatorio ponía en juego la memoria consolidada, pudiendo ser bloqueada tras su labilización administrando antagonistas de receptores de glutamato tipo NMDA y de receptores beta-adrenérgicos [(Przybyslawski y Sara, 1997; Przybyslawski *et al.*, 1999); revisado en (Sara, 2000)].

A medida que se ahondaba en los procesos celulares involucrados, se encontraban cada vez más similitudes con la consolidación, como por ejemplo activación de receptores, cascadas de señalización, FTs, expresión génica y síntesis de proteínas, dando a parecer que era una recapitulación de la consolidación [revisado en (Sara, 2000; Nader, 2003)]. Además, desde el punto de vista teórico, un vuelco en la interpretación del posible valor adaptativo de dicha fase de la memoria comenzó a ser considerado: al relabilizarse la traza mnésica, la memoria volvería a ser susceptible a la acción de agentes moduladores, con la posibilidad de cobrar un nuevo significado biológico [Sara, 2000; revisado en (Maldonado, 2008)]. Los abordajes utilizando drogas más específicas y en determinadas zonas cerebrales –no sistémicos como los primeros estudios- hicieron que la teoría de la reconsolidación se afianzara cada vez más en la comunidad científica, y la visualización de este proceso en diferentes especies y utilizando diferentes paradigmas apoyó la universalidad del fenómeno (Nader *et al.*, 2000b; Nader *et al.*, 2000a; Debiec *et al.*, 2002; Kida *et al.*, 2002; Pedreira *et al.*, 2002; Tronel y Sara, 2002; Child *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2003; Boccia *et al.*, 2004; Merlo *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2006).

En los últimos años, sin embargo, varios trabajos comparativos entre consolidación y reconsolidación han mostrado diferencias mecánicas entre ambos procesos [por ejemplo (Taubenfeld *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004)], por lo que el término reconsolidación como la simple recapitulación de la consolidación es hoy cuestionado. A pesar de ello se sigue utilizando no sólo por cuestiones históricas sino también por el rol funcional del proceso, que es hacer que la memoria se vuelva estable, nuevamente (Alberini, 2005; Forcato *et al.*, 2011).

Hasta aquí, hemos visto que la reconsolidación se pone de manifiesto normalmente utilizando inhibidores de moléculas o procesos la bloquean (es decir, la

reconsolidación se demuestra por su ausencia). Sin embargo, pocos estudios han dado una explicación a la necesidad de mecanismos que desencadenen el proceso previo, el de la *rehabilitación* o simplemente *labilización* de la memoria. Es decir, se han estudiado diferentes mecanismos involucrados en la reestabilización de la memoria, pero se sabe muy poco aún en qué consiste la desestabilización previa –o simultánea-. Uno de los trabajos que da origen al estudio de la labilización *per se*, es el de Lee y col., que encuentran como necesaria la ubiquitinación de proteínas post-sinápticas y el requerimiento de la actividad del proteasoma, sugiriendo así que la labilización constituiría un proceso de activa degradación de proteínas (Lee *et al.*, 2008).

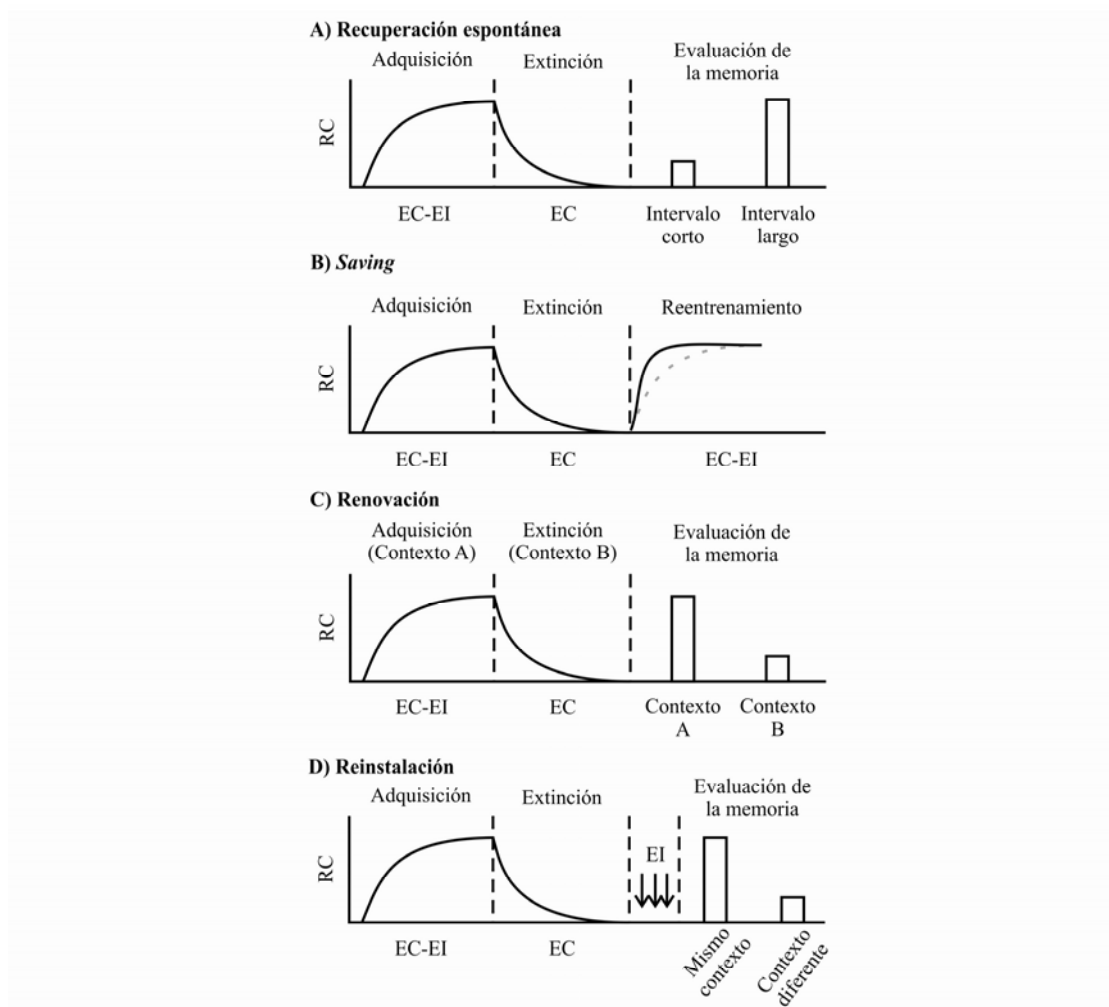
### ***1.4.3. Extinción***

La expresión de memorias de miedo puede ser afectada usando dos estrategias (Lee *et al.*, 2006). En primer lugar, puede bloquearse el proceso de reconsolidación de la memoria, y en segundo lugar puede utilizarse la **extinción**, que está íntimamente relacionada con la reconsolidación de la memoria, pues ambas son disparadas por el mismo estímulo, aunque con diferentes parámetros temporales (Pedreira y Maldonado, 2003; Suzuki *et al.*, 2004). La extinción puede definirse como la reducción o inhibición temporaria de la RC que tiene lugar cuando, luego de establecida una asociación EC-EI, se presenta en forma reiterada o sostenida en el tiempo el EC sin la presencia del EI [revisado en (Myers y Davis, 2002, 2007; Herry *et al.*, 2010)].

Comparado con la consolidación y reconsolidación de la memoria, bastante menos conocimiento se tiene sobre mecanismos como la extinción, a pesar que presentan un desafío muy interesante considerando las implicancias de importancia clínica para el tratamiento de los denominados *desórdenes motivados por el miedo* (del inglés, *fear-motivated disorders*) en humanos, como el Desorden de Estrés Postraumático (del inglés, *Postrumatic Stress Disorder*) y fobias.

Numerosos estudios muestran que la extinción no puede explicarse como un *olvido* de la memoria original (en la literatura inglesa comúnmente denominado *forgetting*), pues requiere la presentación del EC para que ocurra, lo que no ocurre en el olvido, en el que la RC disminuye con el simple paso del tiempo. Sobre todo en memorias de miedo, robustas por su naturaleza aversiva, que pueden durar incluso meses o años sin mostrar olvido (Myers y Davis, 2007; Herry *et al.*, 2010).

Por otra parte, la extinción no es permanente, ya que se observa que, en varias instancias, la memoria aversiva original reaparece, lo que implica que en realidad continúa codificada en el cerebro después de la extinción, sólo que no se expresa. Existen cuatro protocolos conductuales que permiten visualizar la presencia de la memoria original (Figura I.1). En primer lugar, luego de un protocolo que genera extinción, ante el simple paso del tiempo y la nueva presentación del EC, puede evidenciarse nuevamente la presencia de la RC, fenómeno denominado *recuperación espontánea*. En segundo lugar, si en una sesión posterior a la extinción se reentrena a los sujetos a asociar el EC con el EI, se puede observar que readquieren la RC más rápido que si se los entrenara por primera vez. Este fenómeno es conocido en la literatura inglesa como *saving*. En tercer lugar, el fenómeno de *renovación* (del inglés, *renewal*) hace referencia a la reaparición de la RC cuando los sujetos que recibieron el protocolo de extinción son evaluados en un contexto diferente al utilizado para la sesión de extinción. De hecho, se dice que más que aprender que “el EC ya no predice el EI”, los sujetos aprenderían que “el EC, en ese contexto, ya no predice el EI” (asociación EC-noEI). Por último, el fenómeno de *reinstalación* (del inglés, *reinstatement*) implica la reaparición de la RC luego de la exposición a un EI que por sí solo no induciría la RC [revisado en (Myers y Davis, 2002, 2007; Herry *et al.*, 2010)].



**Figura I.1.** Luego de un protocolo que genera una memoria de extinción, la memoria original reaparece bajo ciertas circunstancias experimentales (Myers y Davis, 2007). EC: estímulo condicionado, EI: estímulo incondicionado, RC: respuesta condicionada. Adaptado de (Myers y Davis, 2002).

Si bien está claro que la memoria de extinción no consiste en un olvido, también es claro que es un fenómeno que se resiste a una sola explicación. Existen principalmente tres hipótesis alternativas que aportan mecanismos teóricos para explicar el fenómeno comportamental, que están apoyadas por diversas evidencias experimentales. Las primeras dos, operan desde un marco asociativo. Por un lado, la hipótesis del “desaprendizaje” (conocida en la literatura inglesa como “*unlearning*”) propone que se trata de un debilitamiento progresivo de la memoria original, hasta que finalmente ésta desaparece. Por otro, la hipótesis del “nuevo aprendizaje” propone la generación y reforzamiento de una segunda asociación (inhibitoria sobre la memoria original asociativa EC-EI). La tercer hipótesis descansa en componentes no asociativos



de tipo habituación [revisado en (Myers y Davis, 2007)]. En esta Tesis nos focalizaremos en los componentes asociativos.

Respecto a las evidencias experimentales, el grupo de Gean ha encontrado que luego de un protocolo de extinción se activan eventos moleculares “antagónicos” a los que ocurren durante la consolidación de la memoria original, como por ejemplo la activación de fosfatasas *vs.* quinasas, respectivamente (Lin *et al.*, 2003a; Lin *et al.*, 2003c; Lin *et al.*, 2003b). Estos resultados fueron interpretados por estos autores a favor de la hipótesis del *desaprendizaje*. El grupo de Myers, por su parte, postuló que estos fenómenos de tipo *desaprendizaje* tendrían lugar si el entrenamiento de extinción ocurre temporalmente cerca a la consolidación de la memoria original (Myers *et al.*, 2006). Una de las mayores críticas a esta teoría, sin embargo, reside en que no explica la reaparición de la RC.

La hipótesis más aceptada es la del nuevo aprendizaje inhibitorio sobre la traza original. Existen varios trabajos que muestran que para la desaparición de la RC (extinción) ante la presentación prolongada o repetida del EC, es necesaria la síntesis proteica dentro de una ventana temporal limitada. En caso de aplicarse un inhibidor general de este proceso celular (por ejemplo anisomicina<sup>6</sup>, agente “amnésico” por excelencia utilizado en estudios de la consolidación y reconsolidación de la memoria), la memoria original permanece intacta (Berman y Dudai, 2001; Vianna *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2003b; Pedreira y Maldonado, 2003). La necesidad de este mecanismo celular para la estabilización de la memoria de extinción, hizo pensar en que esta fase necesita a su vez pasar por un proceso de consolidación para perdurar. Como mencionamos anteriormente, en cuanto a mecanismos celulares y moleculares más específicos, la formación de la memoria de extinción (es decir, la adquisición) y su consolidación son procesos menos estudiados que los de la adquisición y consolidación de la memoria original. Los trabajos que muestran coincidencias en los eventos celulares implicados en ambos procesos apoyan la idea de que la extinción es en realidad, un nuevo aprendizaje asociativo (Santini *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009). Para explicar la reaparición de la RC, muchos argumentan que esta nueva asociación EC-noEI deja de expresarse, o porque es más frágil, o porque existen claves temporales -no sólo espaciales- asociadas a ese contexto donde la memoria de extinción tuvo lugar (Myers y Davis, 2002).

---

<sup>6</sup> La anisomicina es un antibiótico producido por *Streptomyces griseolus* que bloquea la síntesis proteica, inhibiendo la actividad de peptidil transferasa en ribosomas eucariotas [Alberts B (1994) Molecular biology of the cell, 3rd Edition. New York: Garland Pub].

Es muy importante mencionar que si bien las descritas son las hipótesis prevalentes hoy en día para explicar la naturaleza de la extinción, han sido formuladas desde un enfoque de psicología experimental que en general no tiene en cuenta el aporte que los estudios de los mecanismos celulares y moleculares pueden realizar a este tema. Retomaremos esta idea en el Capítulo VI correspondiente a la Discusión.

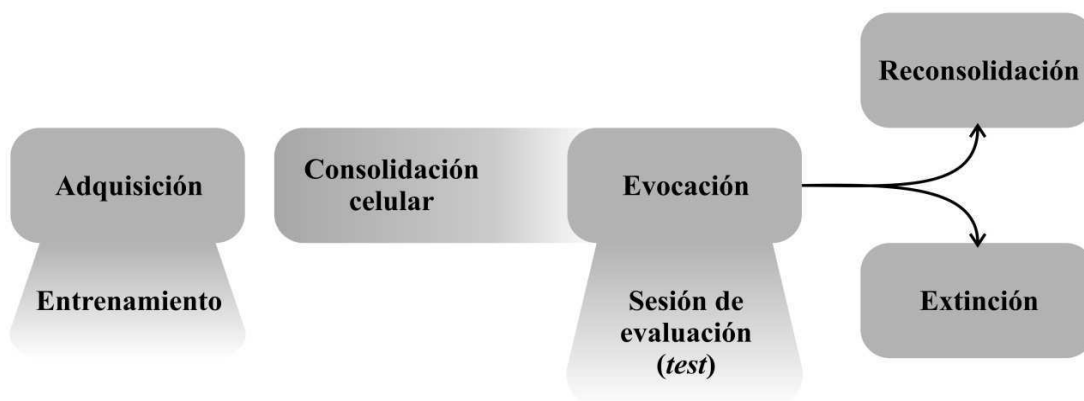
### **I.5. Fases de la memoria. Resumen:**

Recapitulando lo discutido hasta ahora (Figura I.2), una experiencia nueva es codificada en una representación interna inicialmente de manera temporal, gracias a una etapa denominada **adquisición de la memoria**. Para que dicha información permanezca de manera más perdurable en el tiempo, son necesarios también, cambios perdurables. La **consolidación de la memoria** es la fase que involucra estos cambios que ocurren luego del aprendizaje, y que permiten que esta nueva representación interna se estabilice. Se ha demostrado que esta estabilización necesita de expresión génica y síntesis proteica, y que permite eventualmente hacer disponible la información aprendida, mediante el proceso de **evocación** de la memoria. Dependiendo de las características del recordatorio que produce la evocación de un recuerdo, eventualmente pueden desencadenarse a su vez dos procesos con características comportamentales opuestas. Si el recordatorio es producido por la presentación breve del EC en ausencia del EI puede desencadenarse el fenómeno de labilización y **reconsolidación** de la memoria, mientras que si es repetido o prolongado<sup>7</sup>, se desencadena la **extinción**. Actualmente, se propone que el valor adaptativo de ambos procesos se relaciona con la incorporación de nueva información a la memoria original, que en cualquiera de los dos casos le permitirá al animal adecuarse a situaciones cambiantes del ambiente. Respecto a la reconsolidación, su funcionalidad se relaciona a la posibilidad del reforzamiento de memorias preexistentes (Lee, 2008; Forcato *et al.*, 2011; Giachero *et al.*, 2011), y a la posibilidad de incorporación de nueva información relacionada a la original (Lee, 2009; Forcato *et al.*, 2010; Lee, 2010). La extinción tendría el valor adaptativo de no responder *siempre* con respuestas de miedo ante un estímulo que originalmente resultó aversivo pero que luego dejó de serlo.

---

<sup>7</sup> Cuando se estudian memorias contextuales, la inhibición de la RC se consigue por ejemplo con una presentación prolongada del EC<sub>1</sub>, mientras que cuando se estudian memorias de clave, dicha inhibición se consigue con presentaciones breves y reiteradas del EC<sub>2</sub>.

Hasta hace muy poco se pensaba que la consolidación celular duraba pocas horas. En los últimos años se publicaron trabajos muy reveladores que dieron lugar a un nuevo campo de investigación: la **persistencia** de la memoria. En ellos, se demuestra que, sin intervenciones comportamentales (por ejemplo reexposición a alguna clave asociada al entrenamiento), sigue habiendo activación de mecanismos celulares, y que dicha activación es necesaria para que la memoria sea más duradera (Bekinschtein *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2008). Otros trabajos recientes muestran también que el almacenaje de información es un proceso dinámico que con el paso del tiempo sufre modificaciones no necesariamente siempre en el sentido del reforzamiento (Inda *et al.*, 2011).



**Figura I.2.** El aprendizaje ocurre durante una etapa inicial de adquisición. Luego la memoria atraviesa un período de consolidación que se caracteriza por el requerimiento de la transcripción y de la traducción. La evocación de la memoria<sup>8</sup>, dependiendo de distintos parámetros, puede desencadenar dos procesos: la reconsolidación o la extinción.

## I.6. Hipocampo

Varios aspectos de los circuitos neuronales que subyacen al comportamiento de condicionamiento de miedo han sido exhaustivamente estudiados, y hoy en día es claro que este condicionamiento aversivo depende de la integridad de la amígdala (LeDoux, 2000; Maren, 2003). Cuando se trata de la versión contextual, se suma la necesidad de la formación hipocampal tanto para la formación como para la evocación de esa memoria (Phillips y LeDoux, 1992; Fanselow, 2000).

---

<sup>8</sup> En paradigmas como el de condicionamiento de miedo la sesión de evaluación equivale a una evocación de la memoria. En otros, como el paradigma de memoria contexto-señal en cangrejos, para que haya evocación la sesión de evaluación debe cumplir con ciertos requisitos, por ejemplo, la presentación de un EI.

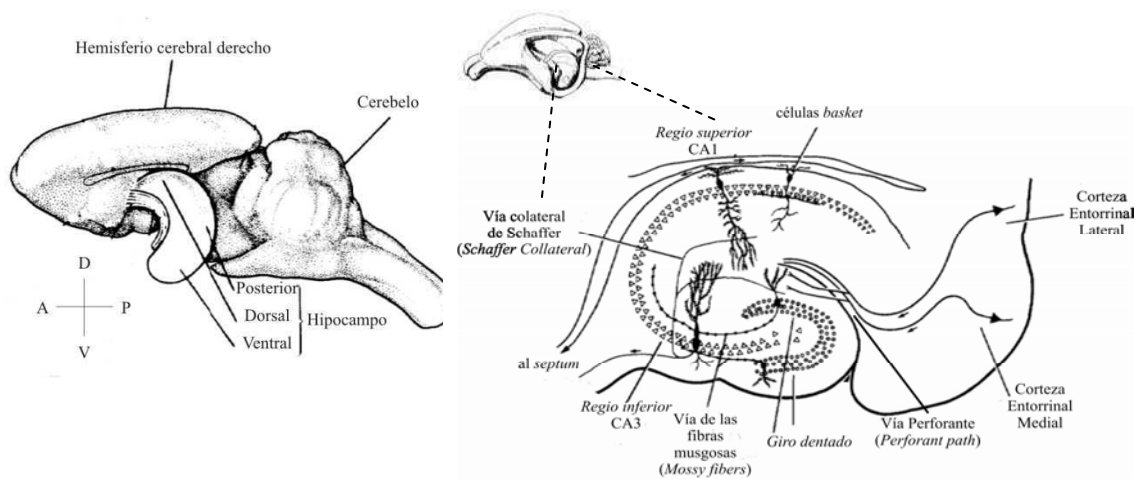
Se piensa que el hipocampo establece la representación sensorial y cognitiva del contexto, que eventualmente será asociada al choque eléctrico tanto en la amígdala [(Anagnostaras *et al.*, 1999; LeDoux, 2000; Anagnostaras *et al.*, 2001), revisado en (Debiec *et al.*, 2002)] como eventualmente en el mismo hipocampo (Boccia *et al.*, 2007). Como veremos más adelante, en esta zona cerebral ocurren los cambios celulares y moleculares que se dan en las primeras horas luego de un aprendizaje, necesarios para la consolidación de estas memorias. Sin embargo, también hay que considerar la *consolidación de sistemas* pues a su vez ocurren cambios adicionales a nivel de circuitos neuronales, que harán que esa memoria que inicialmente dependía del hipocampo, deje de hacerlo, y comience a depender de otras zonas, como la corteza [(Marr, 1971; Anagnostaras *et al.*, 2001), revisado en (Debiec *et al.*, 2002)]. En la literatura se suele referir a estas memorias como memorias **remotas**, para distinguirlas de aquellas de largo término que todavía dependen del hipocampo. Es claro que la *consolidación de sistemas* depende de la *consolidación sináptica* o *celular*, no sólo en el hipocampo sino también en las siguientes zonas de relevo (Debiec *et al.*, 2002).

Dado que en esta Tesis estudiaremos la memoria contextual y el papel que cumple el hipocampo en dicha memoria, describiremos con cierto detalle la anatomía de esta zona cerebral. Esto no quita que otras zonas sean relevantes, como la amígdala mencionada anteriormente, y la corteza prefrontal, entre otras. Esta descripción estará basada en el hipocampo de la rata, pero presenta grandes similitudes con el de ratón (Manns y Eichenbaum, 2006).

El hipocampo presenta una porción anterior dorsal (llamada comúnmente hipocampo dorsal), que a medida que se hace posterior, se lateraliza y ventraliza (hipocampo ventral; Figura I.3 Izquierda). Analizando su estructura interna (Figura I.3 Derecha), se divide en dos grandes sectores en forma de U entrelazadas, el giro dentado (o *area dentata*) y el *hippocampus proper (cornu ammonis)*. Esta última, en base a la morfología celular y proyecciones neuronales, ha sido separada a su vez en dos regiones, una superior *regio superior* y una inferior *regio inferior*. La superior se caracteriza por presentar una doble capa de neuronas piramidales de tamaño medio cuyas dendritas no se ramifican sino hasta alcanzar una distancia considerable del soma, mientras que la inferior contiene células piramidales de mayor tamaño cuyas dendritas comienzan a ramificarse cerca del soma. Inicialmente la *regio superior* fue denominada CA1, mientras que la *regio inferior* fue subdividida en tres regiones más [Lorente de

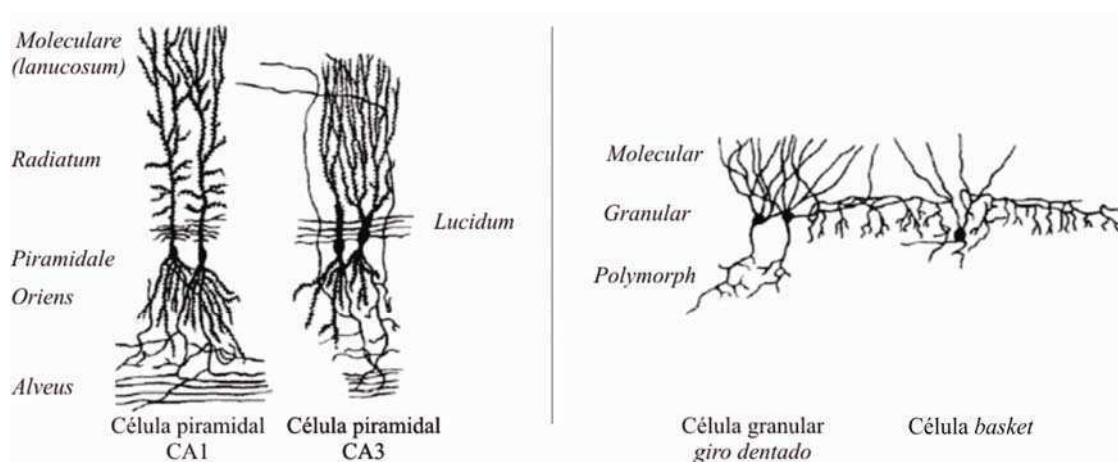
Nó, 1934; revisado en (O'Keefe, 1978)]: CA2, CA3 y CA4. No obstante, actualmente se considera que sólo es identificable la zona CA3 y las neuronas asignadas a la supuesta área CA4 (las células de la “CA4” habían sido incluidas por tener morfología piramidal como las otras, a pesar de no estar ordenadas de manera lineal; las células de la “CA2” habían sido diferenciadas de las de CA3 por una cuestión de conexiones diferenciales, que luego fue desestimada). Las células piramidales se caracterizan por presentar dendritas apicales y basales, mientras que las granulares (como las del giro dentado) sólo presentan dendritas apicales.

Con la excepción de aquellas neuronas denominadas CA4, el patrón tridimensional celular en el hipocampo es el mismo: una hoja ordenada de neuronas cuyos somas se empaquetan uno al lado del otro en una capa, y cuyas dendritas se extienden en una misma dirección, varios cientos de micrones. Además de neuronas, existen interneuronas, por ejemplo la célula *basket* (*basket cell of Cajal*). Sus somas se encuentran dentro o muy cerca de la capa neuronal principal en la que se encuentren, y su axón se mueve en dirección ortogonal a las dendritas de las células piramidales o granulares de dicha capa. A diferencia de las piramidales, no poseen espinas dendríticas apicales ni basales y sus axones no salen de la capa celular de la que forman parte. Existe evidencia fisiológica de que al menos algunas de las interneuronas ejercen un amplio control inhibitorio sobre las células piramidales y granulares.



**Figura I.3.** Izquierda: Esquema de la vista lateral del hipocampo de ratona. El resto de las estructuras cerebrales fue “removido” para visualización de la zona de interés. Centro superior: Esquema similar al de la izquierda que muestra la ubicación del “corte” que se muestra a la derecha inferior. Derecha inferior: Diagrama esquemático de un corte sagital del hipocampo de ratona. Se indican las zonas que conforman el *hippocampus proper* (CA1 y CA3) y el giro dentado. Se indican también las vías de conexión entre las distintas capas/zonas cerebrales. Adaptado de (O'Keefe, 1978).

Tanto el giro dentado como el *hippocampus proper* han sido clasificados también según *estratos o capas*, caracterizadas por compartir algunas características histológicas (y también histoquímicas) comunes de las células que los forman. Particularmente en el *hippocampus proper*, específicamente la zona CA1, pueden distinguirse 5 estratos (Figura I.4). Si bien el estudio histológico/anatómico *en sí mismo* no es de particular interés en esta Tesis, las mismas nos servirán más adelante en los estudios de plasticidad morfológica para identificar a qué capa de células pertenecen las dendritas marcadas con el fluoróforo (Capítulo V).



**Figura I.4.** Izquierda: Esquema de la morfología de neuronas piramidales de CA1 y CA3, y nombres de los *estratos o capas* identificables. Derecha: A modo comparativo se muestra también un esquema de la morfología de neuronas granulares del giro dentado y de las células canasta (interneuronas), así como también los nombres de los *estratos o capas* identificables. Adaptado de (O'Keefe, 1978).

Las células del hipocampo reciben información directa o indirecta de diversas fuentes: a) aferentes intrínsecos del mismo sector, b) aferentes intrínsecos de otros sectores del hipocampo ipsilateral, c) aferentes del hipocampo contralateral, y d) aferentes extrínsecos desde otras zonas cerebrales. Respecto a este último caso, el hipocampo recibe información de varias áreas de la corteza, incluyendo las implicadas en el procesamiento de información visual, la corteza auditiva y la somatosensorial, así como también información directa desde el bulbo olfatorio. Las vías de entrada de información al hipocampo son la corteza perirrinal y entorrinal, ambas en la vecindad anatómica, cerca de la fisura rinal, en el lóbulo temporal. De ambas cortezas, la información proyecta al giro dentado, y luego al *hippocampus proper* (ambas zonas denominadas conjuntamente formación hipocampal). Las neuronas eferentes del hipocampo son las de la región CA1, que proyectan nuevamente a la corteza entorrinal, principalmente a la ipsi y contralateral, y también hacia otras estructuras, o incluso al

mismo hipocampo contralateral. Es importante mencionar que existe conexión entre el hipocampo y la corteza prefrontal, otra área importante involucrada en memoria; no solamente vía cortezas entorrinal y perirrinal sino también por conexiones directas entre ambas estructuras.

Se piensa que hipocampo dorsal y ventral tienen diferentes roles en el procesamiento de la información, por ejemplo el dorsal está involucrado en la memoria espacial/cognitiva, mientras que el ventral procesa información relacionada al estado afectivo y homeostático del animal (Moser y Moser, 1998). En esta Tesis focalizaremos nuestro estudio en el hipocampo dorsal, pues es allí donde se procesa la información involucrada en la memoria en estudio.

## I.6. Mecanismos subyacentes al almacenaje información

En 1894, Santiago Ramón y Cajal<sup>9</sup> [revisado en (Kandel, 2001)] propuso una teoría para el almacenaje de la memoria, basada en que la misma se guarda en conexiones entre las neuronas existentes. Esta idea fue olvidada por más de 50 años, y de hecho otros investigadores propusieron otras que a la luz de los conocimientos actuales parecerían totalmente descabelladas<sup>10</sup>. Una de las ideas que sobrevivió fue la de Lorente de Nó [revisado en (Kandel, 2001)], luego tomada por Hebb para explicar mecanismos de MCT (reverberación de circuitos neuronales). Sin embargo, ninguna de estas teorías tenía un sustento experimental real. Ya en el año 1970 comenzaron a publicarse evidencias claras de que el aprendizaje resulta de cambios en la fuerza de las conexiones sinápticas entre neuronas interconectadas [(Castellucci *et al.*, 1970; Kupfermann *et al.*, 1970); revisado en (Kandel, 2001)]. La **plasticidad sináptica** emergió entonces como un mecanismo fundamental en el almacenaje de información en el sistema nervioso, un mecanismo que involucra la propia arquitectura celular, molecular y estructural de las neuronas.

Hoy en día, está ampliamente aceptado que durante el aprendizaje ocurren cambios reversibles en la transmisión sináptica, y que estos cambios deben ser

---

<sup>9</sup> Texto original: Cajal, S.R. (1894). *La fine structure des centres nerveux*. Proc. R. Soc.Lond. 55, 444–468.

<sup>10</sup> Por ejemplo que la memoria induciría un cambio en la composición de pares de bases del ADN o ARN. [Holger Hyden, citado en Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. Science 294:1030-1038].

estabilizados o consolidados para que una memoria persista. Los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a la formación de la memoria en general, y de las memorias de miedo en particular, han sido ampliamente estudiados. Los cambios temporarios y reversibles hacen referencia a las MCT, mientras que los cambios persistentes, a las MLT.

Existe un gran debate en cuanto a si las MLT se forman en base a las MCT, es decir, si su formación ocurre en serie o en paralelo, y existen evidencias que apoyan ambas hipótesis. Se sabe que en general las MCT se sostienen gracias a la actividad reverberante o repetitiva en ciertos circuitos neuronales, y que es importante la activación de segundos mensajeros como  $Ca^{++}$  y AMPc [revisado en (Sweatt, 2003)]. Estas cascadas de señalización activan proteínas quinasas que generan modificaciones covalentes en proteínas preexistentes. Por su parte, las MLT necesitan de mecanismos celulares diferentes que generan modificaciones celulares más duraderas, por ejemplo transcripción génica y traducción de proteínas, que pueden provenir tanto de la traducción de ARNm (ARNm, ácido ribonucleico mensajero) preexistentes (caso de memorias de duración intermedia), o de la traducción de ARNm recién transcritos (Montarolo *et al*, 1986; Pedreira *et al*, 1996). Estos cambios perdurables podrían valerse de algunas de las modificaciones transitorias generadas en las MCT (Goelet *et al.*, 1986).

No obstante, los cambios moleculares son transitorios, y por ende, insuficientes para explicar por sí solos la naturaleza persistente de la memoria. En otras palabras, el *turnover* de proteínas suele ser más rápido de lo que duran las memorias de largo término. Se postula entonces que como consecuencia de la síntesis de mensajeros y de proteínas, además de producirse más de las mismas moléculas necesarias para alterar la eficacia sináptica en un plazo no muy largo (por ejemplo, canales, receptores, etc.), se producen cambios estructurales en la morfología sináptica (ya sea la remodelación de sinapsis preexistentes, o la formación de nuevas sinapsis). Incluso en algunos modelos se propone a la neurogénesis adulta como mecanismo que contribuye al mantenimiento de memorias (Dudai, 2002a).

#### Quinasas, fosfatasas y factores de transcripción.

Hemos mencionado mecanismos que en su conjunto contribuyen a la formación de una nueva memoria. No obstante, a partir de 1995 comenzaron a aparecer también



trabajos sobre reguladores negativos de la memoria, principalmente haciendo referencia a un potencial mecanismo controlador de la fuerza sináptica, que daría a su vez mayor capacidad regulatoria al sistema (Blitzer *et al.*, 1995; Abel *et al.*, 1998). Se planteó entonces que sería importante el balance entre fosforilación y desfosforilación de determinados sustratos, por la acción de quinasas y fosfatasa respectivamente.

Entre las quinasas más estudiadas en la formación de memorias de largo término podemos mencionar a la proteína quinasa dependiente de AMPc [(PKA, del inglés *cAMP dependent protein kinase A*; (Abel *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000)]; la proteína quinasa C [PKC, del inglés *protein kinase C*; (Jerusalinsky *et al.*, 1994)]; la proteína quinasa activada por mitógenos [(MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinase*; (Kornhauser y Greenberg, 1997)]; la proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina de tipo II [CaMKII, del inglés *Ca<sup>++</sup>/calmodulin dependent protein kinase II*; (Lisman, 1994)]. Entre las fosfatasa, a la proteína fosfatasa I [PP1, del inglés *protein phosphatase I*; (Lisman, 1994)] y la proteína fosfatasa 2B (PP2B, del inglés *protein phosphatase IIB*) o calcineurina [CaN; (Ikegami *et al.*, 1996; Mansuy *et al.*, 1998; Winder *et al.*, 1998; Ikegami y Inokuchi, 2000)]. CaN está presente en dendritas, en estrecha asociación con densidades postsinápticas<sup>11</sup> (Klee *et al.*, 1988) y contrarresta la acción de quinasas como la PKA (Mansuy *et al.*, 1998; Winder *et al.*, 1998). Se ha sugerido que cumple un rol como limitante negativo para la formación de memorias de largo término [para una revisión ver (Malleret *et al.*, 2001)].

Como mencionamos en los párrafos anteriores, una característica biológica importante en la distinción entre MCT de MLT es que la última depende de una fase de síntesis de ARN y proteínas limitada temporalmente. Existen a la fecha cinco familias de FTs críticamente involucradas en la plasticidad sináptica y la formación de memorias, estos son la proteína de unión al elemento que responde a AMP cíclico (CREB, del inglés *cAMP response element binding protein*), la proteína de unión al elemento CCAAT (C/EBP, del inglés *enhancer binding protein CCAAT*), la proteína activadora 1 (AP-1, del inglés *activating protein 1*), el factor de respuesta a crecimiento temprano (Egr, del inglés *early growth response factor*), y el factor nuclear *KappaB* [NF- $\kappa$ B, del inglés *nuclear factor KappaB*; (Alberini, 2009)].

---

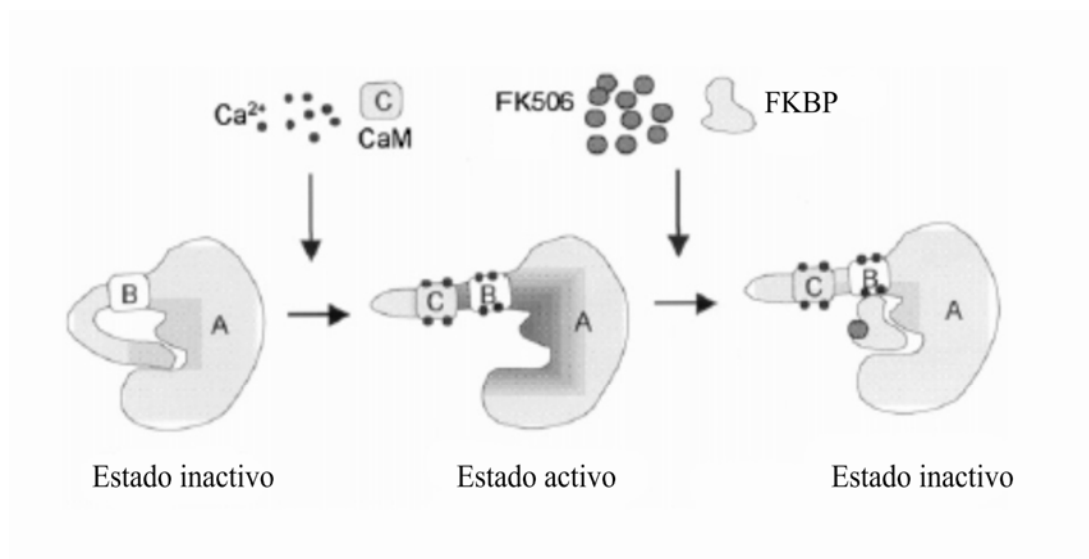
<sup>11</sup> Se denomina densidad postsináptica a un complejo -electrónicamente denso- de proteínas entrelazadas, que se encuentra en la postsinapsis, cerca de la membrana.

**A continuación describiremos con mayor detalle la proteína fosfatasa CaN y los FTs factor nuclear de células T activadas (NFAT, del inglés *nuclear factor of activated T cells*) y NF- $\kappa$ B, ya que en esta Tesis se estudiará el rol de estas proteínas en las distintas fases de la memoria de condicionamiento de miedo al contexto.**

## **I.7. Calcineurina**

Existen cuatro tipos de fosfatasas responsables de la mayoría de la actividad serina/treonina fosfatasa en el cerebro y otros tejidos de mamíferos: PP1, PP2A, PP2B, PP2C. Las subunidades catalíticas de las primeras dos son activas constitutivamente, mientras que la PP2B es dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  y calmodulina (CaM), y la PP2C de  $\text{Mg}^{++}$ . La PP2B, más conocida como CaN, es un heterodímero compuesto por una subunidad catalítica (CaN A) y una regulatoria [CaN B; (Colbran, 2004)].

La activación de CaN por  $\text{Ca}^{++}$  está mediada por dos proteínas capaces de unirse a dicho ion, la subunidad CaN B y la proteína CaM. CaN B y CaM se unen a CaN A por sitios diferentes pero adyacentes y cercanos al dominio catalítico de CaN A, que a su vez, en el estado inactivo, está enmascarado por el dominio autoinhibitorio C-terminal de CaN A. Esta autoinhibición se libera cuando el  $\text{Ca}^{++}$  se une a CaN B y a CaM. Trabajos utilizando digestión proteica sugieren que la unión de  $\text{Ca}^{++}$  a CaN B induce un cambio conformacional en CaN A que genera la exposición del dominio de unión a CaM, indicando cómo CaN B y CaM actúan de manera concertada luego de un aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  (Hemenway y Heitman, 1999; Ikura *et al.*, 2002). Un esquema de la forma de activación de CaN se muestra en la Figura I.5.



**Figura I.5.** Esquema de activación de CaN por  $Ca^{++}$  y CaM. Se esquematiza a su vez el sitio de acción de la droga FK506 utilizada en nuestros experimentos farmacológicos, que tiene como molécula blanco a CaN, mediante la interacción con la proteína receptora endógena FKBP [adaptado de (Sugiura *et al.*, 2001)]. A: Can A; B: CaN B; C: CaM.

CaN es una proteína conservada desde levaduras a humanos. Tanto las levaduras como algunos hongos más complejos, ambos organismos eucarióticos inferiores, han permitido un gran avance en cuanto al conocimiento de las vías de señalización que la involucran. En mamíferos, CaN está involucrada en procesos tan diversos como la activación de células T, función muscular, isquemia, plasticidad neuronal y memoria, entre otros [revisado en (Shibasaki *et al.*, 2002)].

#### Calcineurina en el sistema nervioso. Calcineurina en memoria.

CaN está ampliamente distribuida en varios tejidos de mamíferos, pero su concentración en cerebro es 10-20 veces mayor. Los niveles más altos de expresión se encuentran en el hipocampo (particularmente en la región CA1) y estriado. A nivel intracelular se encuentra tanto en el soma como en las dendritas (Shibasaki *et al.*, 2002).

Ante las sucesivas evidencias de que varias proteínas quinasas están directamente involucradas en procesos de memoria resultó relevante, para comprender acabadamente los mecanismos subyacentes a los procesos mnésicos, estudiar también las proteínas que revierten los efectos de las quinasas -las fosfatasas- en procesos que fueran en detrimento para las memorias originales. Un ejemplo son las memorias cuyos efectos comportamentales son opuestos, como lo es la extinción de la memoria, o incluso en situaciones patológicas como la enfermedad de Alzheimer (Dineley *et al.*, 2007).

La proteína CaN ha sido desde hace varios años considerada un buen candidato para el control de la estabilización de memorias fuertes. Por un lado, es la única fosfatasa sensible a  $\text{Ca}^{++}$  (Klee *et al.*, 1979; Shibasaki *et al.*, 2002) y se activa muy rápidamente ante la presencia de este ion (Rusnak y Mertz, 2000). Se posiciona estratégicamente cerca de canales sensibles a voltaje críticos en el comienzo de la señalización inicial (Smith *et al.*, 2006; Oliveria *et al.*, 2007) o canales dependientes de ligando (Yakel, 1997) y controla varias moléculas involucradas en cascadas de señalización celular tanto en membrana (Coghlan *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2006; Oliveria *et al.*, 2007), como en citoplasma (Winder y Sweatt, 2001) y en núcleo (Kingsbury *et al.*, 2007). Se ha demostrado asimismo su función supresora dominante sobre algunas proteínas quinasas (Oliveria *et al.*, 2007). Además, es un importante regulador de FTs (Hogan y Li, 2005) y eventos nucleares involucrados en el control de la expresión génica, ambos regulados por procesos de fosforilación y desfosforilación (Limback-Stokin *et al.*, 2004).

A lo largo de esta Tesis (Capítulos III, IV y VI) mencionaremos los trabajos más relevantes que sugieren que esta fosfatasa es clave en la regulación de la formación de memorias, y que a la vez, está involucrada en el proceso de extinción.

## **I.8. Factor nuclear de células T activadas**

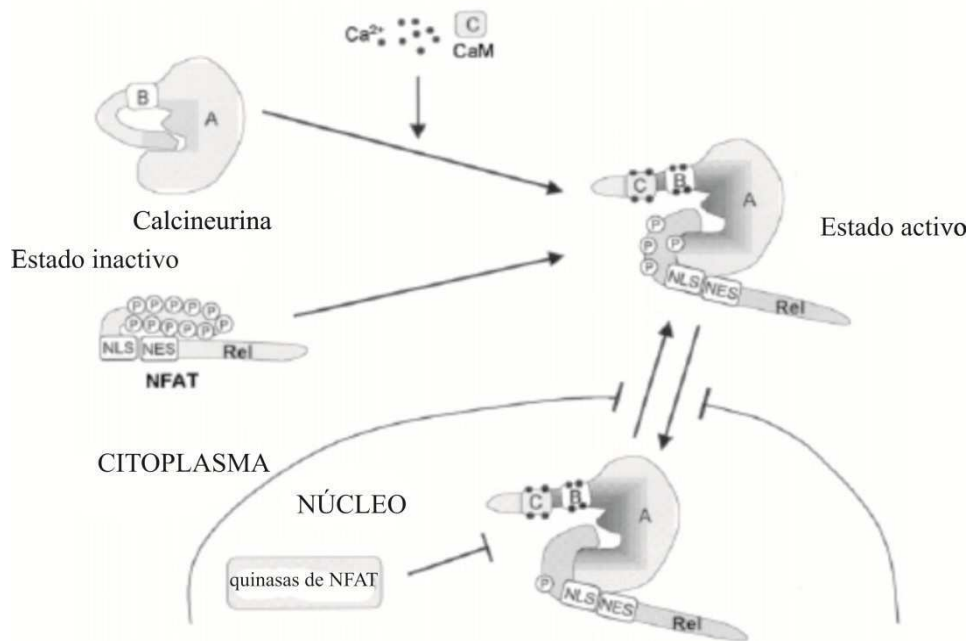
La familia de FTs denominados NFAT, exclusiva de vertebrados, comprende cuatro tipos de proteínas evolutivamente relacionadas a la familia de FTs Rel/NF- $\kappa$ B, numeradas NFATc1-4. Una de las características más interesantes está dada por su regulación dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  y de la fosfatasa de serinas/treoninas dependiente de  $\text{Ca}^{++}$ /CaM, CaN.

CaN posee un sitio de reconocimiento en la región regulatoria conservada de NFATc, que contiene la secuencia consenso específica para esta fosfatasa: PxIxIT<sup>12</sup> (Aramburu *et al.*, 1998). La interferencia en el reconocimiento de dicha secuencia impide la activación de NFAT, así como también la transcripción de sus genes blanco, *in vivo* e *in vitro* (Aramburu *et al.*, 1998; Aramburu *et al.*, 1999). Esta secuencia puede estar presente en otros sustratos de CaN, no siendo exclusiva de NFAT (Aramburu *et al.*, 2000; Czirjak y Enyedi, 2006). Por otra parte, se ha descrito la existencia de otras secuencias de contacto entre ambas proteínas (Martinez-Martinez *et al.*, 2006).

---

<sup>12</sup> P: Prolina, I: Isoleucina, T: Treonina, x: cualquier aminoácido.

Los FTs NFAT o NFATc en su estado inactivo tienen múltiples fosforilaciones en residuos de serina en su dominio regulatorio, y se localizan en el citoplasma (de ahí la letra “c” en su nombre). Ante un estímulo activador que produce entrada de  $\text{Ca}^{++}$  y la consecuente activación de CaN, NFATc es desfosforilado por esta fosfatasa. Se desenmascara entonces la señal de localización nuclear (NLS, del inglés *nuclear localization signal*), transloca rápidamente al núcleo y se desencadena la transcripción de sus genes blanco, constituyendo entonces un claro ejemplo de nexo entre cascadas de señalización de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular y activación de la expresión génica [revisado en (Sugiura *et al.*, 2001; Crabtree y Olson, 2002; Li *et al.*, 2011), Figura I.6]. Además de la desfosforilación de NFATc, la señalización de  $\text{Ca}^{++}$  induce una asociación entre ambas proteínas, de manera que son transportadas de forma conjunta al núcleo, donde CaN continúa desfosforilando al NFATc asociado a ella. Este complejo podría mantener la señal por tiempos más prolongados (Shibasaki *et al.*, 1996).



**Figura I.6.** Esquema de activación de NFAT por CaN [adaptado de (Sugiura *et al.*, 2001). A: CaN A; B: CaN B; C: CaM.

No obstante, una vez en el núcleo, las proteínas NFATc requieren la cooperación de algún otro *compañero* nuclear para iniciar la transcripción, generalmente denominados “NFATn” (n de núcleo). Ejemplos de NFATn son Fos y Jun (de la familia de las proteínas AP-1). Resulta interesante que algunos miembros de la familia NFATc pueden unirse al ácido desoxirribonucleico (ADN) como homodímeros. Esta habilidad

de formar homodímeros está dada por la presencia de dominios de unión al ADN, también conocidos como *dominios homólogos a Rel* (RHD, del inglés *rel homology domains*). NFATc4 no posee la región de estos dominios que permite dimerizar, por lo que no puede formar homodímeros (Groth y Mermelstein, 2007).

La terminación de la transcripción dependiente de NFAT está mediada por cualquiera de las múltiples proteínas quinasas, con actividad constitutiva (casein quinasa 1 y glicógeno sintasa quinasa 3 $\beta$ ) o activables (MAPK p38 o quinasa c-Jun N-terminal), que estimulan el transporte hacia el citoplasma mediante la refosforilación. Si bien todas las NFATc tienen en común la activación mediada por CaN, existen distintos motivos estructurales que les confieren atributos diferentes tanto en cuanto a la unión al ADN como en el tiempo de permanencia en el núcleo (las quinasas inhibitorias son diferentes para cada subtipo de NFATc).

De ahora en adelante nos referiremos a los NFATc simplemente como NFAT, pues el inhibidor que utilizaremos en los experimentos no distingue entre los subtipos “c” (dicho inhibidor no afecta a los NFATn, que sólo se denominan así por ser los compañeros de los “c”, y en rigor cada uno posee otro nombre particular). Sí, en cambio, haremos la especificación “c” cuando hablemos de algún subtipo específicamente.

### NFAT en el sistema nervioso.

Como su nombre lo indica, estos FTs fueron originalmente caracterizados por su rol crítico en la respuesta inmune. Más recientemente, la transcripción dependiente de NFAT ha sido estudiada en otros procesos, como adipogénesis, desarrollo del músculo esquelético, hipertrofia cardíaca, entre otros (Crabtree y Olson, 2002).

La noción de que NFAT podría también estar implicado en el sistema nervioso surgió en el año 1994 cuando dos trabajos mostraron la expresión de NFATc2 en cerebro (Ho *et al.*, 1994; Northrop *et al.*, 1994). Un año después, NFATc4 también fue encontrado expresado en cerebro (Hoey *et al.*, 1995). Particularmente, Graef y col. demostraron que éste se expresa en hipocampo y es activado por la entrada de Ca<sup>++</sup> a través de canales de tipo L (Graef *et al.*, 1999). Éste fue el primer trabajo que implicó un estudio funcional en cerebro, sugiriendo que NFAT estaría implicado en plasticidad sináptica y formación de la memoria. Respecto a este subtipo de NFAT, utilizando técnicas de inmunohistoquímica se encontró que su expresión es ubicua, si bien no

uniforme, en el cerebro adulto de ratón. La mayor expresión fue observada en hipocampo, estriado y cerebelo (Bradley *et al.*, 2005). El ARNm de las otras isoformas también fue encontrado en amplias regiones, solapadas unas con otras. El hipocampo, cerebelo y bulbo olfatorio son ejemplos de zonas que expresan varias isoformas (Groth y Mermelstein, 2007). Como era de esperar, el patrón de expresión de ARNm de NFATc1-4 se superpone ampliamente con el de expresión de CaN (Takaishi *et al.*, 1991).

Es interesante el hecho de que el patrón de expresión de las cuatro isoformas de NFATc se superponga entre sí, ya que sugiere que existe redundancia en las funciones entre las isoformas. Esto es consistente con los leves efectos en el fenotipo que se observan producto de anular alguno de los genes que las codifican. Es importante aclarar, sin embargo, que si bien existe redundancia en el patrón de expresión, eso no implica que haya redundancia también en la expresión de sus genes blanco. Probablemente exista una diferencia que puede estar dada por la diversidad y especificidad de NFATn a los que se une cada isoforma, además de las diferencias en las formas de inactivación, dadas por las distintas quinasas inactivadoras (Groth y Mermelstein, 2007).

Últimamente se han estudiado cada vez más las distintas isoformas de NFAT en cerebro, sobre todo alrededor de su rol mediador de la supervivencia neuronal (Groth y Mermelstein, 2007). Si bien existe un trabajo que estudia su relación con proteínas altamente involucradas en mecanismos de memoria [NFAT parecería estar regulado por el factor neurotrófico derivado del cerebro BDNF -del inglés *brain derived neurotrophic factor* (Groth y Mermelstein, 2003; Groth *et al.*, 2007)], no hay a la fecha otros estudios que focalicen sobre algún posible rol en estos mecanismos. Por este motivo, y también por estar fuertemente vinculado a CaN, es que decidimos estudiarlo en este trabajo de Tesis.

### *Genes blanco de NFAT*

La primera estrategia utilizada para encontrar genes blanco de NFAT y así entender mejor su funcionalidad en el sistema nervioso, ha sido estudiar los genes indirectamente regulados por CaN. Además, como es de esperar, estos genes deben contener en sus regiones promotoras la secuencia consenso a la que potencialmente podría unirse NFAT. Los genes hasta ahora encontrados, que cumplen con esas

características, resultaron ser críticos para funciones relacionadas con señalización celular y plasticidad. En lo que a esta Tesis respecta, es muy interesante el hallazgo de que la expresión de la proteína BDNF se ve influenciada por NFAT (Groth y Mermelstein, 2003; Groth *et al.*, 2007). Por un lado, BDNF estimula su propia expresión vía activación de NFAT, y a su vez, dicha expresión se ve inhibida en presencia de inhibidores de CaN (Groth y Mermelstein, 2003). Por otro lado, el gen murino de BDNF posee en uno de sus promotores la secuencia consenso para NFAT (Vashishta *et al.*, 2009).

## **I.9. Factor nuclear kappa B**

Originalmente descubierto en linfocitos, el factor de transcripción (FT) NF- $\kappa$ B es conocido desde hace tiempo por estar presente también en el sistema nervioso central de mamíferos. Sin embargo, no hace tanto se lo ha relacionado con funciones no patológicas como la mediación de la respuesta transcripcional a la actividad sináptica y en paradigmas comportamentales que involucran aprendizaje y memoria.

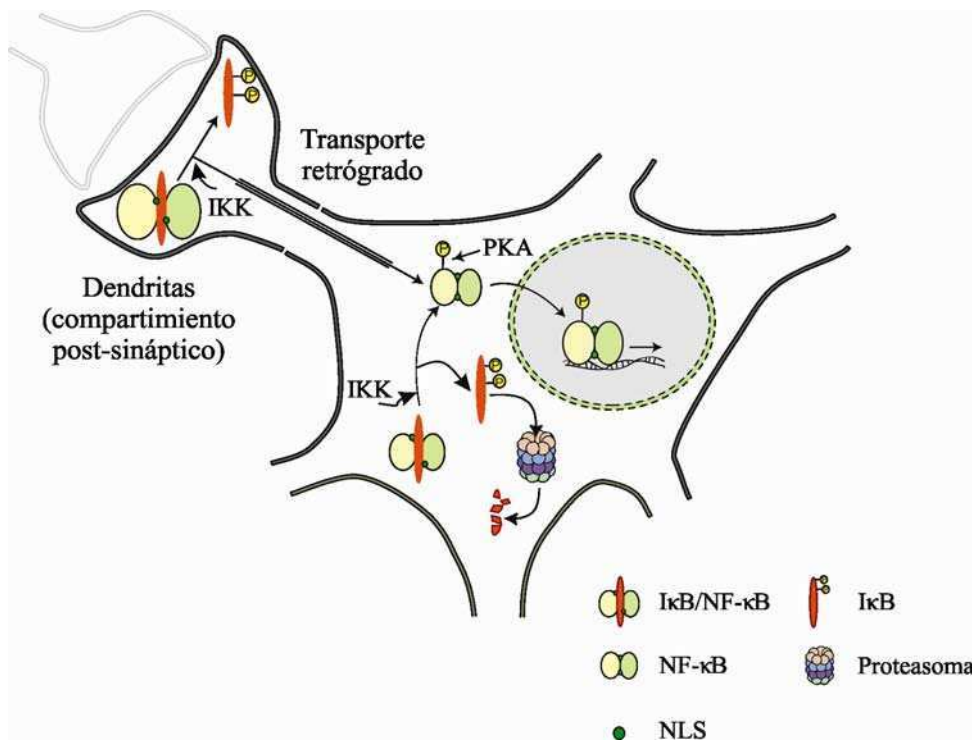
Se trata de proteínas altamente conservadas evolutivamente cuya familia en mamíferos consiste en cinco miembros: Rel B, c-Rel, p65 (Rel A), p50 y p52; los últimos dos, productos del clivaje proteolítico de precursores más grandes. Todos los miembros pueden formar tanto homodímeros como heterodímeros, salvo Rel B que sólo puede formar heterodímeros. El término NF- $\kappa$ B comúnmente se utiliza en la literatura para hacer mención a la combinación p50-p65, una de las más estudiadas y la más abundante en la mayoría de las células (Kaltschmidt *et al.*, 2005; Meffert y Baltimore, 2005).

Las proteínas Rel/NF- $\kappa$ B están relacionadas entre sí por presentar dominios aminoterminales RHD que contienen varios elementos estructurales, como el sitio de unión al ADN, de localización nuclear, de dimerización altamente conservado, y la región de interacción con la *proteína inhibitoria  $\kappa$ B* [ $\kappa$ B, del inglés *inhibitory protein  $\kappa$ B* (Kaltschmidt *et al.*, 2005)]. Los cinco miembros mencionados anteriormente pueden ser clasificados en dos clases según su secuencia carboxiterminal. Mientras que Rel B, c-Rel y p65 (subfamilia Rel) presentan un dominio de transactivación, p50 y p52 (subfamilia NF- $\kappa$ B) no lo poseen.

Cuando no existe estimulación de alguna de las vías activadoras, los dímeros NF- $\kappa$ B se encuentran inactivos en el citoplasma, debido a su unión con proteínas



regulatorias I $\kappa$ B. Existen varios tipos de I $\kappa$ B, siendo I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\beta$  las isoformas más abundantes. Dichas proteínas no sólo enmascaran la señal NLS, cambiándole su conformación espacial y así impidiendo que sea reconocida por las importinas correspondientes, sino que también poseen una señal de exportación nuclear muy fuerte. Ante una estimulación, se activa el complejo quinasa de I $\kappa$ B (IKK) que como lo indica su nombre forforila I $\kappa$ B, disparando la ubiquitinización y posterior degradación de la misma, mediante el sistema de proteasoma [(Kaltschmidt *et al.*, 2005; Meffert y Baltimore, 2005); Figura I.7].



**Figura I.7.** Esquema de la vía canónica de activación de NF- $\kappa$ B. Se muestran tanto la activación del complejo somático como el que reside en terminales dendríticas y que llega al núcleo por transporte retrógrado. Adaptado de (Romano, 2012).

Una gran variedad de estímulos que activan NF- $\kappa$ B en sistema inmune también lo hacen en el sistema nervioso central. Estos incluyen citoquinas (por ejemplo el factor necrótico de tumores TNF, del inglés *tumor necrosis factor*), infecciones virales y estrés oxidativo. NF- $\kappa$ B también puede ser activado por estímulos específicos del sistema nervioso, como la forma secretada de la proteína precursora del  $\beta$ -amiloide, el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *nerve growth factor*) y la neurotransmisión. Dentro de esta última, se sabe activado por algunas vías de transducción de señales asociadas a receptores de neurotransmisores como el glutamato (receptores de tipo

NMDA, AMPA y Kainato) y a la entrada de  $Ca^{++}$ . Esta capacidad de ser activado por actividad eléctrica y transmisión sináptica es importante pues con ella se explica la actividad constitutiva de NF- $\kappa$ B observada en el sistema nervioso y su activación dependiente de actividad neuronal. Además, su activación puede estar mediada por receptores de dopamina de tipo D2, hallazgo realizado utilizando una línea celular de neuroblastoma. Dicha vía podría incluir miembros de la familia de las MAPK [revisado en (Meffert y Baltimore, 2005)].

Existen otras formas en las que la actividad de NF- $\kappa$ B está regulada. Por mencionar algunos ejemplos, la subunidad p65 puede aumentar su actividad de transactivación por fosforilación (Zhong *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2008), o por acetilación (regulando su permanencia en núcleo y aumentando la afinidad por el ADN). A su vez, puede sufrir degradación vía proteasomas nucleares o inactivación por desacetilación (Chen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002).

#### NF- $\kappa$ B en el sistema nervioso. NF- $\kappa$ B en memoria.

Si bien NF- $\kappa$ B ha sido originalmente y sigue siendo profundamente estudiado en procesos de inflamación y de respuesta en la defensa ante algún patógeno, también ha sido demostrada su expresión en el sistema nervioso central y periférico, tanto en neuronas como en glia, siendo el heterodímero p65/p50 y el homodímero de p50 los más comunes en neuronas (O'Neill y Kaltschmidt, 1997; Meffert y Baltimore, 2005).

NF- $\kappa$ B se encuentra expresado ubicuamente en el sistema nervioso (O'Neill y Kaltschmidt, 1997; Bhakar *et al.*, 2002), mostrando una gran actividad constitutiva en algunos tipos neuronales. Particularmente en ratón presenta actividad en neuronas piramidales y granulares del hipocampo. A nivel intracelular, en el soma de las neuronas, NF- $\kappa$ B presenta una distribución perinuclear y en menor proporción nuclear. Uno de los aspectos más intrigantes en los comienzos del estudio de este FT, es que ha sido encontrado en procesos neuronales, sugiriendo su presencia en las sinapsis (Kaltschmidt *et al.*, 1993; Guerrini *et al.*, 1995). Estas evidencias han sido reforzadas con el tiempo utilizando diferentes técnicas y en diferentes especies. Cabe destacar que el único dímero encontrado en esta ubicación subcelular resultó ser p65/p50 (Kaltschmidt *et al.*, 1993; Meberg *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1997; Freudenthal y Romano, 2000; Meffert *et al.*, 2003).

En el sistema nervioso central, los FTs de la familia Rel/ NF- $\kappa$ B están involucrados en respuestas celulares a agresiones como isquemia y trauma; regulación de la apoptosis; desarrollo y crecimiento; desórdenes neurodegenerativos; plasticidad sináptica y memoria.

Si bien los FTs Rel/NF- $\kappa$ B han sido identificados en diferentes especies, muy pocos trabajos estudian estos FTs específicamente en el sistema nervioso de invertebrados. Los trabajos de nuestro laboratorio realizados en el cangrejo *Neohelice granulata*, han sido pioneros en el estudio del rol de NF- $\kappa$ B en memoria, uno de los roles claves de este FT en invertebrados (Romano *et al.*, 2006b). En cuanto a vertebrados, varios estudios demuestran su necesidad tanto en la consolidación (Yeh *et al.*, 2002; Levenson *et al.*, 2004; Freudenthal *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2008) como en la reconsolidación de la memoria (Boccia *et al.*, 2007; Lubin y Sweatt, 2007). A su vez, un estudio de nuestro laboratorio sugiere que durante la extinción, su actividad disminuye y dicha disminución es necesaria para que la misma ocurra (Merlo y Romano, 2008).

#### *Genes blanco de NF- $\kappa$ B*

Existe una gran variedad genes blanco activables por NF- $\kappa$ B (para una revisión más extensa puede consultarse el sitio web de uno de los pioneros en el estudio de este FT, el Dr Thomas Gilmore (<http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>). Teniendo en cuenta la temática de esta Tesis, destacaremos varios genes relacionados a actividad neuronal. Estos incluyen moléculas de adhesión celular como la molécula de adhesión celular neural [NCAM, del inglés *neural cell adhesion molecule*; (Simpson y Morris, 2000)]; factores neurotróficos y de crecimiento como BDNF (Mattson y Meffert, 2006; Lubin *et al.*, 2007) y NGF (Heese *et al.*, 2006); metaloproteasas de la matriz extracelular como MMP3 [del inglés, *matriz metalloproteinase 3*; (Borghaei *et al.*, 2004)] y MMP9 [del inglés, *matriz metalloproteinase 9*; (Bond *et al.*, 1998)]; FTs como ZIF268/EGR-1 (Levenson *et al.*, 2004; Lubin y Sweatt, 2007) y quinasas como PKA [subunidad catalítica; (Kaltschmidt *et al.*, 2006)], entre otros.

## Objetivos e hipótesis

El **objetivo general** de esta Tesis es estudiar en el hipocampo de ratón adulto (*Mus musculus*) mecanismos moleculares y cambios morfológicos implicados en la consolidación, reconsolidación y en la extinción de la memoria de condicionamiento de miedo al contexto.

A partir de los antecedentes presentados en la introducción de este trabajo, planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

- Estudiar el rol de los FTs NF- $\kappa$ B, NFAT y la fosfatasa CaN en las fases de consolidación, reconsolidación y extinción de la memoria, en el hipocampo de ratón adulto.
- Estudiar el rol de NF- $\kappa$ B en la plasticidad morfológica, en las fases de consolidación y reconsolidación de la memoria, en el hipocampo de ratón adulto.

Utilizaremos como abordajes metodológicos, por un lado, el comportamiento y la farmacología, es decir, la inhibición de las proteínas en estudio mediante la inyección de drogas específicas en el hipocampo. Por otro lado, utilizaremos herramientas bioquímicas para evaluar el estado de activación de algunas de las proteínas en estudio, como también el aumento o disminución de los niveles proteicos, buscando un correlato celular/molecular a los resultados comportamentales/farmacológicos.

Como hemos mencionado anteriormente, utilizaremos el paradigma de condicionamiento de miedo, y evaluaremos la memoria tanto contextual como de clave. La forma operativa de hacerlo será estudiar el comportamiento de *freezing* que presenta el ratón ante un recordatorio de la experiencia previa (asociación entre el EC y el EI); si el *freezing* es alto, es indicativo de una buena retención. Ergo, cuando observemos valores de *freezing* bajos en los momentos de la evaluación de la memoria, diremos que no hay retención de la *memoria original*, entendida como la asociación EC-EI. Esto podrá deberse a: **1)** el bloqueo de la consolidación de la memoria (si los inhibidores se aplican antes o después del entrenamiento); **2)** el bloqueo de la reestabilización de la memoria luego de reactivarla (bloqueo de la reconsolidación; si los inhibidores se aplican antes o después del recordatorio que la reactiva); **3)** la evidencia de la presencia de una memoria de extinción (EC-noEI, si es que los animales fueron reexpuestos al recordatorio por un tiempo prolongado).

Respecto a los ítems 2) y 3) es necesario realizar algunas aclaraciones sobre la terminología y los fenómenos en estudio.

- La labilización se trata de un proceso que se desencadena cuando la evocación de la memoria cumple con ciertos requisitos (por ejemplo 5 min de reexposición al contexto de entrenamiento). Por otra parte, consideraremos a la labilización y a la reconsolidación (entendiendo esta última como la reestabilización de la memoria labilizada) como dos procesos que no podemos separar en el sentido de que una experiencia comportamental que induce la labilización de la memoria sí o sí induce su reconsolidación posterior o simultánea (salvo interferencia experimental), y viceversa.
- Asimismo, es necesario definir algunos términos utilizados en esta Tesis, ya que en la literatura se utiliza confusamente la palabra *extinción* para varios de los procesos relacionados al tema (Myers y Davis, 2002 y 2007). Definimos como *protocolo de extinción* al protocolo experimental de presentación prolongada del EC sin la presentación del EI. Si se analiza detalladamente el comportamiento durante el *protocolo de extinción* (y si no se aplican drogas interferentes), se observará una *extinción intra-sesión*, que es la disminución de la RC *durante esa reexposición* prolongada al EC (que suele ser realizada 24 h luego del entrenamiento EC-EI). Por último, definimos simplemente como *extinción* a la evidencia de un *freezing* bajo *durante la evaluación* de la memoria (nueva presentación del recordatorio) realizada un tiempo después (generalmente 24 h) del *protocolo de extinción*.

## Hipótesis

La **primera hipótesis de jerarquía mayor** para esta Tesis es que existe un mecanismo de toma de decisión en el hipocampo que contribuye a definir el curso de la memoria de miedo contextual hacia reconsolidación o extinción. Será evaluada estudiando comparativamente mecanismos celulares que subyacen a la reconsolidación y a la extinción, basándonos en las siguientes hipótesis particulares:

- 1) NF- $\kappa$ B está involucrado no sólo en la estabilización y reestabilización de memorias a largo término [revisado en (Romano *et al.*, 2006a; Alberini, 2009)],

sino también en otras formas de plasticidad, como la potenciación a largo término (Freudenthal *et al.*, 2004). Estos indicios sugieren fuertemente que dicho FT estaría involucrado en el hipocampo en la consolidación y la reconsolidación de la memoria de miedo contextual. A su vez, resultados previos de nuestro laboratorio utilizando un modelo de memoria en invertebrados sugieren que la actividad de NF- $\kappa$ B disminuye luego de un protocolo de extinción, y que dicha disminución es necesaria para que la misma ocurra (Merlo y Romano 2008). Evaluaremos si en nuestro modelo de estudio NF- $\kappa$ B también está involucrado en la estabilización/reestabilización de memorias. Por otra parte, evaluaremos si su inhibición o activación es necesaria para la extinción. Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, y la universalidad de ciertos procesos, nuestra hipótesis es que la activación de NF- $\kappa$ B no será necesaria para la extinción.

- 2) En base a evidencias previas que sugieren que CaN estaría involucrada en la fase de extinción (Lin *et al.*, 2003c; Baumgartel *et al.*, 2008; Havekes *et al.*, 2008), en esta Tesis proponemos que dicha fosfatasa efectivamente es necesaria en el hipocampo para el proceso de extinción de la memoria de miedo contextual. Esto apoyaría la idea de que la extinción involucra, en el hipocampo, un debilitamiento activo de la memoria original.
- 3) Extinción y reconsolidación presentan respuestas comportamentales opuestas. Siendo nuestra hipótesis principal sobre la naturaleza de la extinción la de un debilitamiento activo, pondremos a prueba la hipótesis de que existe un *switch* a nivel molecular que determina que sea una u otra forma de memoria la que tome el control del comportamiento. Teniendo en cuenta las características moleculares y de funcionamiento de CaN y de NF- $\kappa$ B, proponemos que CaN tendría un papel clave en este *switch* molecular. Esta hipótesis, si bien contribuye a la evaluación de la *primera hipótesis de jerarquía mayor*, es una de las de mayor impacto y originalidad de la Tesis.
- 4) Además del rol inhibitorio sobre los mecanismos transcripcionales necesarios en la reestabilización de la memoria, postulamos que CaN tendría un papel activo en la regulación transcripcional necesaria en la extinción.

Evaluaremos el rol de un FT que se activa por dicha fosfatasa, el NFAT; no sólo en extinción, sino también a nivel comparativo (para continuar probando la *primera hipótesis*) en la reconsolidación de la memoria. Estos experimentos representan los primeros en el estudio del rol de este FT en procesos de memoria. La verificación de esta hipótesis sugeriría que el mecanismo de toma de decisión planteado implicaría un cambio en la regulación transcripcional.

Una *segunda hipótesis de jerarquía mayor*, que se desprende de las anteriores, es que CaN actúa como limitante negativo de la estabilización de memorias. Predecimos que su inhibición facilitaría la consolidación de la memoria.

Una *tercera hipótesis de jerarquía mayor* es, en términos generales, que la plasticidad sináptica subyacente a la memoria involucra cambios morfológicos en las zonas cerebrales involucradas. Nos basaremos en evaluar las siguientes hipótesis particulares:

- 1) En los procesos de consolidación y reconsolidación de la memoria de miedo contextual estarían involucrados cambios morfológicos, como el aumento de densidad de espinas dendríticas, en el hipocampo dorsal.
- 2) Dado que NF- $\kappa$ B está involucrado en la formación de nuevas sinapsis (Gutierrez *et al.*, 2008; Russo *et al.*, 2009; Boersma *et al.*, 2011), que tiene como blanco varios genes relacionados a la remodelación de la matriz extracelular [por ejemplo MMP3 y MMP9 (Bond *et al.*, 1998; Borghaei *et al.*, 2004)] y moléculas de adhesión como NCAM (Simpson y Morris, 2000), y que se encuentra en terminales sinápticas (Kaltschmidt *et al.*, 1993; Meberg *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1997; Freudenthal y Romano, 2000; Meffert *et al.*, 2003), nuestra última hipótesis es que NF- $\kappa$ B tendría un rol clave en la remodelación de la morfología neuronal durante estos procesos de memoria.

# CAPÍTULO II

## Materiales y métodos





El primer desafío que enfrentamos fue el de utilizar de manera sistemática al ratón *Mus musculus* como modelo animal de estudio de la memoria en nuestro laboratorio. Para incorporar este modelo en el laboratorio y, en particular, para el desarrollo de los experimentos de esta Tesis, pusimos a punto el equipamiento necesario para evaluar la memoria de condicionamiento de miedo, así como también los protocolos en los cuales pudieran estudiarse las fases de consolidación, reconsolidación y extinción de la memoria (Wehner y Radcliffe, 2004). A su vez, pusimos a punto la metodología de implantación de cánulas permanentes en el hipocampo y la técnica de inyección con animales despiertos. Todos, procedimientos nunca antes realizados en nuestro laboratorio.

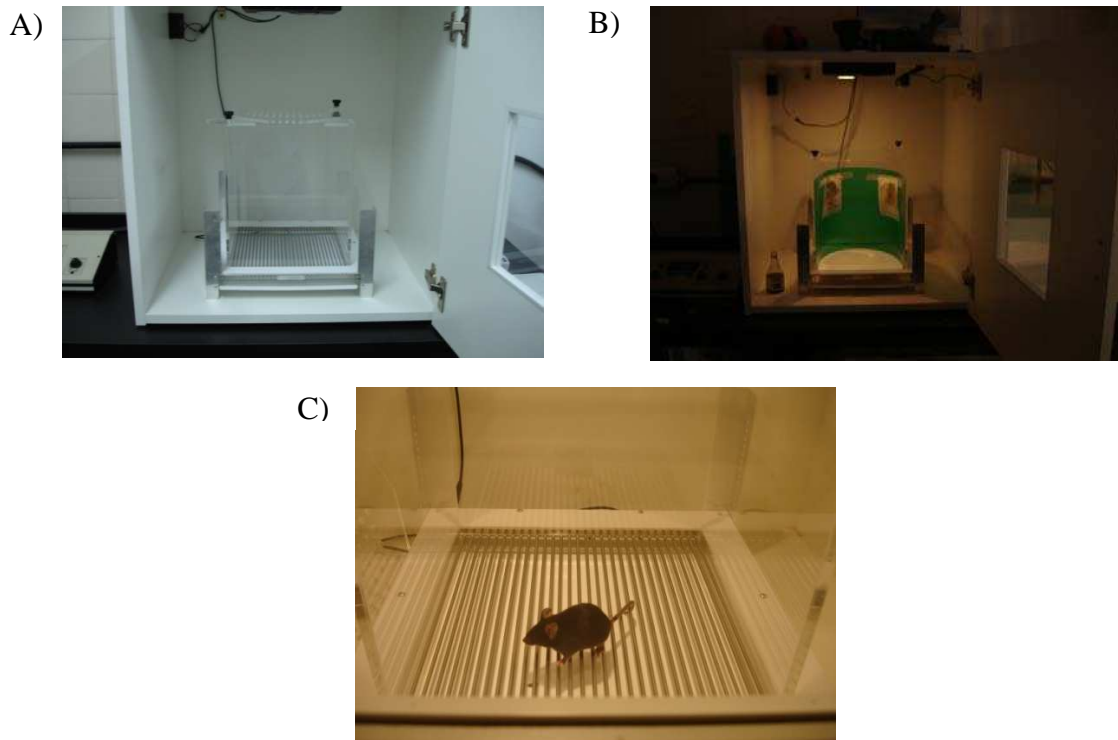
## **II.1. Sujetos experimentales**

Se utilizaron ratones C57BL/6J, machos, de 60–70 días de edad, con un rango de peso entre 25–30 g, obtenidos del bioterio de la Universidad de La Plata y del bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. En nuestro laboratorio, los animales fueron colocados de a grupos –de 5 animales como máximo - en cajas especiales, provistas en su interior de viruta y con comida y agua *ad libitum*. En el caso de ratones canulados, se los colocó en cajas de alojamiento de forma individual para evitar que se sacaran las cánulas mutuamente. Los ratones permanecían en un cuarto acondicionado para tal fin, desde su llegada hasta su sacrificio. Dicho cuarto posee condiciones controladas de luz y temperatura, siendo el ciclo de luz-oscuridad de 12 h (luces encendidas a las 7:00 a.m.), y la temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Los animales eran retirados de dicho cuarto exclusivamente en los momentos de experimento o de cirugía. Los experimentos fueron realizados de acuerdo con las regulaciones de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” (Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.). Committee on Care and Use of Laboratory Animals). En todos los experimentos se intentó minimizar el sufrimiento y el número de los animales utilizados, y además, mantenerlos en condiciones apropiadas para garantizar su bienestar.

## **II.2. Ensayos conductuales. Condicionamiento de miedo**

El modelo de memoria utilizado en esta Tesis es el de condicionamiento de miedo (Wehner y Radcliffe, 2004). Básicamente consiste en que el animal, durante la sesión de entrenamiento, reciba una experiencia aversiva que pueda ser asociada con ciertas características del ambiente en el que recibe dicha experiencia. Indefectiblemente la asociará con el contexto (características del lugar en el que se encuentra), pero también pueden agregarse otras características inocuas, como la presencia de un tono, que también será asociado a la experiencia aversiva. Si este es el caso, puede evaluarse entonces más de una memoria, la memoria de condicionamiento de miedo al contexto (o *memoria contextual*), la memoria de condicionamiento de miedo al tono (o *memoria de clave*), o ambas. Para disociar la memoria contextual de la memoria de clave, esta última debe evaluarse en un contexto diferente al de entrenamiento. Si sólo se desea estudiar la memoria contextual, no es necesario incluir el tono en el entrenamiento. En nuestro caso, evaluamos ambos tipos de memorias.

El aparato donde se realizó el entrenamiento y evaluación de la memoria contextual consiste en una caja de acrílico transparente de medidas 24,5 cm x 24,5 cm x 42 cm (Figura II.1.A,C). Dicha caja se encuentra a su vez dentro de otra caja de mayor tamaño, de madera, blanca, con una ventana transparente en la puerta lateral, por donde se colocan los animales, de a uno, para realizar la tarea. El piso de la caja acrílica consiste en una grilla de barras de acero, paralelas entre sí, de 0,3 mm de diámetro, separadas unas de otras por una distancia de 0,8 mm. Esta grilla está conectada a un dispositivo eléctrico de comando que permite establecer los parámetros básicos característicos de los estímulos utilizados, tales como intensidad del choque eléctrico, duración, etc. (realizada por el técnico Ángel Vidal).



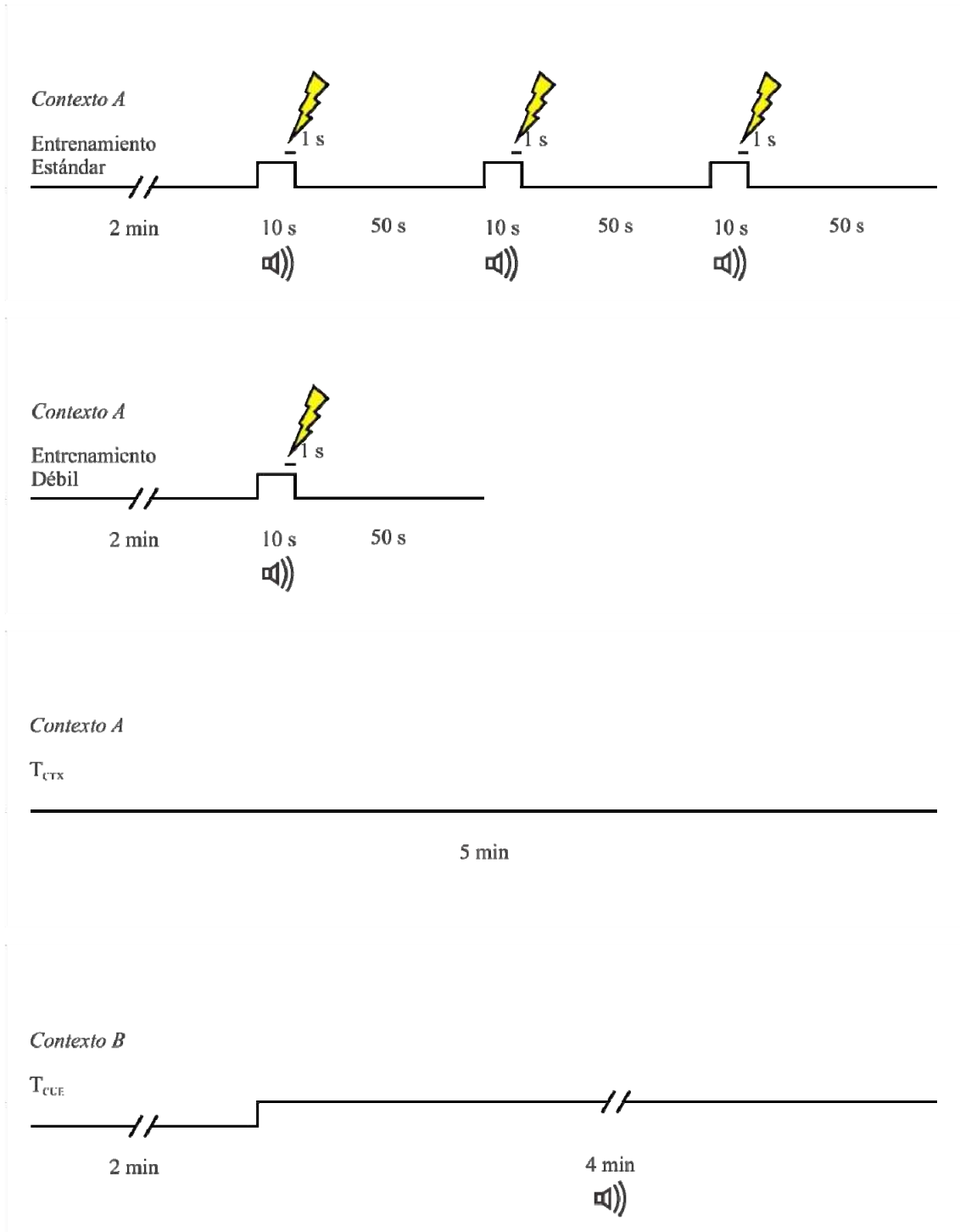
**Figura II.1.** **A)** Se muestra una fotografía de la caja de entrenamiento y evaluación de la memoria contextual  $T_{CTX}$  (Contexto A); **B)** una del contexto B donde se evalúa la memoria de clave ( $T_{CUE}$ ); y **C)** una con un ratón experimental en el contexto A.

Previo al entrenamiento los animales recibieron, durante dos días, una sesión de manipulación (del inglés, *handling*) de aproximadamente 3 min. Esta sesión tiene como fin que los animales se habitúen tanto al experimentador como a la sala donde se realizan los experimentos. Es importante mencionar que en el caso de experimentos farmacológicos, en esta sesión de *handling* los animales fueron sujetos de la misma manera que lo serían al ser inyectados.



El ensayo de entrenamiento **estándar** (Figura II.2.A) consistió en colocar al animal en la caja de condicionamiento (contexto A). Luego de 2 min, los ratones recibieron tres ensayos, separados por 50 s entre sí, de una presentación de un tono durante 10 s (80 dB) que finalizaba conjuntamente con una descarga eléctrica administrada durante 1 s (*choque eléctrico*; 0,6 mA). Los ratones permanecieron 1 min más en la caja y posteriormente fueron retirados para ser devueltos a sus cajas-alojamiento. El entrenamiento **débil** (Figura II.2.B) fue similar al estándar excepto en que los animales recibieron una sola presentación tono-choque eléctrico, luego de la

cual permanecieron en la caja de entrenamiento 1 min más y fueron retirados y colocados en sus cajas de alojamiento.

Se realizaron pruebas comportamentales (de ahora en adelante denominadas *evaluaciones*) para evaluar memoria contextual, a diferentes tiempos luego del entrenamiento –Capítulos III, IV y V-. La sesión de evaluación de memoria contextual ( $T_{CTX}$ , Figura II.2.C) consistió en colocar a los animales en la misma caja en que fueron entrenados, por un tiempo de 5 min, en ausencia de tono y de choque eléctrico. En todos los experimentos, un día después de la primera evaluación de la memoria contextual, los animales también se evaluaron para la memoria de clave ( $T_{CUE}$ , Figura II.2.D); dicha evaluación consistió en la presentación del tono del entrenamiento sin choque eléctrico, en un contexto modificado (contexto B, Figura II.1.B). Varias características del contexto original fueron cambiadas: piso liso y blanco, paredes verdes semicirculares, olor a vainilla, baja intensidad de luz, y ausencia de ruido de fondo; la luz del cuarto comportamental también fue modificada: sólo se encendió una luz tenue de tipo velador. El tono fue presentado por 4 min, luego de 2 min de silencio, que sirvieron para evaluar si los animales reconocían efectivamente al contexto B como nuevo (es decir, si no hay generalización de contextos, no deberían mostrar memoria de miedo). Todas las evaluaciones fueron grabadas con una videocámara digital, para luego ser analizadas *a posteriori*.



**Figura II.2.** A) Esquema del entrenamiento estándar; B) Esquema del entrenamiento débil; C) Esquema de la evaluación de la memoria de miedo al contexto (memoria contextual o T<sub>CTX</sub>); D) Esquema de la evaluación de la memoria de miedo al tono (memoria de clave o T<sub>CUE</sub>).

 = choque eléctrico;  = tono

Para la inducción de la **reconsolidación** o **extinción** de la memoria contextual los ratones fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento por diferentes tiempos, 5 min y 30 min respectivamente. En el primer caso, esta sesión de “reactivación” es equivalente a una evaluación de la memoria de miedo al contexto T<sub>CTX</sub>, en el segundo, sólo es más prolongada.

La memoria fue evaluada y expresada como un porcentaje de “estado de congelamiento” o *freezing* del animal, definido como ausencia de movimientos excepto los relacionados con la respiración y actividad cardíaca, que usualmente suele utilizarse como medida de miedo en ratones. El *freezing* fue evaluado siguiendo un procedimiento de toma de muestra instantánea que implica establecer, cada cinco segundos, si un animal muestra un comportamiento de *freezing* o no (Suzuki *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006). En cada evaluación de memoria contextual se realizaron en total 60 mediciones, mientras que en las evaluaciones de memoria de clave se realizaron 24 mediciones para determinar el *freezing* pre-tono, y 48 para el *freezing* durante el tono.

### **II.3. Cirugía e infusión de drogas**

Los animales utilizados en experimentos farmacológicos se sometieron a una cirugía en la que se les implantaron de manera permanente cánulas guía, ubicadas a 1 mm en dirección dorsal a la zona de interés; en esta Tesis, dicha zona fue el hipocampo dorsal, por lo que el implante fue bilateral. La cirugía se realizó en animales profundamente anestesiados con una mezcla de ketamina (Brouwer S.A., CABA, ARG; concentración 5% P/V, 70 µl por animal) y clorhidrato de xilacina (Richmond S.A., CABA, ARG; concentración 20 mg/ml, 10 µl por animal). Las coordenadas utilizadas fueron A -1,9, L ± 1,2, V 1,2 mm según el atlas de Franklin y Paxinos (Franklin y Paxinos, 2001). Luego de realizar las perforaciones en las posiciones indicadas, y de colocar las cánulas guía (23 G, 8 mm de largo), las mismas fueron fijadas, en primer lugar con pegamento “La Gotita®” (Akapol S.A., Buenos Aires, ARG), y luego con acrílico dental HydroC (Dentsply, Buenos Aires, ARG). Los experimentos fueron realizados cinco días luego de la cirugía, para lograr la completa recuperación del animal. La administración de drogas se realizó a distintos tiempos durante el experimento, sin anestesia. El dispositivo de inyección consistía en una aguja 30 G de 9 mm (1 mm más larga que la cánula guía), conectada a una jeringa Hamilton de 5 µl por una tubuladura de diámetro pequeño. Inicialmente este dispositivo fue llenado con agua

destilada, y una burbuja de aire fue succionada hacia la aguja de inyección, de manera de separar físicamente el agua de la droga a inyectar. Luego de la burbuja, se incorporó la droga o el vehículo (Veh). La visualización de la burbuja de aire permitió la inspección del proceso de inyección. Durante la inyección, se sujetó delicada pero firmemente a los animales, para disminuir el estrés. La aguja de inyección fue introducida en la cánula guía; el proceso tomó alrededor de 2,5 min, y las inyecciones se realizaron manualmente. La aguja se retiró 60 s después de finalizada la inyección, para evitar reflujos y asegurar la difusión de la droga. El volumen inyectado en cada hemisferio fue de 0,5  $\mu$ l. Se utilizaron distintos dispositivos para la administración de la droga y el Veh.

Para verificar que las drogas administradas hayan sido dirigidas efectivamente a las zonas de interés, luego de los protocolos conductuales se infundió tinta china negra a los animales, quienes se sacrificaron posteriormente por dislocación cervical. Los cerebros disecados fueron colocados en paraformaldehído (PFA) 4% por un día, y luego en sacarosa 30% otras 24 h. Para verificar la posición de las cánulas, los cerebros se cortaron con vibrátomo y se analizaron bajo lupa. La posición más ventral de la cánula fue superpuesta en mapas de cortes coronales (Franklin y Paxinos, 2001). Se descartaron los datos de animales con cánulas fuera del lugar (aunque fuese en un solo hipocampo). En la mayoría de los experimentos obtuvimos una eficiencia de inyección mayor al 95%.

## **II.4. Drogas**

Para la inhibición de NF- $\kappa$ B (Capítulos III, IV y V) se utilizó un oligodeoxinucleótido doble cadena específico que contiene la secuencia consenso para dicha proteína. Por lo tanto, este oligodeoxinucleótido “secuestra” a dicho FT y no permite que se una al ADN. Se denomina NF- $\kappa$ B Decoy o  $\kappa$ B Decoy (a lo largo de esta Tesis se denominará simplemente Decoy: GAGGGGACTTTCCCA; secuencia consenso resaltada; Bio-Synthesis Inc, Lewisville, TX, EE.UU.). Como control se utilizó un oligodeoxinucleótido de las mismas características, con una base mutada: mDecoy (GAGGCGACTTTCCCA; cambio de base subrayado, Bio-Synthesis Inc). Ambos fueron disueltos en solución STE (10 mM Tris pH 7,5/8; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA). Tanto el Decoy como el mDecoy se utilizaron en una concentración de 0,47



$\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y la dosis inyectada en cada hipocampo equivale a 0,26 pmol (Freudenthal *et al.*, 2005; Boccia *et al.*, 2007).

En algunos experimentos (Capítulo IV) para inhibir NF- $\kappa$ B se utilizó la droga Sulfasalazina (SSZ; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.; S0833), en dosis de 1,25 mM (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y 2,5 mM (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), disuelta en DMSO. La dosis inyectada en cada hipocampo equivale a 1,25 pmol y 2,5 pmol, respectivamente (Boccia *et al.*, 2007).

Para inhibir la fosfatasa CaN se utilizó la droga FK506 (Sigma-Aldrich; F4679, desde ahora hasta el final de la Tesis será denominada como “FK”). Fue administrada a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , disuelta en dimetilsulfóxido [DMSO; (Lin *et al.*, 2003c)]. Se inyectaron 6,22 nmol en cada hipocampo. El Veh en los experimentos en los que se usó FK fue DMSO.

Para inhibir el FT NFAT se utilizó el péptido comercial “11R-VIVIT *cell permeable*” (NFAT inhibitor; Calbiochem, San Diego, LA, EE.UU.; número de producto: 480402; desde ahora hasta el final de la Tesis será denominado como “NFATinh”), en una concentración de 0,9  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , disuelto en DMSO (Luoma y Zirpel, 2008). Se inyectaron 0,125 nmol en cada hipocampo. El Veh en los experimentos en los que se usó NFATinh fue DMSO. Se ha demostrado que dicho péptido interfiere con el sitio de reconocimiento de CaN en una secuencia regulatoria conservada de NFAT, es decir, inhibe específicamente la activación de NFAT por parte de CaN (Aramburu *et al.*, 1999).

Todas las drogas se administraron bilateralmente en el hipocampo dorsal, en un volumen de 0,5  $\mu\text{l}$ . En los estudios de consolidación, todas las drogas se administraron luego del entrenamiento. En los estudios de reconsolidación y extinción, Decoy y mDecoy se administraron inmediatamente luego de la reexposición al contexto de entrenamiento, mientras que FK y NFATinh –y sus Veh- se administraron 10 min antes de la reexposición, teniendo en cuenta la literatura mencionada.

## **II.5. Extracción de proteínas**

A distintos tiempos luego del entrenamiento o de la reexposición al contexto, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical e inmediata decapitación. Rápidamente los cerebros se removieron, y ambos hipocampos se disecaron según el método de Glowinski e Iversen (Glowinski e Iversen, 1966). Para obtener los extractos nucleares y citoplasmáticos, los hipocampos se homogeneizaron en 250  $\mu\text{l}$  de *buffer* A (10 mM

HEPES, pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 1 µg/ml pepstatina A; 10 µg/ml leupeptina; 0,5 mM PMSF; y 10 µg/ml aprotinina) con ocho *golpes* en homogeneizador Dounce, émbolo tipo B (*tight*). Los homogenatos se centrifugaron por 15 min a 1.000 g, y los sobrenadantes (extractos citoplasmáticos) se mantuvieron a -80° C hasta su posterior uso. Los *pellets* se resuspendieron en 30 µl de *buffer* B (20 mM HEPES, pH 7,9; 800 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,4 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 50% glicerol; 1 µg/ml pepstatina A; 10 µg/ml leupeptina; 0,5 mM PMSF; y 10 µg/ml aprotinina) y se incubaron por 20 min en hielo. Luego, se realizó una centrifugación por 15 min a 10.000 g. Los sobrenadantes (extractos enriquecidos en proteínas nucleares) se mantuvieron a -80° C hasta su posterior uso. Todo el proceso fue realizado con las muestras colocadas en hielo.

## II.6. Ensayos bioquímicos: electroforesis en geles de poliacrilamida y *Western-blot*

La cuantificación de proteínas en los extractos de hipocampo se realizó por triplicado con el método de Bradford [para una revisión general de la técnica ver (Bradford, 1976)].

Se realizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS PAGE, *polyacrilamide gel electrophoresis*). Para la preparación de las muestras, se colocaron 20 µg de cada extracto en *buffer* de siembra (4x: Tris-HCl 0,25 M; SDS 8%; azul de bromofenol 0,1%; glicerol 40%; pH 6,8), y agua destilada hasta llegar a un volumen final de 20 µl; luego se las incubó a 100°C por 5 min e inmediatamente se las volvió a colocar en hielo hasta la siembra en el gel.

Se utilizó 7,5% de acrilamida/bisacrilamida (29:1) en el gel resolutivo (para estudiar NFATc4) ó 10% (para estudiar CaN; *buffer* de corrida: 24,8 mM Tris base; 192 mM glicina; 0,1% <sup>m/v</sup> SDS; pH 8,3). Como marcador de peso molecular se utilizó el *Rainbow Marker* (5 µl, *Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers* 250 µl RPN800E, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE.UU.). La electroforesis se realizó durante 30 min a 80 V hasta que la muestra pasó el gel de *stacking*, y durante 1/1,5 h a 110 V en el gel separador. Las proteínas fueron electrotransferidas (1/1,5 h, 100 V) a membranas de PVDF (*buffer* de transferencia: 24,8 mM Tris base; 192 mM glicina; 10% <sup>v/v</sup> metanol; pH 8,3). Luego de la transferencia, se las dejó secar a temperatura ambiente, y se guardaron a 4° C para su posterior uso.

Para la técnica de *western blot*, las membranas se activaron con metanol (1 min), se lavaron con agua destilada (2 veces, 2 min cada una) y luego se incubaron en *buffer* de bloqueo (leche descremada en TTBS; TTBS: 50 mM Tris base; 150 mM NaCl; pH 7,4; Tween 0,1% v/v), durante 30 min / 2 h, a temperatura ambiente, y luego se incubaron con anticuerpo primario (utilizando el mismo *buffer* de bloqueo) toda la noche a 4° C. Posteriormente las membranas se lavaron 3 veces durante 5 min en *buffer* TTBS y luego se incubaron con anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo acoplados a peroxidasa de rabanito (1:5000, *goat anti mouse* IgG Santa Cruz Biotechnology –SCB-, Santa Cruz, CA, EE.UU.; sc-2005, *goat anti rabbit* IgG SCB sc-2030) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de esta incubación, las membranas se lavaron dos veces en TTBS y una vez en TBS, 5 min cada lavado. Finalmente la detección de los complejos se realizó utilizando un método quimioluminiscente y las señales fueron digitalizadas utilizando el equipo FUJIFILM-Intelligent Dark Box II, y el software “image reader LAS-1000”.

La intensidad de las bandas inmunoreactivas fue cuantificada utilizando el programa ImageJ 1.29x, del *National Institutes of Health* (NIH, EE.UU.). Sólo se cuantificó la intensidad de las bandas en los geles donde la proporción de intensidad se mantuvo lineal, es decir, que las manchas no estaban saturadas.

Los ensayos de *Western blot* se realizaron utilizando diferentes anticuerpos primarios específicos para distintas proteínas: CaN A (PP2B A $\alpha$  Cell Signalling Technology, Beverly, CA, EE.UU.; 07-067, dilución 1:2000), NFATc4 (SCB sc-13036, dilución 1:1000). Para control de siembra citoplasmático se utilizó un anticuerpo específico para actina (SCB sc-1616-R, dilución 1:1000) y como control de siembra nuclear se utilizó el de lamina B (SCB sc-56143, dilución 1:500).

## **II.7. Ensayos bioquímicos: medición de actividad de unión al ADN**

La actividad de unión al ADN de la proteína NF- $\kappa$ B presente en fracciones nucleares se evaluó con la técnica de *ensayo del cambio en la movilidad electroforética* (EMSA, del inglés *electrophoretic mobility shift assay*). Para el marcado radiactivo, una alícuota de 1,75 pmol de una secuencia de ADN doble cadena conteniendo el sitio de unión de NF- $\kappa$ B (AGTTGAGGGGACTTCCCAGGC, sitio consenso en negrita; Promega, Madison, WI, EE.UU.) se colocó a 37° C por 10 min en 10  $\mu$ l de *buffer* de reacción conteniendo 70 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT; 15  $\mu$ Ci de [ $\gamma$ -P

<sup>32</sup>]ATP (DuPont NEN, Wilmington, DE, EE.UU.) y 10 U de T4 polynucleótido quinasa (Promega).

Para el ensayo de EMSA propiamente dicho, la muestra nuclear (10 µg de extracto proteico) se agregó a un *buffer* conteniendo 20 mM HEPES; pH 7,9; 120 mM KCl; 0,4 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 25% glicerol y 0,3 µg poly(dI-dC) (Sigma). Dichas muestras fueron incubadas por 40 min en hielo, luego de lo cual 1 ng de oligodeoxinucleótido marcado fue agregado, para continuar con una incubación en hielo por otros 40 min. La mezcla fue sembrada en un gel de poliacrilamida (6% de la mezcla acrilamida/bisacrilamida 29:1) no-desnaturalizante y se dio lugar a la electroforesis en un *buffer* TBE 0,25% (22,3 mM Tris; 22,3 mM ácido bórico; 0,5 mM EDTA; pH 8,3) por 1,5 h a 160 V. El gel fue secado al vacío y expuesto a placas radiográficas XAR-5 film (Kodak, Rochester, NY, EE.UU.) durante toda la noche, o un tiempo menor/mayor dependiente de la intensidad de la marca. Las imágenes fueron digitalizadas por medio de un *scanner* para negativos.

La intensidad de la banda de interés fue cuantificada utilizando el programa ImageJ 1.29x (NIH). Sólo se cuantificó la intensidad de las bandas en los geles donde la proporción de intensidad se mantuvo lineal, es decir, que las manchas no estaban saturadas.

La cuantificación de proteínas en los extractos de hipocampo se realizó por triplicado con el método de Bradford [para una revisión general de la técnica ver (Bradford, 1976)].

## II.8. Histología

Para corroborar que las drogas administradas alcanzaron la zona deseada (en esta Tesis, la región CA1 hipocampal) inyectamos una de las drogas utilizadas, el Decoy, con una modificación covalente que permitiera su visualización; en este caso, la unión a la molécula fluorescente fluoresceína. Un ratón canulado se inyectó con dicha droga dentro del hipocampo dorsal y a los 5 min se lo anestesió profundamente y se lo perfundió con salina seguido de solución fijadora (PFA) al 4%. Se extrajo el cerebro entero, que permaneció en PFA por 2-3 h más, para luego pasar a una solución de sacarosa 15%. Al día siguiente se lo transfirió a una solución de sacarosa 30% en PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4) para su posterior uso. Se realizaron cortes en el crióstato (30 µm), y luego se colocaron en un

portaobjetos agregándose una gota de solución de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich P4170, 1,5µg/ml), que tiñe núcleos por su afinidad al ADN. Los cortes se observaron con microscopía confocal Olympus Fluoview FV-300 laser-scanning (Olympus, Center Valley, PA, EE.UU.) utilizando distintos aumentos. Otros cortes del mismo cerebro fueron teñidos con el colorante Violeta de Cresilo para la visualización de la posición de la cánula respecto a la región CA1 hipocampal. Se colocaron los cortes en un portaobjetos gelatinizado, agregando unas gotas de la solución e Violeta de Cresilo. A los 5 min se lavó con agua y se observó al microscopio óptico inmediatamente (Olympus CX31, Olympus).

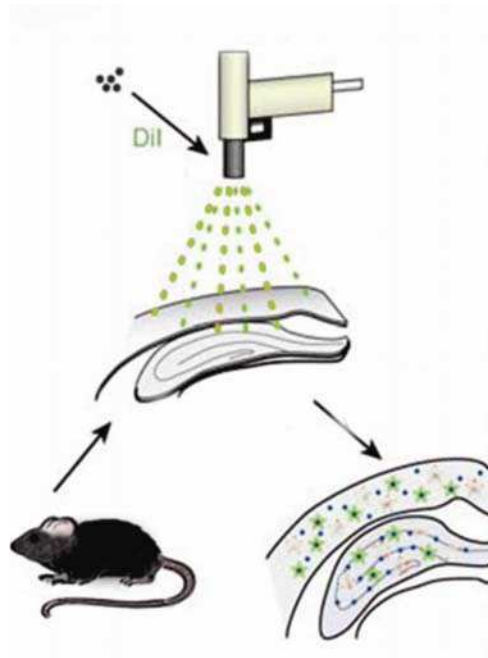
## **II.9. Preparación de cortes de cerebro para la metodología de *DiOlistics***

A diferentes tiempos (Capítulo V) se anestesiaron los animales profundamente, e inmediatamente se perfundieron, primero con solución salina, y luego con PFA 4%. Los cerebros fueron disecados, y permanecieron en solución fijadora por 2-3 h más. Se realizaron 3 pasajes de sacarosa-PBS de diferentes concentraciones, cada 24 h, hasta llegar a una concentración de 30% sacarosa en PBS, y permanecieron en esta solución hasta su posterior uso, en heladera. Previo al análisis morfológico se lavaron exhaustivamente en PBS y luego se seccionaron cada 200 µm utilizando un vibrátomo (Vibratome Series 1000; The Vibratome Company, St Louis, MO, EE.UU.). Las rodajas fueron mantenidas en placas de Petri plásticas de 6 pocillos conteniendo PBS-0,02% azida para impedir contaminaciones.

## **II.10. *DiOlistics***

El estudio morfológico y estructural del hipocampo (Capítulo V), se efectuó utilizando el marcado de neuronas con la técnica de *DiOlistics* (o *DiI BiOlistics*). Las rebanadas de tejido cerebral fueron teñidas con el colorante lipofílico “dye 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate” (DiI, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) mediante una *marcación mediada por partículas* [*DiOlistics*; para más detalle de la técnica ver (Gan *et al.*, 2000)]. La preparación de las balas recubiertas de colorante fluorescente se describe detalladamente en el trabajo de Chapleau y col. (Chapleau *et al.*, 2009). En este trabajo se realizaron pequeñas modificaciones. Brevemente, se disolvió el DiI en cloruro de metileno (13 µg/µl).

Cuarenta mg de partículas de tungsteno (1,1  $\mu\text{m}$ , Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) fueron colocados en la superficie limpia de un porta objetos de vidrio y desparramadas uniformemente con dos hojas de afeitar. La solución de DiI se volcó sobre las partículas de tungsteno y se dejó que el solvente evaporara. Para prevenir el agrupamiento de la mezcla de DiI/tungsteno, se utilizaron las hojas de afeitar de manera de romper y separar la mezcla. Se agregó polivinilpirrolidina (20mg/ml en etanol) para prevenir aún más el agrupamiento de partículas, y mejorar su posterior adhesión a las paredes de tubo Tefzel (Bio-Rad) que una vez cortado daría lugar a las balas propiamente dichas. La mezcla de partículas de tungsteno recubiertas de DiI fue colocada en un tubo de ensayos conteniendo 3 ml de agua destilada, y fue sonicada por aproximadamente 1 h. Luego de la sonicación, la solución se agitó en un vortex y se aspiró al tubo de Tefzel. Luego de 5 min de asentamiento, se retiró el agua, y se permitió que el tubo se secase por 30 min. Una vez seco, dicho tubo se cortó y dio lugar a las balas. Para distribuir las partículas recubiertas con el fluoróforo dentro de las rebanadas de cerebro, se utilizó una “pistola de genes”, comúnmente denominada *Gene-gun* (Helios, Bio-Rad; presión de He: 110 psi; distancia: 15 mm; filtros de 40  $\mu\text{m}$ ), luego de lo cual, las rebanadas se colocaron en PBS por aproximadamente 4 h, de manera de permitir la difusión del colorante. Posteriormente, se las colocó en PFA 4% por 2 h para su fijación, y fueron lavadas con PBS tres veces. Se realizó una incubación con glicina 100 mM en PBS durante 15 min para desactivar (*quenchear*) la autofluorescencia del PFA. Se realizaron 5 lavados más en PBS, se montaron los cortes en portaobjetos de vidrio, utilizando Vectashield como medio de montaje (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.), y se selló el cubreobjetos con esmalte de uñas (ver esquema general en la Figura II.3).



**Figura II.3.** Esquema del marcado de morfología neuronal utilizando la metodología de *DiOlistics*. Adaptado de (Oberheim *et al.*, 2008).

## II.11. Microscopía Confocal

Se utilizó microscopía confocal para el análisis de las espinas, pues el colorante utilizado es fluorescente y era necesario hacer el estudio tridimensional. Se obtuvieron imágenes de bajo aumento para visualizar la zona de impacto de las partículas en las diferentes áreas cerebrales, e imágenes de alto aumento para visualización de dendritas, utilizando un microscopio confocal Olympus Fluoview FV-300 laser-scanning (Olympus). Se utilizaron objetivos 10x (Apertura Numérica -NA, del inglés *Numeric Aperture*- 0,5) y 100x -en aceite de inmersión- (NA 1,4), respectivamente. El primero, junto al 20x (NA 0,85), sirvió para localizar la zona de impacto de las partículas de tungsteno y determinar la localización de las dendritas marcadas. La fluorescencia del DiI fue excitada con el laser HeNe-green (544 nm para colorantes rojos). Las series en el eje z fueron adquiridas en intervalos de 0,1  $\mu\text{m}$ .

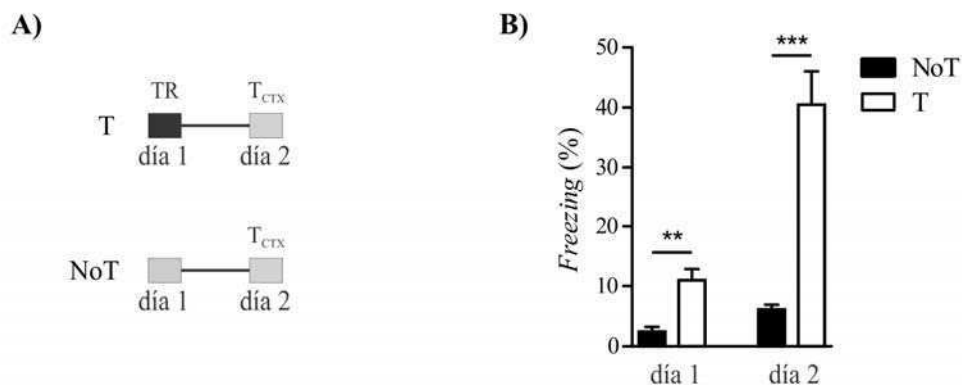
## II.12. Análisis estadístico

- Datos comportamentales:

- La retención de la memoria se determina operacionalmente como la presencia de la RC (*freezing*) **durante** la sesión de evaluación. Se argumenta a 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. 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 (Rescorla, 1988).

Al comenzar nuestros experimentos pusimos a punto los parámetros necesarios para que los animales muestren una memoria de miedo un día después del entrenamiento. Esos parámetros constituyen lo que consideramos como “entrenamiento estándar” mencionado en la sección II.2. En un primer experimento utilizamos un grupo de animales entrenado (T), e incluimos un grupo de animales que no recibieron choque eléctrico (NoT). Se observan diferencias significativas entre ambos grupos en el día de la evaluación de la memoria contextual (Prueba *t* de Student entre grupos:  $t = 6,06$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura II.4) en congruencia con nuestra definición operacional de memoria. En el entrenamiento también se observan diferencias significativas (Prueba *t* de Student entre grupos:  $t = 4,15$ ;  $p < 0,001$ ), pero ambos niveles de *freezing* son relativamente bajos respecto a lo observado el día de la evaluación para el grupo entrenado. Estas diferencias responden a respuestas comportamentales no relacionadas con los procesos de memoria.



**Figura II.4.** Puesta a punto del modelo de comportamiento utilizado en esta Tesis. **A)** Protocolo experimental. Un grupo de animales fue entrenado en el día 1 (T, n=9); el grupo control no recibió ningun choque eléctrico (NoT; n=9). TR, sesión de entrenamiento; T<sub>CTX</sub>, evaluación de la memoria contextual. **B)** El gráfico muestra la media del porcentaje de *freezing* ( $\pm$  SEM) en el entrenamiento y en la evaluación de la memoria contextual.

En el resto de los experimentos comportamentales de la Tesis, todos los grupos animales utilizados fueron entrenados, y lo que varió fue la presencia o ausencia de



droga (Capítulos III, IV y V), el tipo de entrenamiento (estándar o débil; Capítulo IV), y en el caso del estudio de la reconsolidación y la extinción, también la presencia o ausencia de reexposición al contexto de entrenamiento (Capítulos III y V). Las conclusiones se sacaron en base a las posibles diferencias entre grupos dentro de cada sesión de evaluación. No obstante, en los gráficos también presentamos los resultados obtenidos en el día de entrenamiento (en el caso de grupos entrenados con entrenamiento estándar, para mostrar que todos los grupos muestran una respuesta similar; en el caso de experimentos con entrenamientos estándar y débiles, evaluaremos qué sucede el día del entrenamiento, aunque no sea relevante para la evaluación de la memoria). En el paradigma utilizado, está ampliamente aceptado que en el entrenamiento los animales suelen responder con un nivel de *freezing* relativamente bajo [típicamente alrededor de 10% para animales entrenados; por ejemplo ver (Fischer *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2007)], mientras que la memoria de miedo se evidencia con un nivel de *freezing* relativamente alto [típicamente entre 30-70% para animales entrenados; por ejemplo ver (Fischer *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Wiltgen *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Fischer *et al.*, 2007; Lee, 2010)].

Los datos comportamentales se presentan como *media del porcentaje de freezing*  $\pm$  *SEM* (error estándar de la media, del inglés *standard error of the media*). Cuando el experimento contaba con más de dos grupos, se analizaron utilizando un ANOVA de una vía, seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls para comparaciones múltiples, por cada día de experimento. En caso de tratarse de dos grupos, se realizó una prueba *t* de Student de dos colas no pareada, por cada día de experimento.

Para analizar los datos correspondientes a memorias de clave y extinción intra-sesión, se utilizó un ANOVA de dos vías, de medidas repetidas, seguido de una prueba *post hoc* de Bonferroni para comparaciones múltiples.

- Datos de western blot:

La estimación de los pesos moleculares de las bandas específicas observadas se realizó por medio de una regresión lineal considerando los valores de peso molecular correspondientes a la banda de cada cada marcador y su movilidad relativa en el gel.

La intensidad (densidad óptica) de la banda específica correspondiente a la proteína de interés fue relativizada a la densidad óptica de la banda correspondiente al control de siembra (nuclear o citoplasmático, según la muestra en cuestión) de la misma calle, obteniéndose así la densidad óptica relativa (DOR). Se calculó para cada muestra correspondiente a cada animal una DOR nuclear y una DOR citoplasmática. Para calcular el **índice de translocación** (“nuc/cit”) se consideró la DOR en el núcleo relativizada a la DOR en el citoplasma, para un mismo animal. En los gráficos, los datos correspondientes a los grupos experimentales se presentan como *media del índice de translocación*  $\pm$  SEM. Estadísticamente estos datos se analizaron utilizando prueba *t* de Student no pareada de dos colas entre los grupos experimentales y su correspondiente grupo *Naïve*<sup>13</sup> (considerado como 100%) excepto en casos donde se comparó más de un grupo, en el que se utilizó un ANOVA de una vía seguido por seguido de una prueba *post hoc* de Newman–Keuls para comparaciones múltiples.

- Datos de EMSA:

En los gráficos, los datos correspondientes a cada grupo experimental se presentan como *media de la densidad óptica relativa (al Naïve, considerado como 100%)*  $\pm$  SEM. Estadísticamente se analizaron utilizando prueba de *t* de Student no pareada de dos colas entre los grupos experimentales y su correspondiente *Naïve*.

- Morfología:

Se estudiaron las dendritas apicales (de las capas *stratum radiatum* y *lanucosum/moleculare*) y basales (de la capa *stratum oriens*) de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. Las espinas dendríticas fueron identificadas como protrusiones que se extienden una distancia de  $\leq 3 \mu\text{m}$  desde su dendrita parental, y cuantificadas *offline* utilizando el *software* ImajeJ 1.29x (NIH). Se tuvo especial cuidado en que cada espina fuese cuantificada una única vez siguiendo su curso espacial a lo largo del eje z. Sólo fueron tenidas en cuenta para el análisis las espinas que aparecían continuas con su dendrita parental. La *densidad de espinas* para cada dendrita se calculó contando el número de espinas por unidad

---

<sup>13</sup> Durante todo el texto nos referiremos con la palabra de origen francés “*Naïve*” a aquellos animales o grupo de animales que no sufrieron ningún tratamiento experimental.

de distancia de la dendrita, normalizada a 10  $\mu\text{m}$  de distancia dendrítica lineal. Para establecer un parámetro de distancia se utilizó la fluorescencia de partículas de 1,07  $\mu\text{m}$  de diámetro. El análisis de los datos se realizó en *ciego*.

Los datos se presentan como *media del número de espinas / 10  $\mu\text{m}$   $\pm$  SEM*. Se analizaron utilizando un ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* de Newman–Keuls para comparaciones múltiples. Se indica en cada gráfico y para cada grupo, la cantidad de cerebros analizados, el número de dendritas analizadas, y la sumatoria de la longitud de dendritas analizadas. Para calcular la media de la densidad de espinas para un mismo grupo, se promediaron las densidades de espinas de las dendritas de todos los animales del mismo grupo.

En todos los casos se consideró  $\alpha = 0,05$ . En los gráficos sólo se muestran las comparaciones que resultaron significativas. En el texto no se especifican los valores estadísticos de las comparaciones que resultaron no significativas.

## CAPÍTULO III

### NF- $\kappa$ B, CaN y NFAT en reconsolidación y extinción



*En este capítulo de la Tesis estudiaremos en primer lugar el rol del FT NF- $\kappa$ B en la reconsolidación y extinción, y en segundo lugar, el rol de la fosfatasa CaN. Al estudiarse dichas proteínas comparativamente en ambas fases abordaremos la hipótesis del switch molecular que permite que ocurra una fase y no la otra.*

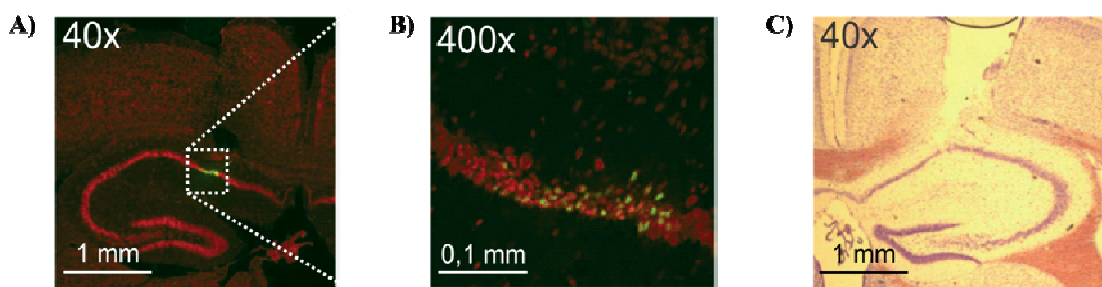
*Asimismo, estudiaremos el rol del FT NFAT en la extinción y reconsolidación. Así, pondremos a prueba la idea sobre una regulación diferencial de la expresión génica en la memoria de extinción con respecto a la reconsolidación de la memoria original, lo que nos permitirá ahondar en la hipótesis del switch molecular. En su conjunto, los resultados obtenidos aportarán información sobre la naturaleza de la extinción.*

### **III.1. ROL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- $\kappa$ B EN LA RECONSOLIDACIÓN Y EXTINCIÓN DE LA MEMORIA**

#### ***III.1.1. NF- $\kappa$ B es necesario para la reconsolidación de la memoria de miedo al contexto***

Como se mencionó en el Capítulo I, estudios previos de nuestro laboratorio y de otros grupos sugieren la participación del FT NF- $\kappa$ B en la **reconsolidación** de la memoria, tanto en invertebrados (Merlo *et al.*, 2005) como en vertebrados (Boccia *et al.*, 2007; Lubin y Sweatt, 2007). El primer objetivo de esta Tesis fue comprobar si este FT es necesario para la reconsolidación de la memoria de miedo contextual en ratones.

Para este propósito en primer lugar realizamos un experimento en el que inhibimos a NF- $\kappa$ B en el hipocampo, administrando un inhibidor específico denominado Decoy (ver Capítulo II, sección II.4). Como control se administró un oligodeoxinucleótido con la misma secuencia de pares de bases, salvo una base mutada (mDecoy); dicha mutación impide la unión con NF- $\kappa$ B. Inyectado en el hipocampo dorsal, más específicamente en la región CA1, el Decoy entra rápidamente a las células piramidales y puede verse su presencia en los núcleos (Figura III.1). Por otro lado, en trabajos anteriores demostramos que la infusión del Decoy dentro del hipocampo disminuye significativamente la actividad de NF- $\kappa$ B en dicha zona, respecto de animales a los que se les administró mDecoy (Boccia *et al.*, 2007).

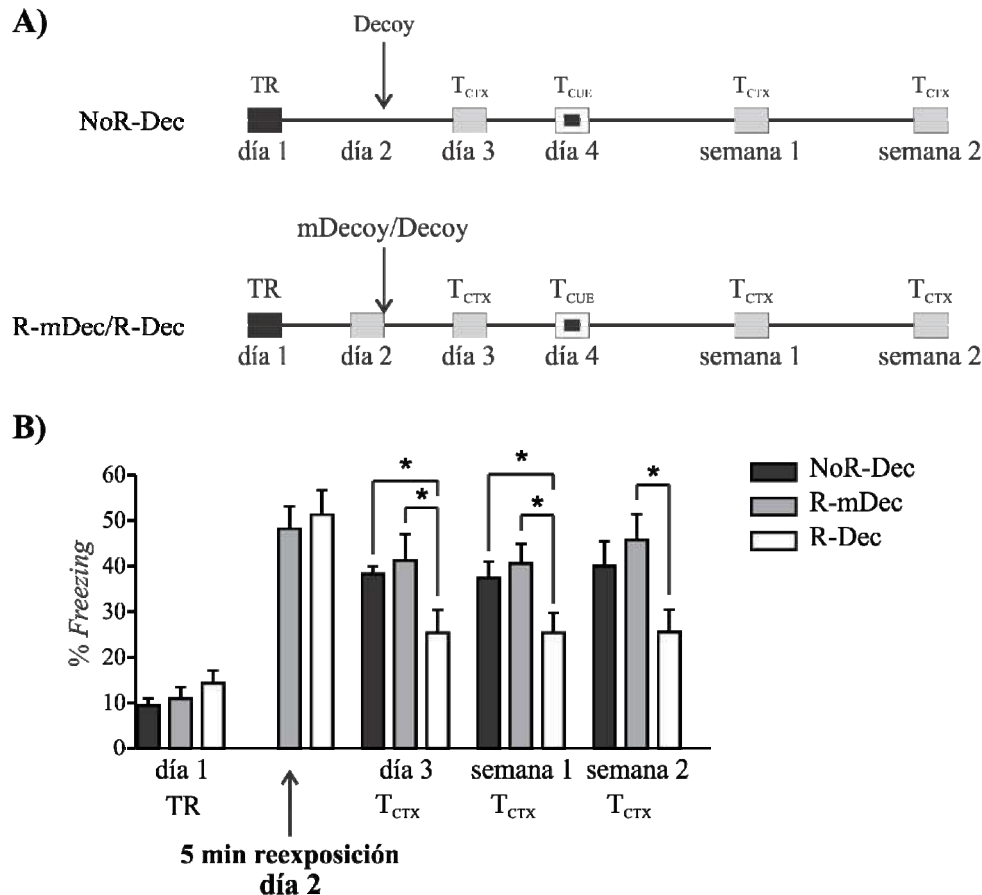


**Figura III.1.** Presencia de Decoy en neuronas de la región CA1. Imágenes a 40x (A) y 400x (B) obtenidas con microscopio confocal mostrando la distribución espacial de la droga Decoy fluoresceinado (verde) 5 min luego de su inyección dentro del hipocampo dorsal. La concentración utilizada fue la misma que la del Decoy no fluoresceinado utilizado en los experimentos farmacológicos. Los núcleos de las células se marcaron con yoduro de propidio (rojo). C) Imagen obtenida con microscopio óptico en la que se observa la posición de la cánula guía (coloración con Violeta de Cresilo).

El protocolo experimental se muestra en la Figura III.2.A. El primer día del experimento se entrenaron tres grupos de ratones, y al día siguiente, dos de los grupos se reexpusieron al contexto de entrenamiento por 5 min. Luego de la reexposición, a uno de los grupos se le administró en el hipocampo el inhibidor específico de NF- $\kappa$ B (R-Dec) y al otro grupo el oligodeoxinucleótido control (R-mDec). El grupo no reexpuesto recibió la inyección de Decoy (NoR-Dec).

Como se observa en la Figura III.2.B, en el entrenamiento no hubo diferencias significativas entre los grupos, y el nivel de *freezing* fue bajo. En el día de la reexposición, los grupos reexpuestos no mostraron diferencias significativas entre sí, observándose un nivel de *freezing* alto, indicio de que de los ratones recordaban la experiencia aversiva que sufrieron el día anterior. En el día de la primera evaluación de la memoria contextual, podemos ver que el grupo R-Dec mostró un nivel de *freezing* significativamente menor que el R-mDec, lo que sugiere que la activación de NF- $\kappa$ B es necesaria para la reconsolidación de la memoria de miedo. Por otra parte, el grupo no reexpuesto mostró un índice de memoria alto [ANOVA de una vía comparando entre grupos:  $F(2,22) = 3,55$ ,  $p < 0,05$ ; Prueba *post hoc* de Newman-Keuls para todos los pares de grupos: NoR-Dec vs. R-Dec:  $p < 0,05$ ; R-mDec vs. R-Dec:  $p < 0,05$ ]. Esto indica que la actividad de NF- $\kappa$ B es necesaria solamente cuando la memoria es reactivada por la reexposición al contexto. Es decir, si la memoria no es reactivada, la inhibición de NF- $\kappa$ B no la perturba. Esto se relaciona con el fenómeno de labilización de la memoria. En miedo condicionado en ratas se ha demostrado que 3 min de reexposición al contexto son suficientes para que ocurra la labilización, no así una reexposición de 1 min (Suzuki *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008). En nuestro caso, 5 min de

reexposición provocarían la labilización de la memoria de miedo en ratón. En estas condiciones, la actividad de NF- $\kappa$ B se hace necesaria para la reestabilización de la memoria de miedo.



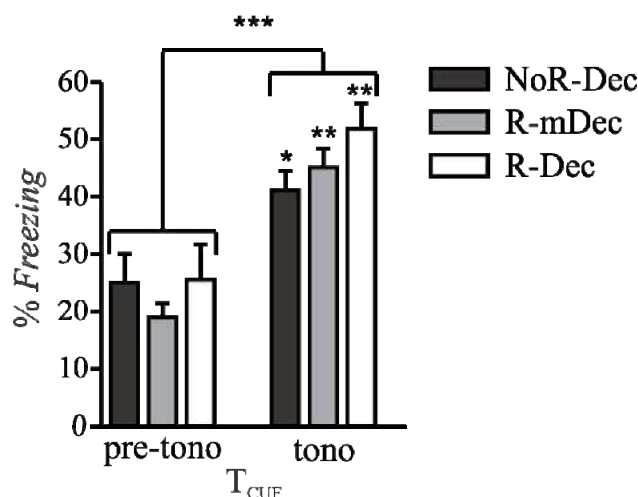
**Figura III.2.** Inhibición de NF- $\kappa$ B en el hipocampo dorsal luego de la reactivación de la memoria contextual por reexposición *breve* al contexto de entrenamiento. Efecto en la memoria *contextual a largo término*. **A)** Protocolo experimental. Se entrenaron todos los grupos en el día 1; en el día 2, se reexpusieron al contexto de entrenamiento por 5 min, y se inyectaron con mDecoy (R-mDec; n=9) o con Decoy (R-Dec; n=8), o no se reexpusieron y se inyectaron con Decoy (NoR-Dec; n=8). Se realizaron evaluaciones de la memoria contextual y la de clave a diferentes tiempos. TR, sesión de entrenamiento; T<sub>CTX</sub>, evaluación de la memoria contextual; T<sub>CUE</sub>, evaluación de la memoria de clave. **B)** Media del porcentaje de *freezing* ( $\pm$  SEM) en el entrenamiento, en la reexposición y en las sucesivas evaluaciones de la memoria contextual. Dentro de cada día, se realizó un ANOVA de una vía comparando valores medios de porcentajes de *freezing* entre los tres grupos, seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls; \*:  $p < 0,05$ . Sólo se indican en el gráfico las comparaciones que resultaron significativas.

Además de la evaluación de la memoria contextual mencionada anteriormente, también realizamos dos evaluaciones contextuales más. Una a una semana del entrenamiento, y la otra, a dos semanas. Como muestra la Figura III.2.B, las comparaciones entre grupos se mantuvieron similares a las de la primera evaluación



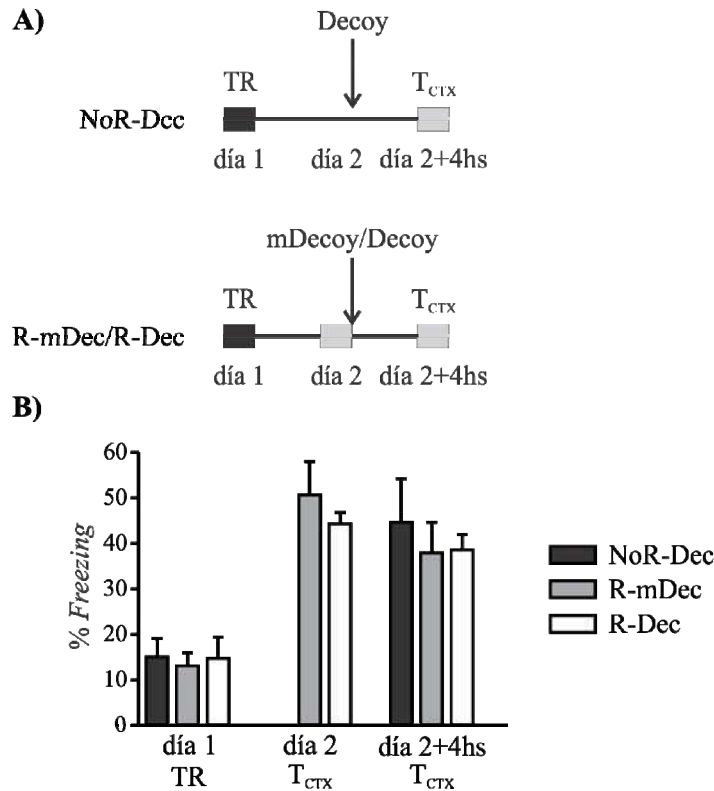
contextual, indicando que el efecto de la inhibición de NF- $\kappa$ B en el hipocampo es duradero en el tiempo [ANOVA de una vía comparando entre grupos, dentro de cada día: semana 1:  $F(2,22) = 3,50$ ,  $p < 0,05$ ; Prueba *post hoc* de Newman-Keuls para todos los pares de grupos: NoR-Dec vs. R-Dec:  $p < 0,05$ ; R-mDec vs. R-Dec:  $p < 0,05$ ; semana 2:  $F(2,22) = 3,45$ ,  $p < 0,05$ ; Prueba *post hoc* de Newman-Keuls para todos los pares de grupos: R-mDec vs. R-Dec:  $p < 0,05$ ]. Esto sugiere que el efecto de la inhibición NF- $\kappa$ B luego de la reexposición es permanente y no habría una recuperación espontánea del efecto amnésico como ha sido descrito en algunos casos con administración de la droga anisomicina, descartando un efecto facilitador sobre la extinción (Lattal y Abel, 2004). Como se verá en la sección III.1.2, la inhibición de NF- $\kappa$ B en la extinción genera un efecto facilitador de la misma, pues implica un retardo en la recuperación de la respuesta de *freezing* a los 14 días de la reexposición. En este caso, dicha recuperación no se observó, lo cual sugiere fuertemente que la memoria fue afectada de manera perdurable. Retomaremos esta discusión en el Capítulo VI correspondiente a la Discusión.

En el día 4, se realizó una evaluación de la memoria de clave. La realización de esta evaluación es un control de la especificidad de la inhibición de NF- $\kappa$ B en el hipocampo, actuando específicamente sobre la memoria contextual. La Figura III.3 muestra que el *freezing* pre-tono fue similar en todos los grupos, indicando que no hay generalización entre contextos y por ende, puede utilizarse el contexto B para evaluar exclusivamente la memoria de clave. Luego de la presentación del tono, el *freezing* aumentó significativamente en todos los grupos, pero siguen sin observarse diferencias significativas entre los mismos [ANOVA de dos vías de medidas repetidas con ‘tiempo’ y ‘grupo’ como factores independientes: tiempo:  $F(1,22) = 83,09$ ,  $p < 0,0001$ ; grupo:  $F(2,22) = 0,99$ ,  $p = 0,39$ ; interacción:  $F(2,22) = 1,71$ ,  $p = 0,20$ ; Prueba *post hoc* de Bonferroni entre ‘pre-tono’ y ‘durante el tono’ para todos los grupos: NoR-Dec:  $p < 0,01$ ; R-mDec:  $p < 0,001$ ; R-Dec:  $p < 0,001$ ]. Estos resultados apoyan los trabajos de LeDoux, quienes establecieron que la memoria de clave no es dependiente del hipocampo, sino de otras zonas cerebrales, como la amígdala (Phillips y LeDoux, 1992).



**Figura III.3.** Inhibición de NF- $\kappa$ B en el hipocampo dorsal luego de la reactivación de la memoria contextual por reexposición breve al contexto de entrenamiento. Efecto en la memoria de clave a largo término. Los animales y grupos son los mismos a los de la Figura III.2.  $T_{CUE}$ , test de clave. Se realizó un ANOVA de dos vías de medidas repetidas con 'tiempo' y 'grupo' como factores independientes, comparando valores medios de porcentajes de *freezing*, seguido de una prueba *post hoc* de Bonferroni entre 'pre-tono' y 'durante el tono' para los tres grupos. Sólo se indican en el gráfico las comparaciones que resultaron significativas; los asteriscos sobre las barras indican la significancia de los análisis *post hoc* para cada grupo pre-tono vs. tono; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

No se espera que la inhibición de los mecanismos involucrados en la reestabilización de la memoria tenga un efecto a corto término de la reactivación. Por el contrario, el efecto detrimental sobre la memoria es esperable que se exprese a largo término (Nader *et al.*, 2000). Si el efecto detrimental sobre la memoria provocado por la inhibición de NF- $\kappa$ B se expresara a corto término, podríamos concluir que se trata de un efecto inespecífico no relacionado con la reconsolidación. Para evaluarlo, realizamos un nuevo experimento en el que se entrenaron tres grupos de animales, al día siguiente dos grupos se reexpusieron al contexto de entrenamiento e inmediatamente recibieron una inyección intrahipocampal de Decoy o mDecoy (R-Dec<sub>4h</sub> y R-mDec<sub>4h</sub>, respectivamente). El tercer grupo no fue reexpuesto pero sí inyectado con Decoy (NoR-Dec<sub>4h</sub>). Se realizó la evaluación de la memoria contextual a las 4 h de la reexposición, o de la inyección en el caso del grupo no reexpuesto (Figura III.4.A). No encontramos diferencias en los niveles de *freezing* entre los tres grupos al momento de la evaluación de la memoria contextual (Figura III.4.B). Este resultado indica que el efecto previamente observado en la Figura III.2.B no se expresa a corto término, lo que es consistente con la participación de este FT en la reestabilización de la memoria luego de su labilización provocada por la reexposición al contexto de entrenamiento.



**Figura III.4.** Inhibición de NF- $\kappa$ B en el hipocampo dorsal luego de la reactivación de la memoria contextual por reexposición *breve* al contexto de entrenamiento. Efecto en la memoria *contextual a corto término*. **A)** Protocolo experimental. Se entrenaron todos los grupos en el día 1; en el día 2, se reexpusieron al contexto de entrenamiento por 5 min, se inyectaron con mDecoy (R-mDec<sub>4h</sub>; n=8) o con Decoy (R-Dec<sub>4h</sub>; n=7), o no se reexpusieron y se inyectaron con Decoy (NoR-Dec<sub>4h</sub>; n=6). La evaluación de la memoria contextual se realizó 4 h después de la reexposición (24 h + 4 h desde el TR para el caso de los animales no reexpuestos). TR, sesión de entrenamiento; T<sub>CTX</sub>, evaluación de la memoria contextual; T<sub>CUE</sub>, evaluación de la memoria de clave. **B)** Media del porcentaje de *freezing* ( $\pm$  SEM) en el entrenamiento, en la reexposición y en las sucesivas evaluaciones de la memoria contextual. Dentro de cada día, se realizó un ANOVA de una vía comparando valores medios de porcentajes de *freezing* entre los tres grupos, seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls. No se registraron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones realizadas.

Para evaluar si la infusión de Decoy *per se* produce cambios en la respuesta de *freezing* a pesar de que los animales no hayan sido reexpuestos, realizamos dos experimentos más. En el primero, entrenamos dos grupos de animales, y al día siguiente, sin reexposición, uno de los grupos recibió la inyección intrahipocampal de mDecoy (NoR-mDec) mientras que el otro, de Decoy (NoR-Dec). Un día después de las inyecciones, en la evaluación de la memoria contextual, no encontramos diferencias significativas entre ellos [respuesta media de *freezing*  $\pm$  SEM: NoR-mDec: (36,30  $\pm$  6,73), n = 9; NoR-Dec: (37,12  $\pm$  1,92), n = 11; Prueba *t* de Student entre grupos: *t* = 0,13; *p* = 0,90], indicando que efectivamente la inhibición de NF- $\kappa$ B sin reexposición

no afecta los niveles de *freezing*, y que tanto el Decoy como el mDecoy no tienen efectos inespecíficos, a largo término. El segundo experimento fue similar, con la excepción de que la evaluación se realizó a 4 h después de la inyección. Tampoco encontramos diferencias significativas entre grupos [respuesta media de *freezing*  $\pm$  SEM: NoR-mDec<sub>4h</sub>: (39,17  $\pm$  3,23),  $n = 8$ ; NoR-Dec<sub>4h</sub>: (44,66  $\pm$  9,53),  $n = 8$ ; Prueba  $t$  de Student entre grupos:  $t = 0,53$ ;  $p = 0,65$ ], indicando que la inhibición de NF- $\kappa$ B tampoco tiene efecto sobre el *freezing* en animales no reexpuestos, a corto término. En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con Decoy tiene efecto sólo cuando la memoria se reactiva con la reexposición al contexto, y que la reactivación de la memoria por sí misma no afecta los niveles de *freezing*.

Ahora bien, los resultados anteriores indican que la actividad de NF- $\kappa$ B en el hipocampo es necesaria para la reconsolidación de la memoria. El siguiente paso fue determinar si la actividad de NF- $\kappa$ B hipocampal efectivamente se modifica luego de la reexposición al contexto. El protocolo experimental se muestra en la Figura III.5.A. Sacrificamos los ratones a diferentes tiempos luego de la reexposición breve al contexto: inmediatamente, luego de 15 min, y luego de 45 min (R-0 min, R-15 min y R-45 min respectivamente). A su vez, se realizaron varios grupos de animales control: un grupo de animales *Naïve*, un grupo de animales entrenados pero no reexpuestos (T-NoR), y un grupo de animales entrenados sin choque eléctrico, es decir, estimulados solamente con las tres presentaciones de tono en el contexto de entrenamiento, y al día siguiente reexpuestos al mismo contexto (contexto A; NoT-R<sup>14</sup>). Entre la reexposición y los tiempos de sacrificio, los animales volvieron a sus cajas de alojamiento. Luego del sacrificio, los hipocampos fueron disecados, se prepararon extractos nucleares y se realizó la técnica de EMSA (para la identificación de la banda cuantificada ver la Figura III.5.B). Los extractos de cada grupo experimental se corrieron en el mismo gel junto con los extractos del grupo *Naïve*<sup>15</sup>.

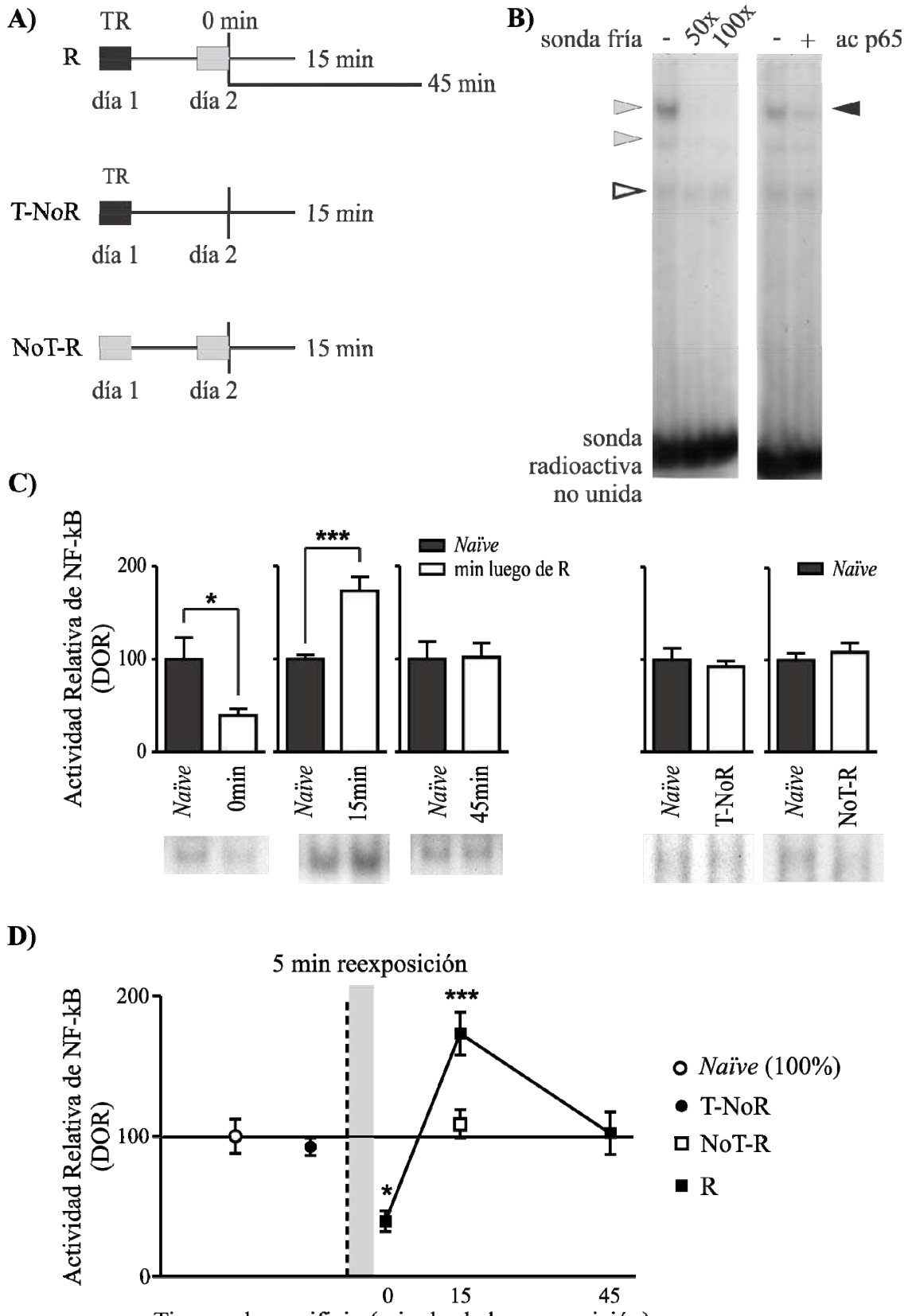
En la Figura III.5.CyD, se observa que inmediatamente luego de la reexposición al contexto hubo una disminución significativa de la actividad del FT, respecto de los animales *Naïve* (Prueba  $t$  de Student entre grupos:  $t = 2,47$ ;  $p < 0,05$ ). A los 15 min,

<sup>14</sup> Este grupo de animales fue sacrificado en el mismo punto temporal en el que se observó el aumento significativo de actividad de NF- $\kappa$ B.

<sup>15</sup> Se utilizó este diseño ya que no era posible realizar todos los grupos en simultáneo.

hubo un aumento significativo (Prueba *t* de Student entre grupos:  $t = 4,80$ ;  $p < 0,001$ ), que luego volvió a decrecer a los 45 min. Tanto el grupo control NoT-R como el control T-NoR no difieren significativamente del grupo *Naïve*, lo que implica que, por un lado, la reexposición al contexto es necesaria para que ocurran los cambios mencionados anteriormente (T-NoR), y por otro lado, que dichos cambios no están relacionados solamente con la reconsolidación de la información contextual *per se*, sino con la asociación de la información contextual y la experiencia aversiva (NoT-R).

*Junto con los resultados previos, podemos concluir que los cambios en la actividad de NF- $\kappa$ B en el hipocampo luego de la reexposición al contexto son necesarios para la reconsolidación de la memoria.*



**Figura III.5.** Curso temporal de actividad de NF- $\kappa$ B luego de 5 min de reexposición al contexto de entrenamiento, estimado con la técnica de EMSA. **A)** Protocolo experimental. Los animales entrenados en el día 1 se sacrificaron en el día 2, inmediatamente (punto temporal 0 min), 15 o 45 min después de 5 min de reexposición al contexto de entrenamiento (R). Se realizaron tres grupos control: un grupo *Naïve*, un grupo T-NoR (animales entrenados pero no reexpuestos al contexto el día 2), y un grupo NoT-R

(animales que fueron colocados en la caja de entrenamiento en día 1, recibieron los tonos pero no los choques eléctricos, fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento por 5 min el día 2, y sacrificados 15 min luego de la reexposición). **B)** Estudios de EMSA de extractos nucleares de hipocampo, utilizando como sonda radiactiva un oligodeoxinucleótido conteniendo la secuencia consenso de NF- $\kappa$ B. Imagen de la izquierda: en la primera calle se observan tres bandas; la competencia con sonda fría 50x (calle 2) o 100x (calle 3) determina las bandas específicas. La punta de flecha gris muestra las bandas específicas, la blanca la inespecífica. Imagen de la derecha, *supershift* con anticuerpo (ac) anti p65, que reduce la intensidad de la banda superior (punta de flecha negra), correspondiente al complejo p65/p50 [presencia de p50 verificada en (Boccia *et al.*, 2007)]. Esta banda es la que se utilizó en la cuantificación. **C)** Se muestran los niveles de la actividad de NF- $\kappa$ B de cada grupo R, T-NoR, y NoT-R, comparado con su respectivo *Naïve* -considerado como 100%, n=9-10 en cada grupo. Debajo de cada gráfico, se muestran bandas representativas del dímero p65/p50. Los datos se expresan como media de la DOR  $\pm$  SEM. **D)** Gráfico mostrando la actividad relativa de NF- $\kappa$ B de todos los grupos a la vez. Se muestra un grupo *Naïve* a modo de ejemplo. La barra gris representa los 5 min de reexposición al contexto de entrenamiento. Prueba *t* de Student comparando media de la actividad de NF- $\kappa$ B de cada grupo con su respectivo grupo *Naïve*: \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Sólo se indican en los gráficos las comparaciones que resultaron significativas.

### III.1.2. La inhibición de NF- $\kappa$ B facilita la extinción de la memoria

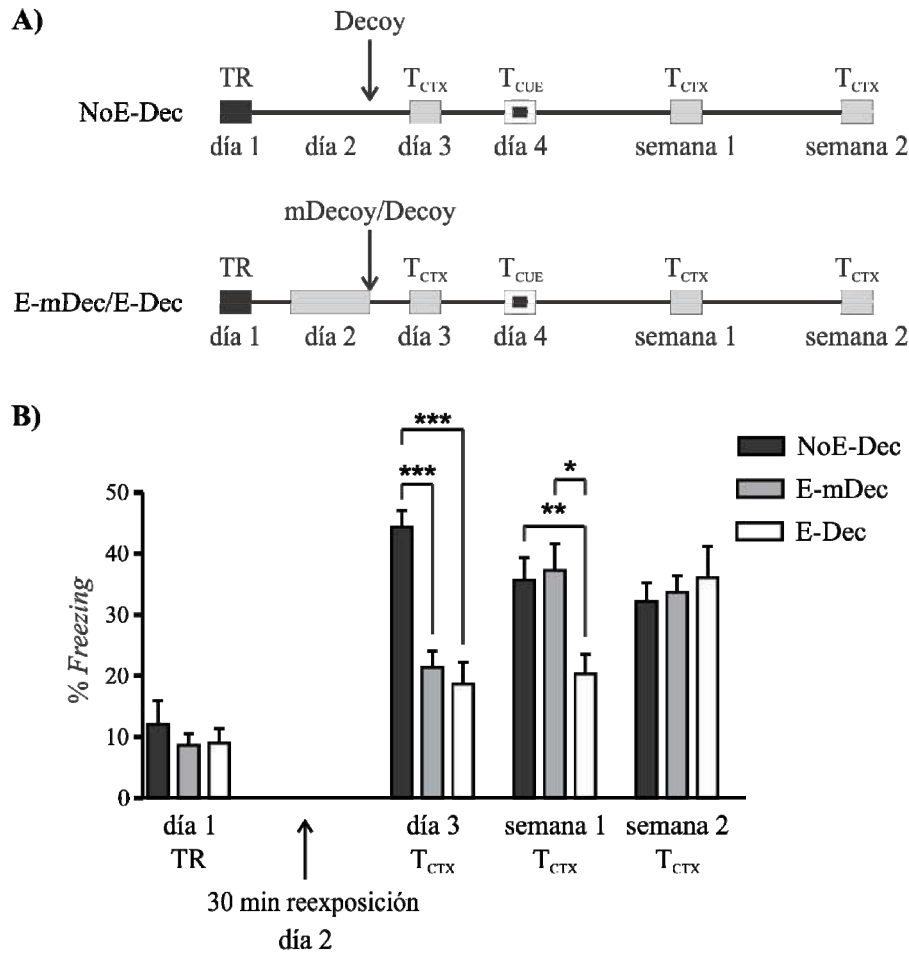
El único antecedente sobre el FT NF- $\kappa$ B en la fase de **extinción** fue realizado en nuestro laboratorio en el cangrejo *Neohelice granulata* (Merlo y Romano, 2008). Este estudio sugiere que para que ocurra la extinción, la actividad del FT debe disminuir. Para iniciar los estudios mecanísticos sobre la extinción, y a la vez evaluar la conservación evolutiva de ciertos procesos mnésicos, nos preguntamos cuál sería el rol de NF- $\kappa$ B en el hipocampo en dicha fase en el modelo de memoria utilizado en esta Tesis.

El protocolo utilizado se muestra en la Figura III.6.A. En el día del experimento se entrenaron 3 grupos de animales. Al día siguiente, dos grupos fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento por 30 min. Luego de la reexposición, a uno de uno de los grupos se le administró en el hipocampo el inhibidor específico de NF- $\kappa$ B, el Decoy (E-Dec), y al otro grupo el oligodeoxinucleótido control, el mDecoy (E-mDec). El grupo entrenado pero no reexpuesto, recibió la inyección intrahipocampal de Decoy (NoE-Dec).

Los resultados se muestran en la Figura III.6.B. Puede observarse que todos los grupos muestran niveles bajos de *freezing* en el día de entrenamiento, y no se observan diferencias significativas entre ellos. En el estudio de la extinción es importante evaluar el comportamiento de los animales a largo término, en nuestro caso, un día después del protocolo de extinción (día 3). Podemos ver que los dos grupos reexpuestos por 30 min el día 2, muestran un nivel de *freezing* significativamente más bajo que el no

reexpuesto, y además, no difieren entre sí [ANOVA de una vía comparando entre grupos:  $F(2,25) = 21,67$ ,  $p < 0,0001$ ; Prueba *post hoc* de Newman-Keuls para todos los pares de grupos: NoE-Dec vs. E-Dec:  $p < 0,001$ ; NoE-Dec vs. E-mDec:  $p < 0,001$ ]. Esto indica que hubo extinción de largo término, y que la inhibición de NF- $\kappa$ B aparentemente no la afectó. Una de las características definitorias de la extinción es la recuperación espontánea, que implica la reaparición de la memoria original con el simple paso del tiempo. Como esperábamos, en la evaluación de la memoria contextual a una semana del entrenamiento, podemos observar que el grupo E-mDec muestra un nivel de *freezing* alto y similar al del grupo no reexpuesto, evidenciando recuperación espontánea. Sin embargo, el grupo E-Dec continua con un nivel de *freezing* bajo [ANOVA:  $F(2,25) = 5,873$ ,  $p < 0,001$ ; Prueba *post hoc* de Newman-Keuls para todos los pares de grupos: NoE-Decoy vs. E-Decoy,  $p < 0,01$ , y E-mDecoy vs. E-Decoy,  $p < 0,05$ ]. En este punto, son posibles dos interpretaciones: 1) la inhibición de NF- $\kappa$ B luego de la reexposición afectó la memoria original y por lo tanto no ocurre la recuperación espontánea; 2) la inhibición de NF- $\kappa$ B facilitó la extinción. Los resultados de la evaluación de la memoria contextual a dos semanas de entrenamiento muestran un alto nivel de *freezing* todos los grupos, indicando que lo que ocurrió fue un retardo en la recuperación espontánea y que la memoria original no se afectó, demostrando que tuvo lugar una facilitación de la extinción.

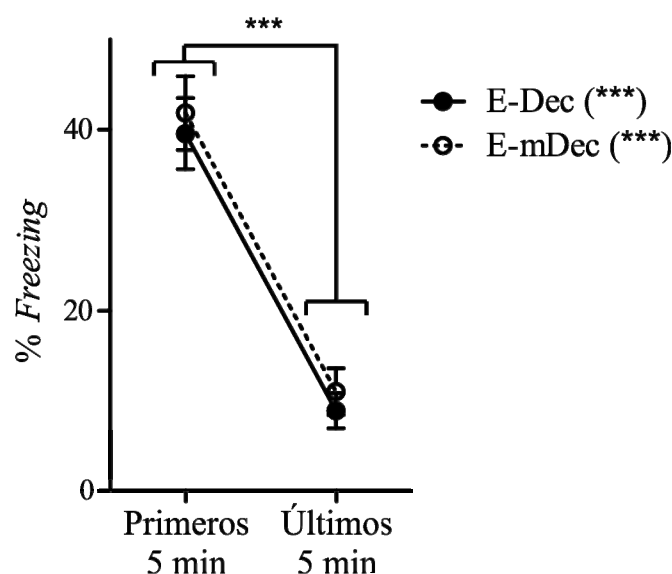




**Figura III.6.** Inhibición de NF- $\kappa$ B en el hipocampo dorsal luego de la reexposición *prolongada* al contexto de entrenamiento. Efecto en la memoria *contextual a largo término*. **A)** Protocolo experimental. Se entrenaron todos los grupos en el día 1; en el día 2, dos grupos se reexpusieron al contexto de entrenamiento por 30 min, y se les inyectó mDecoy (E-mDec; n=11) o Decoy (E-Dec; n=9). El tercer grupo no se reexpuso pero recibió la inyección de Decoy (NoE-Dec; n=8). Se realizaron evaluaciones de memoria contextual y de clave a diferentes tiempos. TR, sesión de entrenamiento; T<sub>CTX</sub>, evaluación de la memoria contextual; T<sub>CUE</sub>, evaluación de la memoria de clave. **B)** Media del porcentaje de *freezing* ( $\pm$  SEM) en el entrenamiento, en la reexposición y en las sucesivas evaluaciones de la memoria contextual. Dentro de cada día, se realizó un ANOVA de una vía comparando valores medios de porcentajes de *freezing* entre los tres grupos, seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls; \*: p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*: p<0,001. Sólo se indican en el gráfico las comparaciones que resultaron significativas.

Analizando detalladamente el comportamiento de los animales durante el protocolo de extinción (en la reexposición, día 2) podemos evaluar si ocurrió extinción intra-sesión. Como se observa en la Figura III.7, ambos grupos reexpuestos muestran una diferencia significativa en los niveles de *freezing* de los primeros 5 min vs. los últimos 5 min. No obstante, no muestran diferencias entre ellos, ni en los primeros ni en los últimos 5 min de reexposición [ANOVA de dos vías de medidas repetidas con ‘tiempo’ y ‘grupo’ como factores independientes: tiempo:  $F(1,18) = 188,90$ ,  $p < 0,0001$ ;

grupo:  $F(1,18) = 0,30$ ,  $p = 0,59$ ; interacción:  $F(1,18) = 0,001$ ,  $p = 0,97$ ; Prueba *post hoc* de Bonferroni entre los ‘primeros 5 min de la reexposición’ y los ‘últimos 5 min de la reexposición’ para todos los grupos: E-mDec:  $p < 0,001$ ; E-Dec:  $p < 0,001$ ]. En este caso en que la inyección de la droga fue posterior a la reexposición prolongada, la observación de la extinción intra-sesión es esperada, e indica una correcta *adquisición* de la memoria de extinción (a diferencia de la evaluación de la memoria a largo plazo – día 3-, que hace referencia a la memoria de extinción ya consolidada).



**Figura III.7.** Inhibición de NF- $\kappa$ B en el hipocampo dorsal luego de la reexposición *prolongada* al contexto de entrenamiento. Respuesta de freezing durante el protocolo de extinción (es decir, durante los 30 min de reexposición, día 2). Los animales y grupos son los mismos a los de la Figura III.6. Se realizó un ANOVA de dos vías de medidas repetidas con ‘tiempo’ y ‘grupo’ como factores independientes, comparando valores medios de porcentajes de *freezing*, seguido de una prueba *post hoc* de Bonferroni entre ‘Primeros 5 min’ y ‘Últimos 5 min’ para todos los grupos. Sólo se indican en el gráfico las comparaciones que resultaron significativas; los asteriscos al lado de los grupos indican la significancia de los análisis *post hoc* para cada grupo “Primeros 5 min” vs. “Últimos 5 min”; \*\*\* $p < 0,001$ .

Respecto a la evaluación de la memoria de clave (día 4), el *freezing* pre-tono fue similar en todos los grupos, mientras que el *freezing* durante el tono aumentó significativamente en todos los grupos, sin observarse diferencias significativas entre los mismos [ANOVA de dos vías de medidas repetidas con ‘tiempo’ y ‘grupo’ como factores independientes: tiempo:  $F(1,25) = 147,90$ ,  $p < 0,0001$ ; grupo:  $F(2,25) = 0,79$ ,  $p = 0,46$ ; interacción:  $F(2,25) = 0,22$ ,  $p = 0,80$ ; Prueba *post hoc* de Bonferroni entre ‘pre-tono’ y ‘durante el tono’ para todos los grupos: NoE-Dec:  $p < 0,001$ ; E-mDec:  $p < 0,001$ ; E-Dec:  $p < 0,001$ ], indicando que el condicionamiento de miedo a la clave no se ve afectado por el protocolo de extinción del condicionamiento de miedo contextual, ni

por la administración intrahipocampal del inhibidor de NF- $\kappa$ B. Estos resultados son esperados pues en primer lugar, la memoria de clave no dependería del hipocampo, y en segundo lugar, el tono no fue utilizado en la sesión de extinción, por lo que la memoria de clave no fue “extinguida”.

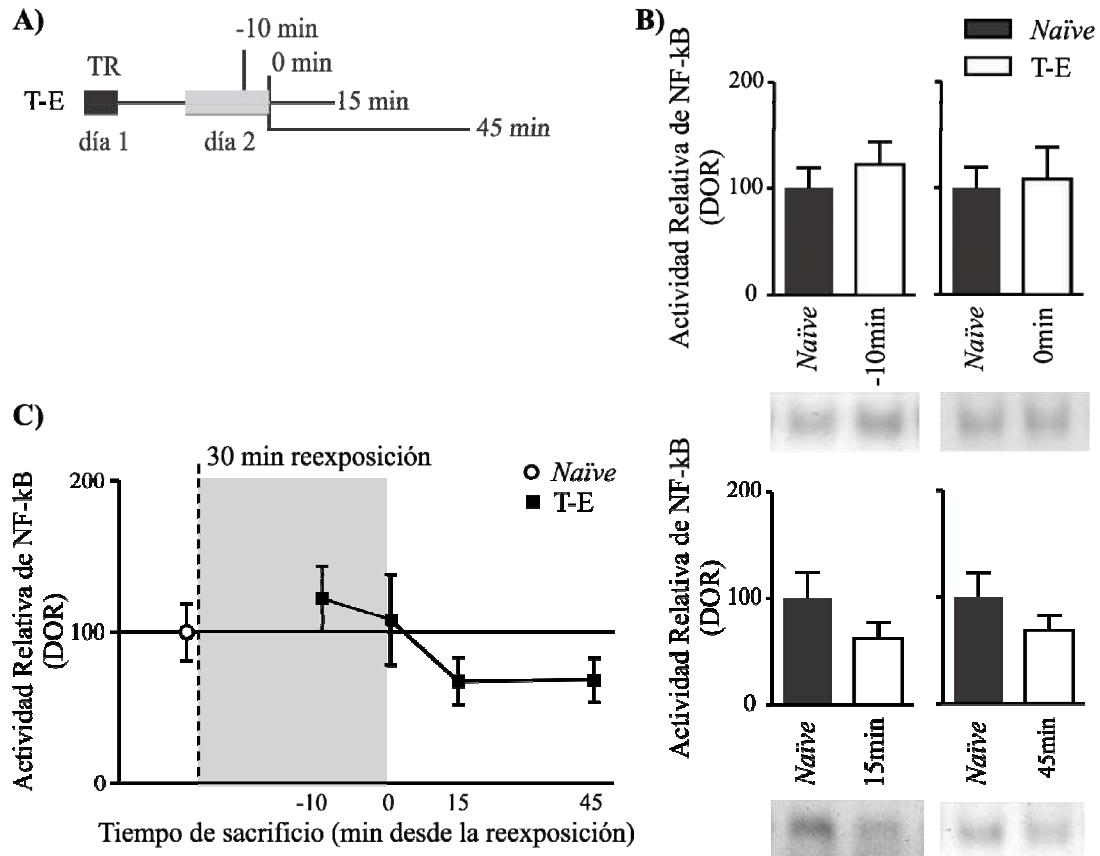
A continuación, hicimos un análisis de la actividad de NF- $\kappa$ B luego de la reexposición de 30 min al contexto. El protocolo experimental se muestra en la Figura III.8.A. Sacrificamos los ratones a diferentes tiempos luego de la reexposición prolongada al contexto: inmediatamente, luego de 15 min, y luego de 45 min (E-0 min, E-15 min y E-45 min, respectivamente). También incluimos un grupo de animales sacrificados inmediatamente luego de una reexposición de 20 min al contexto de entrenamiento (E- -10 min). Este punto equivale a los 5 min de reexposición necesarios para que ocurra la reconsolidación de la memoria más el tiempo en el que se observó el aumento significativo de NF- $\kappa$ B en dicha fase (punto temporal 15 min, ver Figura III.5.C,D). Entre la reexposición y los tiempos de sacrificio, los animales volvieron a sus cajas de alojamiento. Luego del sacrificio, los hipocampos fueron disecados, se prepararon extractos nucleares y se realizó la técnica de EMSA. Los extractos de cada grupo experimental se corrieron en el mismo gel junto con los extractos del grupo *Naïve*<sup>16</sup>, realizado comportamentalmente en paralelo a cada grupo experimental.

Como se observa en la Figura III.8.B y C, no se encontraron diferencias entre ninguno de los grupos respecto a sus respectivos grupos *Naïve*, aún en el punto temporal en el que se observó una activación de NF- $\kappa$ B luego de la reexposición de 5 min. De hecho, puede observarse una tendencia a la disminución de la actividad del FT a 15 y 45 min luego de la reexposición, que podría sugerir un proceso de bloqueo de la activación de NF- $\kappa$ B cuando la reexposición es prolongada.

*Los resultados de esta sección indican que la actividad de NF- $\kappa$ B no es necesaria en el hipocampo para la fase de extinción. Por el contrario, su inhibición la facilita.*

---

<sup>16</sup> Se utilizó este diseño ya que no era posible realizar todos los grupos en simultáneo.



**Figura III.8.** Curso temporal de actividad de NF- $\kappa$ B luego de 30 min de reexposición al contexto de entrenamiento, estimado con la técnica de EMSA. **A)** Protocolo experimental. Los animales entrenados en el día 1 se sacrificaron en el día 2, inmediatamente (punto temporal 0 min), 15 o 45 min después de 30 min de reexposición al contexto de entrenamiento (E). Se agregó un grupo experimental sacrificado inmediatamente después de una sesión de extinción de 20 min (ver texto). Para la estimación de actividad basal se incluyó un grupo *Naïve*. **B)** Se muestran los niveles de la actividad de NF- $\kappa$ B de cada grupo E comparado con su respectivo *Naïve* -considerado como 100%-,  $n=9-10$  en cada grupo. Debajo de cada gráfico, se muestran bandas representativas del dímero p65/p50. Los datos se expresan como media de la DOR  $\pm$  SEM. **C)** Gráfico mostrando la actividad relativa de NF- $\kappa$ B de todos los grupos a la vez. Se muestra un grupo *Naïve* a modo de ejemplo. La barra gris representa los 30 min de reexposición al contexto de entrenamiento. Prueba *t* de Student comparando cada tiempo con su respectivo grupo *Naïve*. No se registraron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones realizadas.

### III.2. ROL DE LA FOSFATASA CaN EN LA EXTINCIÓN Y RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA

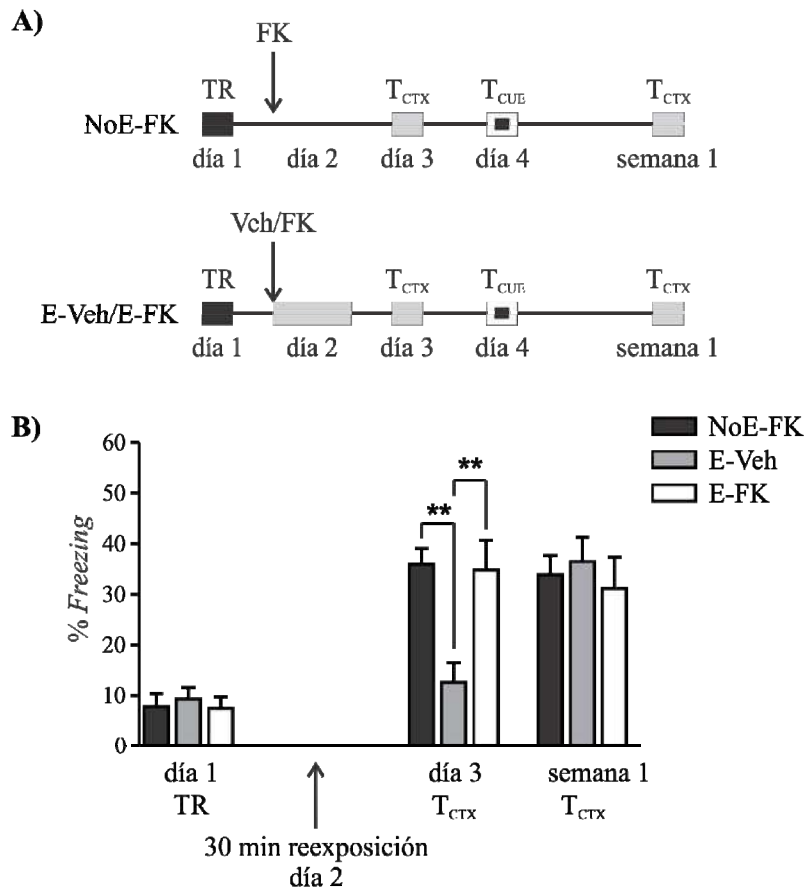
### **III.2.1. La fosfatasa CaN es necesaria para que ocurra la extinción de la memoria**

Los trabajos en los que se estudia el papel de la proteína fosfatasa CaN en la memoria sugieren que la inhibición de la misma favorece la formación de una memoria más fuerte que sería resistente a la extinción (Lin *et al.*, 2003b; Baumgartel *et al.*, 2008; Havekes *et al.*, 2008). Algunos estudios también indican que dicha proteína sería necesaria en dicha fase (Lin *et al.*, 2003c; Havekes *et al.*, 2008). Pocos indagan, sin embargo, en mecanismos celulares implicados. Por un lado, el trabajo de Baumgartel y col. (Baumgartel *et al.*, 2008) postula que la inhibición de CaN aumenta los niveles de ARNm del FT ZIF268. Por su parte, Lin y col. observaron que la inhibición de CaN inhibe la desfosforilación de AKT, necesaria para la extinción de la memoria (Lin *et al.*, 2003a; Lin *et al.*, 2003c). Nosotros postulamos que la activación de CaN sería un mecanismo mediante el cual se impide la activación de NF- $\kappa$ B en el caso de la reexposición prolongada.

En primer lugar, para evaluar si CaN está implicada en la extinción a largo término en nuestro modelo de memoria, realizamos el experimento que se muestra en la Figura III.9.A. En el primer día de experimento, se entrenaron 3 grupos de animales. Al día siguiente, dos grupos fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento por 30 min, luego de una inyección intrahipocampal de un inhibidor específico de CaN, el FK (E-FK), o de DMSO (E-Veh). El grupo entrenado pero no reexpuesto recibió la inyección intrahipocampal de FK (NoE-FK).

Los resultados se muestran en la Figura III.9.B. Puede observarse que todos los grupos muestran niveles bajos de *freezing* en el día de entrenamiento, y no se observan diferencias significativas entre ellos. En el estudio de la extinción es importante evaluar el comportamiento de los animales a largo término, en nuestro caso, un día después del protocolo de extinción (día 3). Podemos ver que el grupo inyectado con DMSO y reexpuesto por 30 min el día 2 (E-Veh), muestra un nivel de *freezing* significativamente más bajo que el grupo no reexpuesto, evidenciando extinción [ANOVA de una vía comparando entre grupos:  $F(2,21) = 8,78$ ,  $p < 0,01$ ; Prueba *post hoc* de Newman-Keuls para todos los pares de grupos: NoE-FK vs. E-Veh:  $p < 0,01$ ; E-Veh vs. E-FK:  $p < 0,01$ ]. Por el contrario, el grupo E-FK, muestra un nivel de *freezing* tan alto como el grupo no reexpuesto. Esto indica que la memoria original está intacta y que la memoria de extinción no se formó, e implica que CaN es necesaria para la formación de la

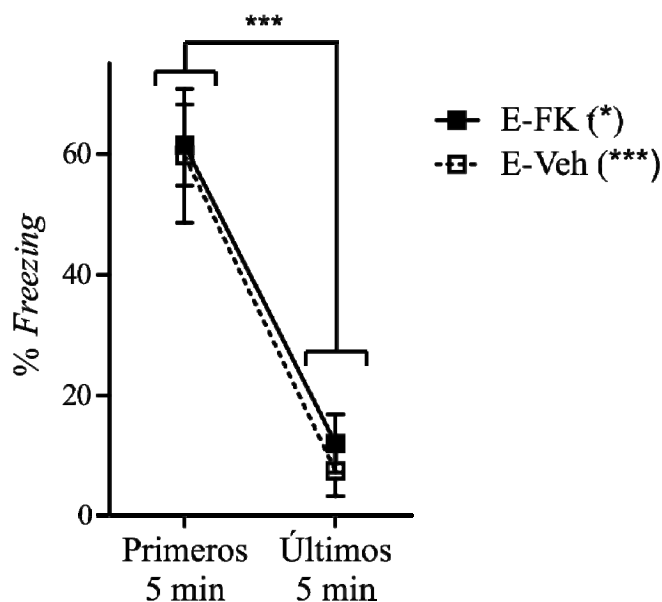
misma. Analizando la evaluación de la memoria contextual a una semana del entrenamiento, vemos que el grupo E-Veh muestra un nivel de *freezing* similar al grupo NoE-FK, lo que indica recuperación espontánea de la memoria original. Esta recuperación, como mencionamos anteriormente, es una prueba fehaciente de que la extinción ha tenido lugar.



**Figura III.9** Inhibición de *CaN* en el hipocampo dorsal previo a la reexposición *prolongada* al contexto de entrenamiento. Efecto en la memoria *contextual a largo término*. **A)** Protocolo experimental. Se entrenaron todos los grupos en el día 1; en el día 2, dos grupos se inyectaron con DMSO (E-Veh; n=8) o con FK (E-FK; n=8), y se reexpusieron al contexto de entrenamiento por 30 min; el tercer grupo se inyectó con FK pero no se reexpuso (NoE-FK; n=8). Se realizaron evaluaciones de memoria contextual y de clave a diferentes tiempos. TR, sesión de entrenamiento; T<sub>CTX</sub>, evaluación de la memoria contextual; T<sub>CUE</sub>, evaluación de la memoria de clave. **B)** Media del porcentaje de *freezing* (± SEM) en el entrenamiento, en la reexposición y en las sucesivas evaluaciones de la memoria contextual. Dentro de cada día, se realizó un ANOVA de una vía comparando valores medios de porcentajes de *freezing* entre los tres grupos, seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls; \*\**p*<0,01. Sólo se indican en el gráfico las comparaciones que resultaron significativas.

Analizando detalladamente el comportamiento de los animales durante el protocolo de extinción (en la reexposición, día 2) podemos evaluar si ocurrió extinción intra-sesión. Como se observa en la Figura III.10, ambos grupos reexpuestos muestran

una diferencia significativa en los niveles de *freezing* de los primeros 5 min vs. los últimos 5 min. No obstante, no muestran diferencias entre ellos, ni en los primeros ni en los últimos 5 min de reexposición [ANOVA de dos vías de medidas repetidas con ‘tiempo’ y ‘grupo’ como factores independientes: tiempo:  $F(1,14) = 29,76$ ,  $p < 0,001$ ; grupo:  $F(1,14) = 0,002$ ,  $p = 0,96$ ; interacción:  $F(1,14) = 1,017$ ,  $p = 0,33$ ; Prueba *post hoc* de Bonferroni entre los ‘primeros 5 min de la reexposición’ y los ‘últimos 5 min de la reexposición’ para todos los grupos: E-Veh:  $p < 0,05$ ; E-FK:  $p < 0,001$ ]. La observación de la extinción intra-sesión indica una correcta adquisición de la extinción. Recordemos que en este caso la inyección de la droga fue previa a la reexposición prolongada, por lo que podría interpretarse que la droga no afectó la adquisición, o que la misma no actuó dentro de ese intervalo de tiempo.



**Figura III.10.** Inhibición de CaN en el hipocampo dorsal previo a la reexposición *prolongada* al contexto de entrenamiento. Efecto en la respuesta de *freezing* durante el protocolo de extinción (es decir, durante los 30 min de reexposición, día 2). Los animales y grupos son los mismos a los de la Figura III.9. Se realizó un ANOVA de dos vías de medidas repetidas con ‘tiempo’ y ‘grupo’ como factores independientes, comparando valores medios de porcentajes de *freezing*, seguido de una prueba *post hoc* de Bonferroni entre ‘Primeros 5 min’ y ‘Últimos 5 min’ para todos los grupos. Sólo se indican en el gráfico las comparaciones que resultaron significativas; los asteriscos al lado de los grupos indican la significancia de los análisis *post hoc* para cada grupo “Primeros 5 min” vs. “Últimos 5 min”, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Para evaluar si la administración de FK produce cambios en la respuesta del animal incluso cuando este no es reexpuesto al contexto de entrenamiento, realizamos otro experimento comparando los niveles de *freezing* de animales no reexpuestos inyectados con FK (NoR-FK) o con DMSO (NoR-Veh). Se entrenaron los animales en

el día 1, se inyectaron en el día 2, y se evaluó la memoria contextual al día siguiente. No se encontraron diferencias significativas entre grupos [respuesta media de *freezing*  $\pm$  SEM: NoR-Veh: (32,92  $\pm$  3,60); NoR-FK: (42,38  $\pm$  7,67); Prueba *t* de Student entre grupos:  $t = 2,04$ ,  $p = 0,06$ ]. Estos resultados indican que el tratamiento con FK sólo tiene efecto cuando hay reexposición al contexto.

Respecto a la evaluación de la memoria de clave (día 4), el *freezing* pre-tono fue similar en todos los grupos, mientras que el *freezing* durante el tono aumentó significativamente en todos los grupos, sin observarse diferencias significativas entre los mismos [ANOVA de dos vías de medidas repetidas con ‘tiempo’ y ‘grupo’ como variables independientes: tiempo:  $F(1,21) = 46,00$ ,  $p < 0,0001$ ; grupo:  $F(2,21) = 0,15$ ,  $p = 0,86$ ; interacción,  $F(2,21) = 0,41$ ,  $p = 0,67$ ; Prueba *post hoc* de Bonferroni entre ‘pre-tono’ y ‘durante el tono’ para todos los grupos: NoE-FK:  $p < 0,001$ ; E-Veh:  $p < 0,01$ ; E-FK:  $p = 0,01$ ] indicando que el condicionamiento de miedo a la clave no se ve afectado por el protocolo de extinción del condicionamiento de miedo contextual, ni por la administración intrahipocampal del inhibidor de CaN.

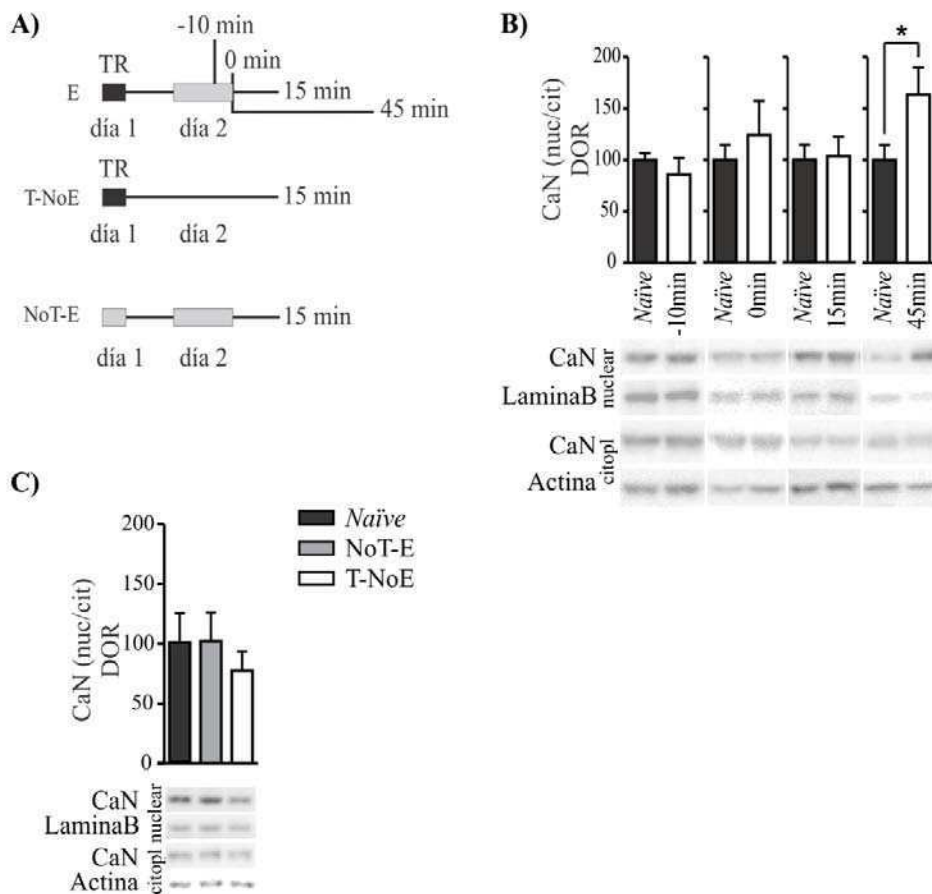
Los resultados anteriores surgieron que CaN juega un papel importante durante la formación de la memoria de extinción. Para estudiar esta posibilidad a nivel celular realizamos ensayos de *western blot* para analizar una posible translocación de dicha proteína desde el citoplasma al núcleo. Shibasaki y col. mostraron que CaN, cuando activa al FT NFAT, es capaz de translocar al núcleo acompañándolo (Shibasaki *et al.*, 1996).

Para este estudio, se utilizaron los mismos extractos que para el análisis de actividad de NF- $\kappa$ B en extinción, sólo que al obtener diferencias significativas en uno de los grupos (E-45 min) agregamos dos grupos más (NoT-E y T-NoE) para evaluar si dichas diferencias se debían a la extinción de la asociación EC-EI o a alguna información relacionada al contexto. El protocolo del experimento se muestra en la Figura III.11.A y en la Figura III.11.B se presentan los resultados. Puede observarse un aumento significativo en el índice de translocación 45 min luego de la reexposición de 30 min, que normalmente da lugar a la extinción de la memoria (Prueba *t* de Student entre ‘45 min’ y *Naïve*:  $t = 2,28$ ;  $p < 0,05$ ). El no observar diferencias significativas entre los grupos NoT-E y T-NoE con sus respectivos grupos *Naïve*, indica que el aumento de translocación de CaN previamente mencionado se debe a la extinción de la asociación del EC-EI y no a la reexposición prolongada *per se* (NoT-E vs. *Naïve*).



Además, depende estrictamente de la reexposición prolongada al contexto (T-NoE vs. *Naïve*; Figura III.11.C).

*En su conjunto los resultados de esta sección sugieren la actividad de CaN en el hipocampo es necesaria para que ocurra la extinción.*



**Figura III.11.** Curso temporal de la translocación de CaN luego de 30 min de reexposición al contexto de entrenamiento, estimado con la técnica de western blot. **A)** Protocolo experimental. Los animales entrenados en el día 1 se sacrificaron en el día 2, inmediatamente (punto temporal 0 min), 15 o 45 min después de 30 min de reexposición al contexto de entrenamiento (E). Se agregó un grupo experimental sacrificado inmediatamente después de una sesión de extinción de 20 min (ver texto). Para la estimación de actividad basal se incluyó un grupo *Naïve*. Se realizaron dos controles más: animales entrenados pero no reexpuestos al contexto de entrenamiento el día 2 (T-NoE) y animales colocados en el contexto de entrenamiento el día 1, pero que no recibieron el choque eléctrico y sí fueron reexpuestos por 30 min al contexto de entrenamiento el día 2 (NoT-E). **B)** Índice de translocación de CaN (nuc/cit). Los datos se expresan como media del índice de translocación (nuc/cit)  $\pm$  SEM;  $n=12-17$  en cada grupo. Prueba *t* de Student comparando cada tiempo con su respectivo grupo *Naïve*:  $*p<0,05$ . **C)** Índice de translocación de CaN en grupos control (T-NoE, NoT-E y *Naïve*); se realizó un ANOVA de una vía comparando valores de índice de translocación entre los tres grupos, seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls. Debajo de cada gráfico se muestran las bandas representativas obtenidas por *Western blot*. Sólo se indican en el gráfico las comparaciones que resultaron significativas.

### III.2.2. La fosfatasa CaN no sería necesaria para que ocurra la reconsolidación de la memoria

Dado que nuestro interés es hacer un análisis comparativo entre las fases de reconsolidación y extinción, decidimos evaluar si CaN es necesaria también en la reconsolidación de la memoria. Si la reconsolidación recapitula la consolidación, se esperaría que la inhibición de CaN facilite la reconsolidación. En cambio, podría suceder que CaN fuese necesaria para que la misma ocurra o que no tuviese rol alguno en dicha fase de la memoria. No existen a la fecha, trabajos que estudien el rol de CaN en la reconsolidación de la memoria.

Con un protocolo experimental similar al utilizado en el estudio de NF- $\kappa$ B, evaluamos el rol de CaN en la reconsolidación (Figura III.12.A). En el día 1 del experimento se entrenaron tres grupos de animales. Al día siguiente, dos de los grupos se reexpusieron al contexto de entrenamiento por 5 min. Previo a la reexposición, uno de los grupos recibió una inyección intrahipocampal del inhibidor específico de CaN (R-FK<sup>17</sup>), mientras que el otro grupo recibió DMSO (R-Veh). El grupo no reexpuesto recibió FK (NoR-FK).

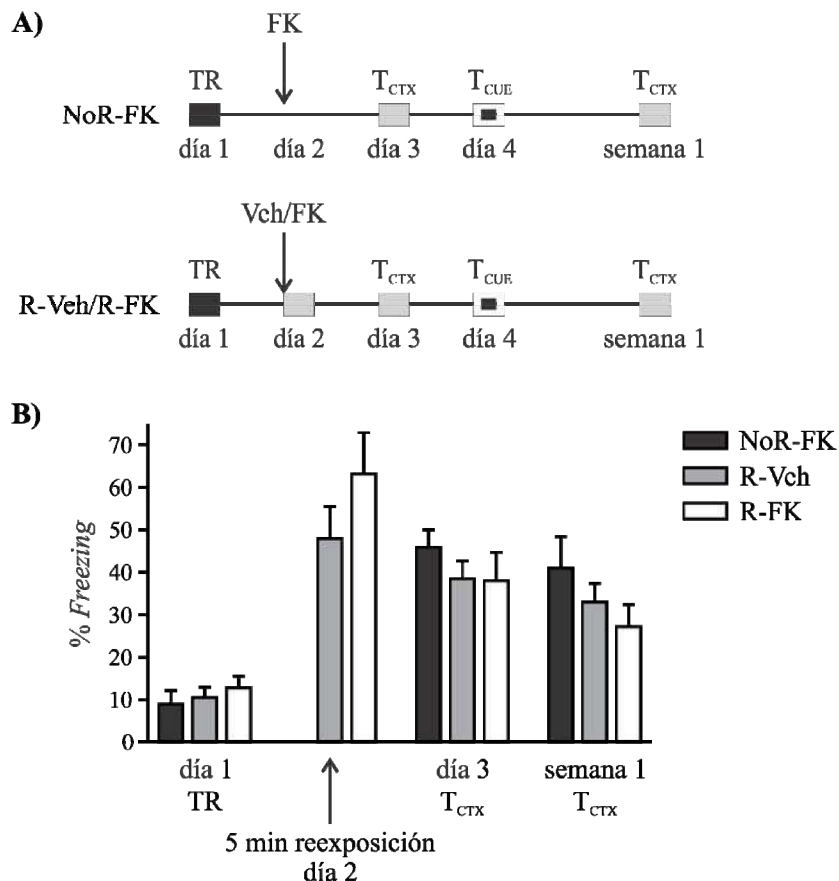
Como se observa en la Figura III.12.B en el entrenamiento no hubo diferencias significativas entre los grupos, y el nivel de *freezing* fue bajo. En el día de la reexposición, ambos grupos reexpuestos mostraron un nivel de *freezing* similar y elevado, lo que indica que la inyección previa no afecta la evocación de la memoria. Analizando la evaluación de la memoria contextual del día siguiente (día 3), podemos ver que los grupos no difirieron significativamente entre sí, mostrando a su vez un porcentaje de *freezing* alto. En la evaluación a una semana, los resultados se repitieron. Esto implicaría que la inhibición de CaN previo a una reexposición al contexto, no afecta la memoria original.

Respecto a la evaluación de la memoria de clave (día 4), el *freezing* pre-tono fue similar en todos los grupos, mientras que el *freezing* durante el tono aumentó significativamente en todos los grupos, sin observarse diferencias significativas entre los mismos [ANOVA de dos vías de medidas repetidas con ‘tiempo’ y ‘grupo’ como factores independientes: tiempo:  $F(1,27) = 30,99$   $p < 0,0001$ ; grupo:  $F(2,27) = 0,44$ ,  $p = 0,64$ ; interacción,  $F(2,27) = 0,36$ ,  $p = 0,70$ ; Prueba *post hoc* de Bonferroni entre ‘pre-tono’ y ‘durante el tono’ para todos los grupos: NoR-FK:  $p < 0,05$ ; R-Veh:  $p < 0,001$ ;

<sup>17</sup> Utilizamos la misma dosis que en los experimentos de extinción.

R-FK:  $p < 0,05$ ] indicando que el condicionamiento de miedo a la clave no se ve afectado por la reactivación de la memoria de condicionamiento de miedo contextual, ni por la administración intrahipocampal del inhibidor de CaN.

*Los resultados de esta sección sugieren que la actividad de CaN no sería necesaria en el hipocampo para la fase de reconsolidación.*



**Figura III.12.** Inhibición de CaN en el hipocampo dorsal previo a la reactivación de la memoria contextual por reexposición breve al contexto de entrenamiento. Efecto en la memoria **contextual a largo término**. **A)** Protocolo experimental. Todos los grupos fueron entrenados en el día 1; en el día 2, inyectados con DMSO (R-Veh;  $n=12$ ) o con FK (R-FK;  $n=10$ ; blanco), y reexpuestos por 5 min al contexto de entrenamiento; o fueron inyectados con FK y no reexpuestos (NoR-FK;  $n=8$ ). Se realizaron evaluaciones de memoria contextual y de clave a diferentes tiempos. TR, sesión de entrenamiento;  $T_{CTX}$ , evaluación de la memoria contextual;  $T_{CUE}$ , evaluación de la memoria de clave. **B)** Media del porcentaje de *freezing* ( $\pm$  SEM) en el entrenamiento, en la reexposición y en las sucesivas evaluaciones de la memoria contextual. Dentro de cada día, se realizó un ANOVA de una vía comparando valores medios de porcentajes de *freezing* entre los tres grupos, seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls. No se registraron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones realizadas.

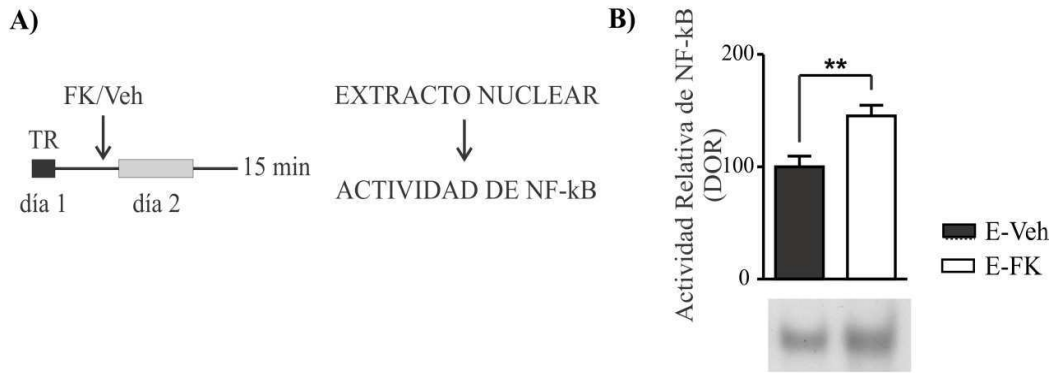
### ***III.2.3. CaN inhibe a NF-κB cuando se induce la extinción de la memoria***

En vista de los resultados anteriores, nos propusimos estudiar una posible relación entre CaN, necesaria en la fase de extinción, y NF-κB, necesario en la reconsolidación. Para ello diseñamos el experimento que se muestra en la Figura III.13.A. Se entrenaron dos grupos de animales, que al día siguiente se reexpusieron al contexto de entrenamiento por 30 min. Previo a la reexposición, uno de los grupos recibió la inyección intrahipocampal de FK (E-FK), mientras que el otro grupo, de DMSO (E-Veh). Quince min<sup>18</sup> luego de la reexposición los animales se sacrificaron y los hipocampos se disecaron. Se realizaron extractos nucleares, y se evaluó la actividad de NF-κB con la técnica de EMSA. El grupo E-FK muestra una actividad de NF-κB significativamente mayor al grupo E-Veh (Prueba *t* de Student entre grupos:  $t = 3,36$ ,  $p < 0,01$ ; Figura III.13.B). Esta activación de NF-κB podría ocurrir por la simple inhibición de la fosfatasa CaN, que produce un desbalance en el equilibrio natural entre proteínas fosforiladas, hacia el lado de la desfosforilación. Para probar si dicha activación ocurre por la inhibición de CaN exclusivamente, o si además es necesaria la reexposición al contexto, es que también evaluamos la actividad de NF-κB en animales no reexpuestos, inyectados con el inhibidor de CaN o con DMSO (NoE-FK y NoE-Veh respectivamente). Los niveles de NF-κB no difirieron entre grupos, lo que sugiere que CaN se activaría durante o después del protocolo de extinción, impidiendo la activación de NF-κB [actividad relativa de NF-κB (DOR) ± SEM: NoR-Veh: (100,0 ± 3,13),  $n = 10$ ; NoR-FK: (100,2 ± 1,9),  $n = 10$ ; Prueba *t* de Student entre grupos:  $t = 0,05$ ,  $p = 0,96$ ].

*Considerando los resultados hasta aquí mostrados, podemos decir que la fosfatasa CaN está involucrada en el switch molecular entre reconsolidación y extinción de la memoria, en el hipocampo de ratón.*

---

<sup>18</sup> Este es el punto temporal en el que observamos un aumento significativo en la actividad de NF-κB luego de la reexposición breve al contexto de entrenamiento (reconsolidación).



**Figura III.13.** *Efecto de la inhibición de CaN en la actividad de NF-κB.* **A)** Protocolo experimental. Dos grupos de animales fueron entrenados, al día siguiente inyectados con FK o DMSO y reexpuestos al contexto de entrenamiento por 30 min. Luego de 15 min de la sesión de extinción, los animales fueron sacrificados y se evaluó la actividad de NF-κB utilizando la técnica de EMSA. La actividad de NF-κB fue estimada por un análisis de la DOR de la banda correspondiente al dímero p65/p50, obtenida de extractos nucleares de hipocampo. Los datos se expresan como media de la DOR ± SEM (se consideró 100% al grupo inyectado con DMSO). Debajo del gráfico se muestran las bandas representativas. Se realizó una prueba *t* de Student comparando ambos grupos: \*\**p* < 0,01.

### III.3. ROL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NFAT EN LA EXTINCIÓN Y LA RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA

#### III.3.1 *El factor de transcripción NFAT es necesario para que ocurra la extinción de la memoria*

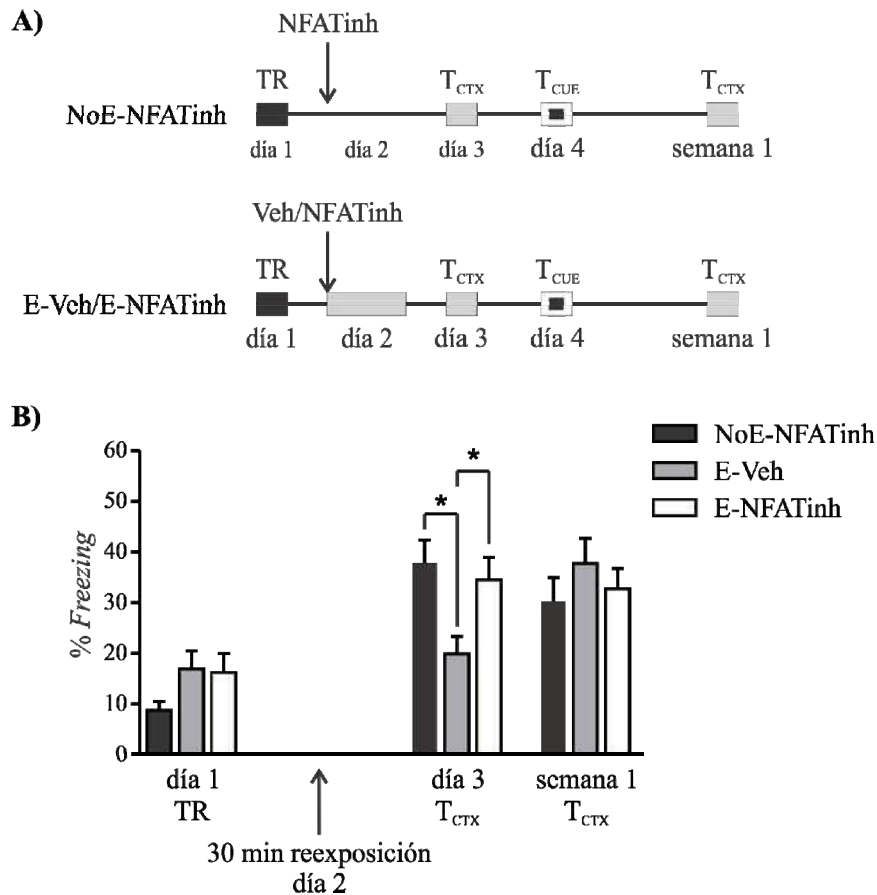
En el campo de la neurobiología, y de la memoria en particular, se han realizado numerosos estudios analizando vías clásicas de activación de transducción de señales en las cuales las proteínas se activan por fosforilación. En ese contexto, desfosforilación es sinónimo de inactivación proteica. Sin embargo, poco se conoce sobre las proteínas que son activadas por desfosforilación.

En la sección anterior mostramos que CaN es necesaria para que ocurra la extinción de la memoria de miedo contextual. Nos resultó relevante indagar sobre su rol no sólo como inhibidora de ciertos procesos transcripcionales sino también como activadora de otros. Decidimos entonces estudiar si durante la extinción se activan mecanismos de regulación génica dependiente de esta fosfatasa. El FT NFAT es canónicamente activado en distintos tipos celulares por CaN mediante desfosforilaciones y además esta fosfatasa permite su translocación al núcleo (Sugiura

*et al.*, 2001). Asimismo, nunca se había estudiado previamente su participación en procesos relacionados con la memoria.

Por lo tanto, evaluamos la posible participación de NFAT en la extinción, utilizando un inhibidor específico de la unión de NFAT a CaN (NFATinh). Dicho inhibidor actúa sobre todos los miembros de la familia NFAT en general. El protocolo experimental se muestra en la Figura III.14.A. En el primer día de experimento se entrenaron 3 grupos de animales. Al día siguiente, dos grupos fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento por 30 min, luego de una inyección intrahipocampal del inhibidor de NFAT (E-NFATinh), o de DMSO (E-Veh). El grupo entrenado pero no reexpuesto recibió la inyección intrahipocampal de NFATinh (NoE-NFATinh).

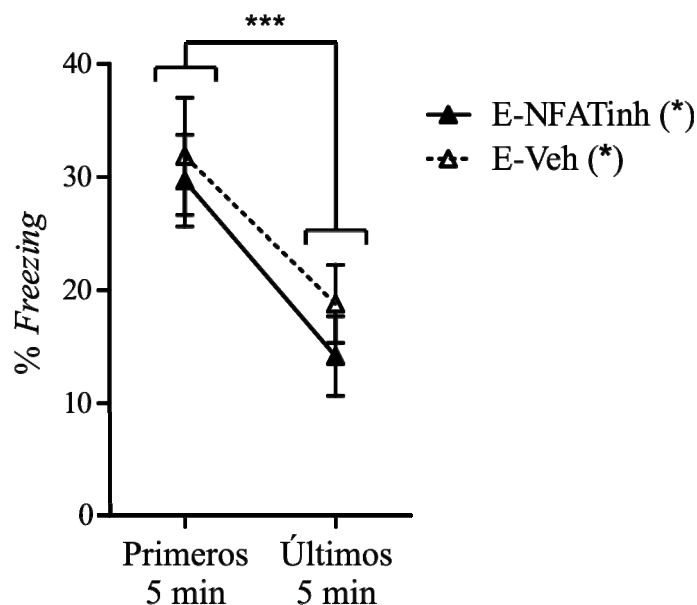
Los resultados se muestran en la Figura III.14.B, y son muy similares a los de los obtenidos con la inhibición de CaN. Efectivamente puede observarse que los grupos muestran un nivel de *freezing* bajo en el día de entrenamiento, y no se observan diferencias significativas entre los mismos. Un día después del protocolo de extinción (día 3), podemos ver que el grupo inyectado con DMSO (E-Veh) y reexpuesto por 30 min el día 2, muestra un nivel de *freezing* significativamente más bajo que el grupo no reexpuesto, evidenciando extinción [ANOVA de una vía comparando entre grupos:  $F(2,25) = 4,95$ ,  $p < 0,05$ ; Prueba *post hoc* de Newman-Keuls para todos los pares de grupos: NoE-NFATinh vs. E-Veh:  $p < 0,05$ ; E-Veh vs. E-NFATinh:  $p < 0,05$ ]. Sin embargo, el grupo E-NFATinh muestra un nivel de *freezing* tan alto como el grupo no reexpuesto. Esto indica que la memoria original está intacta y que la memoria de extinción no se formó, e implica que NFAT es necesario para la formación de la misma. Analizando la evaluación de la memoria contextual a una semana del entrenamiento, vemos que el grupo E-Veh muestra un nivel de *freezing* similar al grupo NoE-NFATinh, lo que indica recuperación espontánea de la memoria original. Esta recuperación es una prueba fehaciente de que la extinción ha tenido lugar.



**Figura III.14.** Inhibición de NFAT en el hipocampo dorsal previo a la reexposición *prolongada* al contexto de entrenamiento. Efecto en la memoria *contextual a largo término*. **A)** Protocolo experimental. Todos los grupos se entrenaron en el día 1; en el día 2, dos grupos se inyectaron con DMSO (E-Veh; n=9) con un inhibidor de NFAT (E-NFATinh; n=10), y se reexpusieron al contexto de entrenamiento por 30 min; el tercer grupo se inyectó con NFATinh pero no se lo reexpuso (NoE-NFATinh; n=9). Se realizaron evaluaciones de memoria contextual y de clave a diferentes tiempos. TR, sesión de entrenamiento; T<sub>CTX</sub>, evaluación de la memoria contextual; T<sub>CUE</sub>, evaluación de la memoria de clave. **B)** Media del porcentaje de *freezing* ( $\pm$  SEM) en el entrenamiento, en la reexposición y en las sucesivas evaluaciones de la memoria contextual. Dentro de cada día, se realizó un ANOVA de una vía comparando valores medios de porcentajes de *freezing* entre los tres grupos, seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls; \* $p < 0,05$ . Sólo se indican en el gráfico las comparaciones que resultaron significativas.

Analizando detalladamente el comportamiento de los animales durante el protocolo de extinción (en la reexposición, día 2) podemos evaluar si ocurrió extinción intra-sesión. Como se observa en la Figura III.15, ambos grupos reexpuestos muestran una diferencia significativa en los niveles de *freezing* de los primeros 5 min vs. los últimos 5 min. No obstante, no muestran diferencias entre ellos, ni en los primeros ni en los últimos 5 min de reexposición [ANOVA de dos vías de medidas repetidas con ‘tiempo’ y ‘grupo’ como factores independientes: tiempo:  $F(1,17) = 20,00$ ,  $p < 0,001$ ; grupo:  $F(1,17) = 0,47$ ,  $p = 0,50$ ; interacción:  $F(1,14) = 0,15$ ,  $p = 0,70$ ; Prueba *post hoc*

de Bonferroni entre los ‘primeros 5 min de la reexposición’ y los ‘últimos 5 min de la reexposición’ para todos los grupos: E-Veh:  $p < 0,05$ ; E-NFATinh:  $p < 0,05$ ). La observación de la extinción intra-sesión indica una correcta adquisición de la extinción. Al igual que para la inhibición de CaN, recordemos que en este caso la inyección de la droga NFATinh fue previa a la reexposición prolongada, por lo que podría interpretarse que la droga no afectó la adquisición, o a que la droga todavía no actuó.



**Figura III.15.** Inhibición de NFAT en el hipocampo dorsal previo a la reexposición *prolongada* al contexto de entrenamiento. Efecto en la respuesta de freezing durante el protocolo de extinción (es decir, durante los 30 min de reexposición, día 2). Los animales y grupos son los mismos a los de la Figura III.14. Se realizó un ANOVA de dos vías de medidas repetidas con ‘tiempo’ y ‘grupo’ como factores independientes, comparando valores medios de porcentajes de *freezing*, seguido de una prueba *post hoc* de Bonferroni entre ‘Primeros 5 min’ y ‘Últimos 5 min’ para todos los grupos. Sólo se indican en el gráfico las comparaciones que resultaron significativas; los asteriscos al lado de los grupos indican la significancia de los análisis *post hoc* para cada grupo “Primeros 5 min” vs. “Últimos 5 min”; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Para evaluar si la administración del inhibidor de NFAT produce cambios en la respuesta del animal incluso cuando este no es reexpuesto al contexto de entrenamiento, realizamos otro experimento comparando los niveles de *freezing* de animales no reexpuestos inyectados con dicho inhibidor (NoR-NFATinh) o con DMSO (NoR-Veh). Los animales se entrenaron en el día 1, se inyectaron en el día 2, y se evaluaron para la memoria contextual al día siguiente. No se encontraron diferencias significativas entre grupos [respuesta media de *freezing*  $\pm$  SEM: NoR-Veh:  $(26,52 \pm 4,19)$ ; NoR-NFATinh:  $(34,59 \pm 6,55)$ ; Prueba *t* de Student entre grupos:  $t = 1,09$ ,  $p = 0,29$ ]. Estos resultados



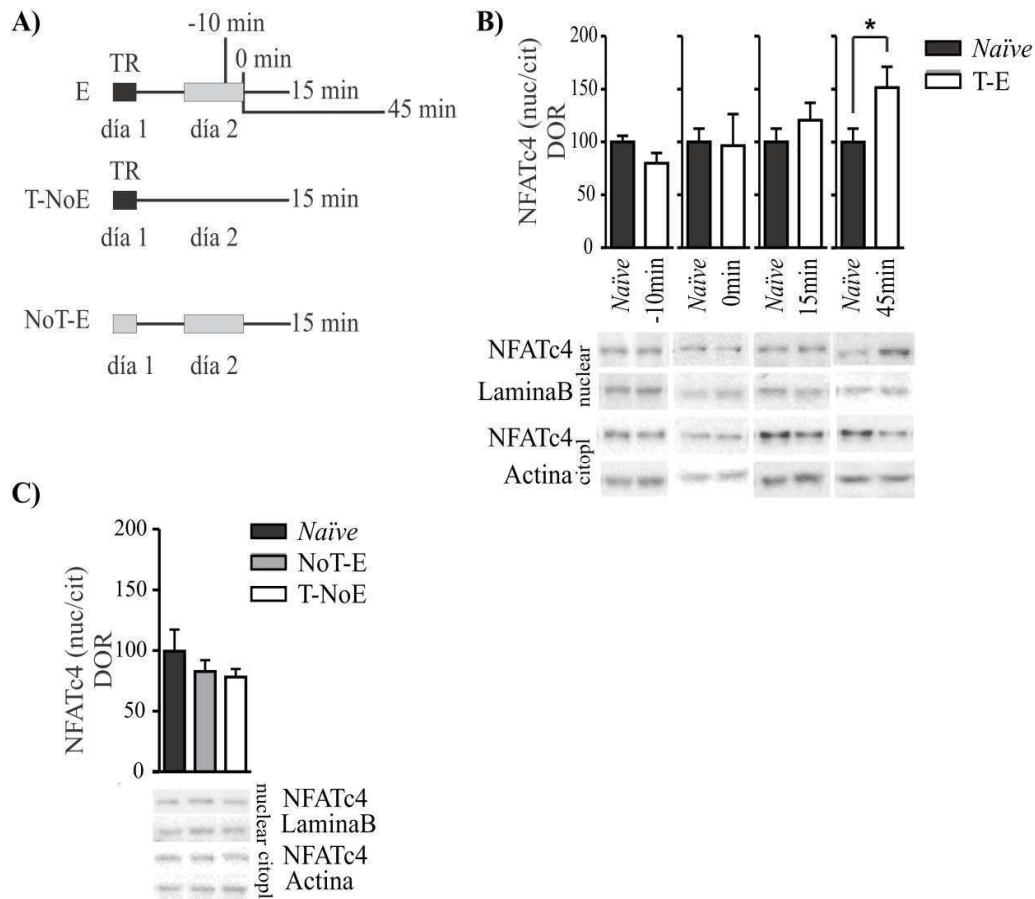
indican que el tratamiento con el inhibidor de NFAT solo tiene efecto cuando hay reexposición al contexto.

Respecto a la evaluación de la memoria de clave (día 4), el *freezing* pre-tono fue similar en todos los grupos, mientras que el *freezing* durante el tono aumentó significativamente en todos los grupos, sin observarse diferencias significativas entre los mismos [ANOVA de dos vías de medidas repetidas con ‘tiempo’ y ‘grupo’ como factores independientes: tiempo:  $F(1,25) = 27,94$ ,  $p < 0,0001$ ; grupo:  $F(2,25) = 0,92$ ,  $p = 0,41$ ; interacción:  $F(2,25) = 0,06$ ,  $p = 0,94$ ; Prueba *post hoc* de Bonferroni entre ‘pre-tono’ y ‘durante el tono’ para todos los grupos: NoE-NFATinh:  $p < 0,05$ ; E-Veh:  $p < 0,01$ ; E-NFATinh:  $p < 0,01$ ] indicando que el condicionamiento de miedo a la clave no se ve afectado por el protocolo de extinción del condicionamiento de miedo contextual, ni por la administración intrahipocampal del inhibidor de NFAT.

Como se mencionó anteriormente, CaN activa a NFAT por desfosforilación y translocación al núcleo. Por lo tanto, decidimos estudiar la posible translocación de NFAT en los mismos extractos en los que encontramos translocación para CaN. En particular estudiamos la isoforma NFATc4, ya que es muy abundante en el sistema nervioso, particularmente en el hipocampo (Graef *et al.*, 1999), y estudios previos la relacionan con BDNF (Groth y Mermelstein, 2003; Groth y Mermelstein, 2007; Vashishta *et al.*, 2009), una proteína altamente involucrada en procesos de memoria. Se ha demostrado previamente que la translocación nuclear de este FT correlaciona con un aumento en su actividad transcripcional (Graef *et al.*, 1999).

El protocolo experimental es el mismo que el de la Figura III.11.A (Figura III.16.A). Puede observarse una translocación significativa del citoplasma al núcleo 45 min luego de la reexposición (Prueba *t* de Student entre ‘45 min’ y *Naïve*:  $t = 2,16$ ;  $p < 0,05$ ; Figura III.16.B). El mismo punto temporal en el que CaN transloca (Figura III.11.B). El no observar diferencias significativas entre los grupos NoT-E y T-NoE con sus respectivos *Naïve* (III.16.B), indica que el aumento de translocación de NFATc4 previamente mencionado se debe a la extinción de la asociación del EC-EI y no a la reexposición prolongada *per se* (NoT-E vs. *Naïve*). Además, depende estrictamente de la reexposición prolongada al contexto (T-NoE vs. *Naïve*; Figura III.16.C).

*Los resultados en esta sección sugieren la actividad del FT NFAT en el hipocampo es necesaria para que ocurra la extinción de largo término.*



**Figura III.16.** Curso temporal de la translocación de NFATc4 luego de 30 min de reexposición al contexto de entrenamiento, estimado con la técnica de western blot. **A)** Protocolo experimental. Los animales entrenados en el día 1 fueron sacrificados en el día 2, inmediatamente (punto temporal 0 min), 15 o 45 min después de 30 min de reexposición al contexto de entrenamiento (E). Se agregó un grupo experimental sacrificado inmediatamente después de una sesión de extinción de 20 min (ver texto). Para la estimación de actividad basal se incluyó un grupo *Naïve*. Se realizaron dos controles más: animales entrenados pero no reexpuestos al contexto de entrenamiento el día 2 (T-NoE) y animales colocados en el contexto de entrenamiento el día 1, pero que no recibieron el choque eléctrico y sí fueron reexpuestos por 30 min al contexto de entrenamiento el día 2 (NoT-E). **B)** Índice de translocación de NFATc4 (nuc/cit). Los datos se expresan como media del índice de translocación (nuc/cit)  $\pm$  SEM;  $n=12-17$  en cada grupo. Prueba *t* de Student comparando cada tiempo con su respectivo grupo *Naïve*:  $*p<0,05$ . **C)** Índice de translocación de NFATc4 en grupos control (T-NoE, NoT-E y *Naïve*); se realizó un ANOVA de una vía comparando valores de índice de translocación entre los tres grupos, seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls. Debajo de cada gráfico se muestran las bandas representativas obtenidas por *Western blot*. Prueba *t* de Student comparando cada tiempo con su respectivo grupo *Naïve*:  $*p<0,05$ . Sólo se indican en el gráfico las comparaciones que resultaron significativas.

### III.3.2. El factor de transcripción NFAT no estaría implicado en la reconsolidación de la memoria

En esta sección evaluamos si el papel de NFAT es específico de la formación de la extinción o participa también en la reconsolidación de la memoria. Con este propósito

realizamos el experimento cuyo protocolo se muestra en la Figura III.17.A. En el día 1 se entrenaron 3 grupos de animales. Al día siguiente, dos de los grupos fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento por 5 min. Previo a la reexposición, uno de los grupos recibió una inyección intrahipocampal del inhibidor específico de NFAT (R-NFATinh<sup>19</sup>), mientras que el otro grupo recibió DMSO (R-Veh). El grupo no reexpuesto recibió NFATinh (NoR-NFATinh).

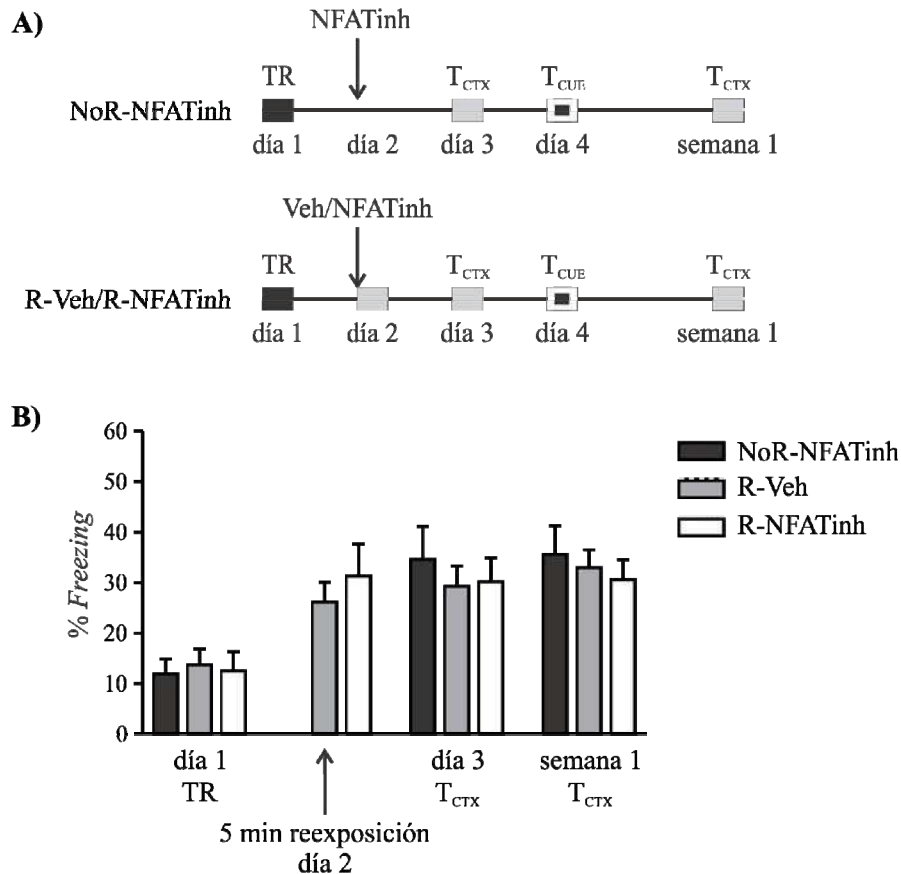
Como se observa en la Figura III.17.B, en el entrenamiento no hubo diferencias significativas entre los grupos, y el *freezing* fue bajo. En el día de la reexposición, ambos grupos reexpuestos mostraron un *freezing* similar y elevado, lo que indica que la inyección previa no afecta la evocación de la memoria. Analizando la evaluación de memoria contextual del día siguiente (día 3), podemos ver que los grupos no difirieron significativamente entre sí, mostrando a su vez un *freezing* alto. En la evaluación a una semana, los resultados se repitieron. Esto implicaría que la inhibición de NFAT previo a una reexposición al contexto, no afecta la memoria original.

Respecto a la evaluación de la memoria de clave (día 4), el *freezing* pre-tono fue similar en todos los grupos, mientras que el *freezing* durante el tono aumentó significativamente en todos los grupos, sin observarse diferencias significativas entre los mismos [ANOVA de dos vías de medidas repetidas con ‘tiempo’ y ‘grupo’ como factores independientes tiempo:  $F(1,23) = 41,37, p < 0,0001$ ; grupo:  $F(2,23) = 0,33, p = 0,72$ ; interacción:  $F(2,23) = 0,10, p = 0,91$ ; Prueba *post hoc* de Bonferroni entre ‘pre-tono’ y ‘durante el tono’ para todos los grupos: NoR-NFATinh:  $p < 0,05$ ; R-Veh,  $p < 0,01$ ; R-NFATinh,  $p < 0,01$ ] indicando que el condicionamiento de miedo a la clave no se ve afectado por la reactivación de la memoria de condicionamiento de miedo contextual, ni por la administración intrahipocampal del inhibidor de NFAT. Estos resultados son esperados pues en primer lugar, la memoria de clave no dependería del hipocampo, y en segundo lugar, dicha memoria no fue reactivada.

*Los resultados sugieren que la actividad de NFAT no sería necesaria en el hipocampo para la fase de reconsolidación.*

---

<sup>19</sup> Utilizamos la misma dosis que en los experimentos de extinción.



**Figura III.17.** Inhibición de NFAT en el hipocampo dorsal previo a la reactivación de la memoria contextual por reexposición breve al contexto de entrenamiento. Efecto en la memoria contextual a largo término. **A)** Protocolo experimental. Se entrenaron todos los grupos en el día 1; en el día 2, dos grupos se inyectaron con DMSO (R-Veh; n=9) o con FK (R-NFATinh; n=9), y se reexpusieron por 5 min al contexto de entrenamiento. El tercer grupo se inyectó con NFATinh y no se reexpuso (NoR-NFATinh; n=8). Se realizaron evaluaciones de memoria contextual y de clave a diferentes tiempos. TR, sesión de entrenamiento; T<sub>CTX</sub>, evaluación de la memoria contextual; T<sub>CUE</sub>, evaluación de la memoria de clave. **B)** Media del porcentaje de *freezing* ( $\pm$  SEM) en el entrenamiento, en la reexposición y en las sucesivas evaluaciones de la memoria contextual. Dentro de cada día, se realizó un ANOVA de una vía comparando valores medios de porcentajes de *freezing* entre los tres grupos, seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls. No se registraron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones realizadas.

En su conjunto, los resultados obtenidos en las secciones de este capítulo indican que la fosfatasa CaN es necesaria en el hipocampo para la extinción de la memoria, pues activa al FT NFAT permitiendo su translocación. Por otro lado, la activación de NFAT ocurre mediante la acción directa de CaN (y no por otra proteína) pues el NFATinh es un péptido modificado que bloquea el sitio de unión a CaN. A su vez, más allá de otros posibles sitios de acción de CaN, la activación de NFAT es necesaria para la extinción. La fosfatasa CaN y el FT NFAT tendrían una acción específica sobre la memoria de extinción y no participarían del proceso de

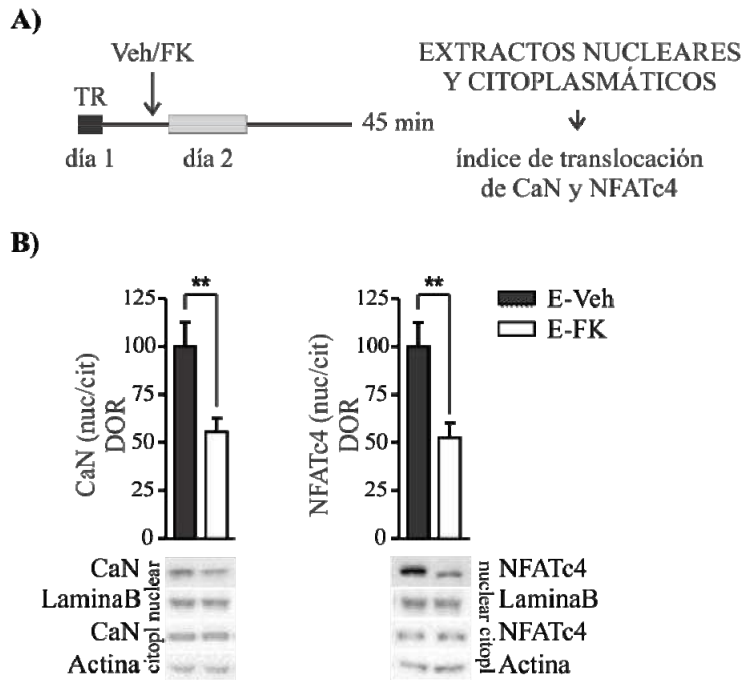
*reestabilización de la memoria luego de su labilización provocada por la reexposición por un tiempo breve al contexto de entrenamiento.*

*La activación de un FT en la fase de extinción apoya las evidencias a favor de la hipótesis que trata a la extinción como una nueva memoria. Retomaremos esto en la Discusión.*

### **III.3.3. CaN activa a NFAT, y no a la inversa**

De acuerdo con la bibliografía sobre el tema, en esta Tesis interpretamos que CaN es la que activa NFAT siguiendo la vía canónica en la cual, una vez activada CaN, se une a NFAT induciendo su desfosforilación y translocación al núcleo. Para evaluar si esta vía canónica efectivamente ocurre en nuestro sistema de estudio, realizamos un experimento cuyo protocolo se muestra en la Figura III.18.A. Dos grupos de ratones se entrenaron y al día siguiente se reexpusieron al contexto de entrenamiento por 30 min. Los ratones de uno de los grupos, previo a la reexposición, recibieron una inyección intrahipocampal de FK (E-FK), mientras que los del otro grupo recibieron una inyección de DMSO (E-Veh). Cuarenta y cinco min luego de la reexposición, se sacrificaron los animales, y se realizaron extractos nucleares y citoplasmáticos de hipocampo. Se evaluó la translocación tanto de CaN como de NFAT. Los resultados se muestran en la Figura III.18.B. Se observa que tanto la translocación de CaN (izquierda) como la de NFAT (derecha) se ven impedidas al inhibirse la actividad de CaN mediante el FK (Prueba  $t$  de Student entre grupos: CaN:  $t = 3,24$ ;  $p < 0,01$ ; NFATc4:  $t = 3,36$ ;  $p < 0,01$ ).

*Puede deducirse entonces que el modo de activación de NFAT muy probablemente sea el canónico: CaN se activa, desfosforila a NFAT, y juntos, translocan al núcleo.*



**Figura III.18.** Efecto de la inhibición de CaN sobre su propia translocación y la de NFAT. **A)** Protocolo experimental. Dos grupos de animales se entrenaron en el día 1, y en el día 2 se reexpusieron al contexto de entrenamiento por 30 min, luego de una inyección intrahipocampal de FK o DMSO (E-FK y E-Veh, respectivamente). Luego de 45 min del protocolo de extinción, los animales se sacrificaron, se realizó una disección de los hipocampos y se evaluó el índice de translocación nuclear de CaN y NFATc4, utilizando la técnica de *Western blot*. **B)** Índices de translocación (nuc/cit). Los datos se expresan como media del índice de translocación (nuc/cit)  $\pm$  SEM, n= 12-14. Izquierda, resultados para CaN; derecha, resultados para NFATc4. Debajo de los gráficos se muestran las bandas representativas. Se realizó una prueba *t* de Student comparando, para cada gráfico, ambos grupos: \*\* $p < 0,01$ .



# CAPÍTULO IV

## NF- $\kappa$ B, CaN y NFAT en la consolidación





---

*Teniendo en cuenta los resultados del capítulo anterior, en este capítulo de la Tesis estudiaremos el rol del FT NF- $\kappa$ B en la consolidación, y a su vez, analizaremos los posibles roles de limitantes negativos de la memoria de la fosfatasa CaN y del FT regulado por esta última, NFAT.*

#### **IV.1. NF- $\kappa$ B es necesario para la consolidación de la memoria de miedo contextual**

Varios trabajos han demostrado que NF- $\kappa$ B es clave en la **consolidación** de la memoria, en distintos modelos comportamentales, tanto en invertebrados (Freudenthal *et al.*, 1998; Freudenthal y Romano, 2000; Merlo *et al.*, 2002) como en vertebrados [(Yeh *et al.*, 2002; Levenson *et al.*, 2004; Freudenthal *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2008), para una revisión ver: (Romano *et al.*, 2006a; Romano *et al.*, 2006b; Alberini, 2009)].

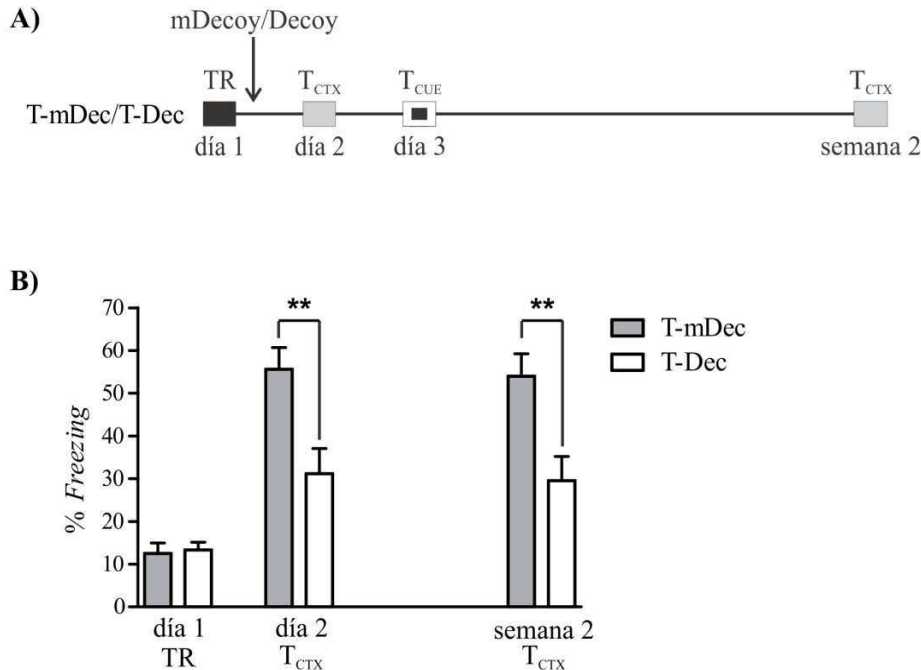
Con el objetivo de profundizar el estudio del rol de NF- $\kappa$ B en la memoria de miedo, nos propusimos estudiar si este FT tiene un rol clave también en la consolidación de la memoria de condicionamiento de miedo al contexto. Como estrategia para inhibir a dicho FT, nos valimos de la utilización del Decoy/mDecoy, como en el Capítulo III.

El diseño experimental puede verse en la Figura IV.1.A. Dos grupos de animales se entrenaron en la tarea de condicionamiento de miedo. Uno de los grupos, inmediatamente luego del entrenamiento, recibió la inyección intrahipocampal de Decoy (T-Dec) mientras que el otro grupo recibió mDecoy (T-mDec).

Como se observa en la Figura IV.1.B, en el entrenamiento no hubo diferencias significativas entre los grupos, y el nivel de *freezing* fue bajo. En el día de la evaluación de la memoria contextual, podemos ver que, como esperábamos, el grupo T-mDec muestra un alto nivel de *freezing*, indicio de que los animales recuerdan la experiencia aversiva del día anterior. No obstante, la inhibición de NF- $\kappa$ B dentro del hipocampo disminuye significativamente el porcentaje de *freezing*. Los resultados se repiten al evaluar una memoria más remota, a 2 semanas del entrenamiento (día 2: Prueba *t* de Student entre grupos:  $t = 3,16$ ;  $p < 0,01$ ; semana 2:  $t = 3,15$ ;  $p < 0,01$ ). Podemos decir entonces que la actividad de NF- $\kappa$ B en el hipocampo dorsal es necesaria para que ocurra la consolidación de la memoria de miedo contextual.

Por el contrario, la inhibición de NF- $\kappa$ B en el hipocampo no afecta la memoria de clave [ANOVA de dos vías de medidas repetidas con ‘tiempo’ y ‘grupo’ como

factores independientes: tiempo:  $F(1,13) = 49,54, p < 0,0001$ ; grupo:  $F(1,13) = 0,24, p = 0,63$ ; interacción:  $F(1,13) = 5,92, p < 0,05$ ; Prueba *post hoc* de Bonferroni entre ‘pre-  
tono’ y ‘durante el tono’ para todos los grupos: T-mDec:  $p < 0,001$ ; T-Dec:  $p < 0,5$ ].



**Figura IV.1.** Inhibición de NF- $\kappa$ B en el hipocampo dorsal luego del entrenamiento a la tarea de condicionamiento de miedo. Efecto en la memoria **contextual a largo término.** **A)** Protocolo experimental. En el día 1 dos grupos se entrenaron e inmediatamente se inyectaron con mDecoy (T-mDec; n=8) o con Decoy (T-Dec; n=7). Se realizaron evaluaciones de la memoria contextual y la de clave a diferentes tiempos. TR, sesión de entrenamiento; T<sub>CTX</sub>, evaluación de la memoria contextual; T<sub>CUE</sub>, evaluación de la memoria de clave. **B)** Media del porcentaje de *freezing* ( $\pm$  SEM) en el entrenamiento y en las sucesivas evaluaciones de la memoria contextual. Dentro de cada día, se realizó una prueba *t* de Student comparando valores medios de porcentajes de *freezing* entre ambos grupos, \*\*:  $p < 0,01$ . Sólo se indican en el gráfico las comparaciones que resultaron significativas.

Ante este resultado, decidimos realizar un estudio del curso temporal de la actividad de NF- $\kappa$ B en el hipocampo durante la consolidación. Sacrificamos los ratones a diferentes tiempos luego del entrenamiento: inmediatamente, luego de 15 min, luego de 45 min y luego de 120 min (T-0 min, T-15 min, T-45 min y T-120 min, respectivamente, Figura IV.2.A). Entre el entrenamiento y los tiempos de sacrificio, los animales volvieron a sus cajas de alojamiento. Las muestras obtenidas de extractos nucleares de cada grupo experimental fueron corridas en el mismo gel con su respectivo

grupo *Naïve*, realizado comportamentalmente en paralelo a cada grupo experimental<sup>20</sup>. Observamos que la actividad de NF- $\kappa$ B aumenta significativamente a los 45 min del entrenamiento (prueba *t* de Student,  $t = 2,91$ ;  $p < 0,01$ ; Figura IV.2.B). A su vez, se realizó el siguiente grupo control: un grupo de animales entrenados sin choque eléctrico, es decir, simplemente con las tres presentaciones de tono en el contexto de entrenamiento (NoT<sup>21</sup>), que fue sacrificado a 45 min luego del entrenamiento. Al no observarse diferencias entre este grupo y el T-45 min, podemos decir que la activación del FT ocurre por la asociación entre el contexto y el choque eléctrico, no por la consolidación de la memoria de contexto *per se*.

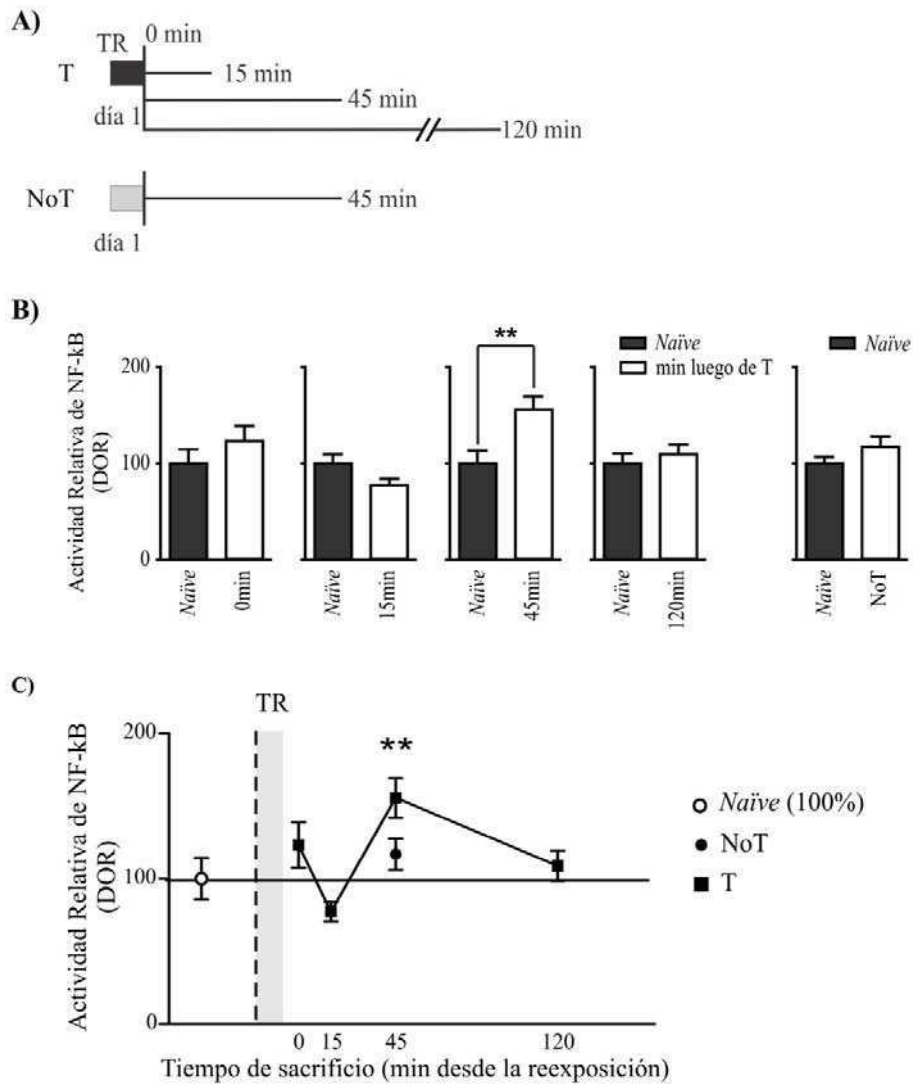
Recordemos del Capítulo III que la activación de NF- $\kappa$ B ocurre 15 min luego de la reactivación de la memoria contextual. En cambio, en la consolidación esta activación se observa a 45 min del entrenamiento. Que la activación ocurra más tempranamente en la reconsolidación, sugiere que tal vez exista algún fenómeno de “memoria molecular” que facilite la vía de activación del mecanismo celular en cuestión, utilizado previamente para el almacenaje de la misma memoria. También podría significar que el circuito previamente consolidado se activa de una manera más rápida y coherente. Diferencias de en los requerimientos temporales mecánicos de ambas fases de la memoria también han sido observadas en otros modelos [(Merlo *et al.*, 2005; Boccia *et al.*, 2007), para una revisión ver (Alberini, 2005)].

*En su conjunto, los resultados de esta sección indican que el FT NF- $\kappa$ B es necesario en el hipocampo para la consolidación de la memoria de miedo contextual.*

---

<sup>20</sup> Se realizó este diseño debido a que no fue posible realizar el experimento con todos los grupos en simultáneo.

<sup>21</sup> Este grupo de animales fue sacrificado en el mismo punto temporal en el que se observó el aumento significativo de actividad de NF- $\kappa$ B.



**Figura IV.2.** Curso temporal de actividad de NF-κB luego del protocolo de entrenamiento a la tarea de condicionamiento de miedo, estimado con la técnica de EMSA. **A)** Protocolo experimental. Los animales se sacrificaron inmediatamente (punto temporal 0 min), 15, 45 o 120 min después de 5 min de entrenamiento (T). Se realizaron dos grupos control: un grupo Naïve y un grupo NoT (animales que se colocaron en la caja de entrenamiento en día 1, recibieron los tonos pero no los choques eléctricos, y se sacrificaron 45 después). **B)** Se muestran los niveles de la actividad de NF-κB de cada grupo T y NoT, con sus respectivos Naïve, considerados 100%, n=9–10 en cada grupo. Debajo de cada gráfico, se muestran bandas representativas del dímero p65/p50. La actividad de NF-κB fue estimada por un análisis de la DOR de la banda correspondiente al dímero p65/p50. Los datos se expresan como media de la DOR ± SEM. **C)** Gráfico mostrando la actividad relativa de NF-κB de todos los grupos a la vez, obtenida de extractos nucleares de hipocampo. Se muestra un grupo Naïve a modo de ejemplo. Prueba *t* de Student comparando media de la actividad de NF-κB de cada grupo con su respectivo grupo Naïve: \*\**p*<0,01. Sólo se indican en los gráficos las comparaciones que resultaron significativas.

## IV.2. Calcineurina actúa como limitante negativo de la consolidación de la memoria de miedo contextual

El estudio del rol de la fosfatasa CaN en la consolidación fue abarcado previamente con diferentes aproximaciones. Por un lado en el trabajo Baumgartel y col. (2008), se observó una disminución de la actividad de dicha proteína en la amígdala luego de un aprendizaje aversivo. A su vez, utilizando ratones transgénicos, encontraron que la inhibición de dicha proteína fortalece el trazo mnésico, y hace que esa memoria sea resistente a la inducción de la extinción. Por otro lado, y también utilizando ratones transgénicos condicionales se observó que su inhibición además de facilitar la formación de la memoria de condicionamiento de miedo, inhibe la formación de la memoria de extinción (Havekes *et al.*, 2008). Nuestro objetivo entonces fue estudiar el rol de CaN en el hipocampo, en la consolidación de la memoria de miedo al contexto.

Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos mencionados, trabajamos sobre la hipótesis de que la inhibición de CaN en el hipocampo facilitaría la memoria. Para evaluar el fenómeno de facilitación, se pueden utilizar básicamente tres estrategias: a) evaluar el tiempo que puede durar una memoria, b) evaluar la resistencia a la extinción de una memoria formada, y c) evaluar el reforzamiento de una memoria, o bien dado por un aumento en el parámetro operativo con el que se mide la misma (por ejemplo, valores de *freezing* aún más altos que los controles entrenados), o bien dado por evidenciar memorias luego de un entrenamiento débil con el que normalmente no se evidenciarían.

En nuestros experimentos, decidimos usar la última, pues es la que muestra operativamente más ventajas ya que implica sólo cambios en los parámetros de entrenamiento. Para ello, pusimos a punto las condiciones tales que, luego de un entrenamiento **débil** (1 sólo ensayo de tono-choque eléctrico, “1SH”), se observara un porcentaje de *freezing* bajo al día siguiente, comparado con el que se obtiene en animales que reciben un entrenamiento **estándar** (3 ensayos de tono-choque eléctrico, “3SH”, entrenamiento utilizado en los experimentos anteriores).

El protocolo experimental se muestra en la Figura IV.3.A. Dos grupos de ratones recibieron un entrenamiento débil, luego del cual, uno de los grupos recibió la inyección intrahipocampal del inhibidor específico de CaN, el FK (T<sub>1SH</sub>-FK), mientras que el otro

recibió DMSO (T<sub>1SH</sub>-Veh). Como control, se entrenó un tercer grupo de ratones con el protocolo estándar (T<sub>3SH</sub>-Veh)<sup>22</sup>.

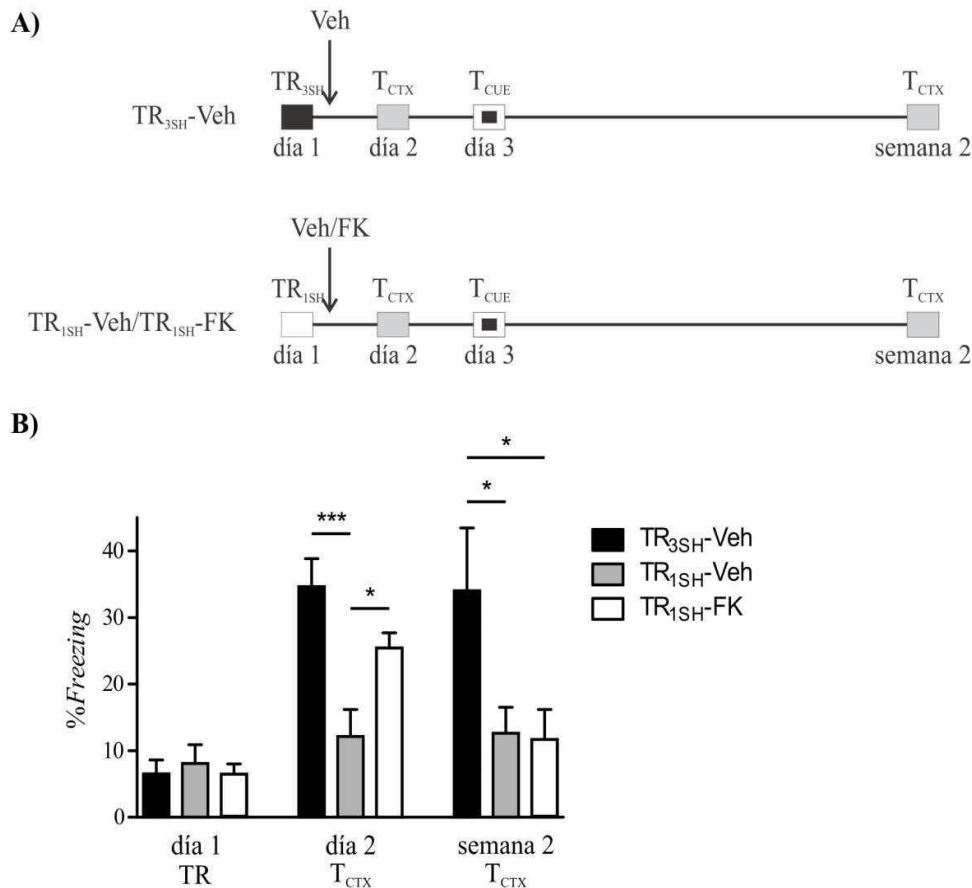
Como se observa en la Figura IV.3.B, en el entrenamiento no hubo diferencias significativas entre los grupos, y el *freezing* fue bajo. En el día de la primera evaluación de la memoria contextual, podemos ver que, como esperábamos, el grupo T<sub>3SH</sub>-Veh muestra un alto nivel de *freezing*, indicio de que los animales recuerdan la experiencia aversiva del día anterior. El otro grupo control, T<sub>1SH</sub>-Veh, muestra un nivel de *freezing* bajo respecto a este último. El segundo grupo entrenado débilmente, T<sub>1SH</sub>-FK, muestra un nivel de *freezing* similar al que recibió el entrenamiento fuerte, indicio de que efectivamente la inhibición de CaN facilita la memoria [ANOVA de una vía comparando entre grupos, dentro de cada día: día 2:  $F(2,22) = 8,94$ ,  $p < 0,01$ ; Prueba *post hoc* de Newman-Keuls para todos los pares de grupos: T<sub>3SH</sub>-Veh vs. T<sub>1SH</sub>-Veh:  $p < 0,001$ ; T<sub>1SH</sub>-Veh vs. T<sub>1SH</sub>-FK:  $p < 0,05$ ]. Al evaluar una memoria más remota, a 2 semanas del entrenamiento, vemos que el único grupo que muestra memoria es el T<sub>3SH</sub>-Veh, lo que indicaría que la memoria obtenida en el día 2 por el grupo T<sub>1SH</sub>-FK, no es equivalente o equiparable a la que se obtiene con un entrenamiento estándar [semana 2:  $F(2,22) = 4,29$ ,  $p < 0,05$ ; Prueba *post hoc* de Newman-Keuls para todos los pares de grupos: T<sub>3SH</sub>-Veh vs. T<sub>1SH</sub>-Veh:  $p < 0,05$ ; T<sub>3SH</sub>-Veh vs. T<sub>1SH</sub>-FK:  $p < 0,05$ ]. Retomaremos esta idea en el Capítulo VI correspondiente a la Discusión.

Al realizar el testeo de clave observamos que no hubo facilitación para la memoria de clave, siendo entonces el reforzamiento de la memoria específico de la memoria contextual (ANOVA de dos vías de medidas repetidas con ‘tiempo’ y ‘grupo’ como factores independientes: tiempo:  $F(1,22) = 8.62$ ,  $p < 0.01$ ; grupo:  $F(2,22) = 1.92$ ,  $p = 0.17$ ; interacción:  $F(2,22) = 8.74$ ,  $p < 0.01$ ; Prueba *post hoc* de Bonferroni entre ‘pre-tono’ y ‘durante el tono’ para todos los grupos: T<sub>3SH</sub>-DMSO:  $p < 0.001$ ).

*Los resultados de esta sección indican que CaN actúa como limitante negativo de la memoria de miedo contextual.*

---

<sup>22</sup> Nótese que para mayor claridad, en este experimento en el que se utilizan diferentes tipos de entrenamientos (estándar y débil), la nomenclatura de cada grupo incluye el número de choques eléctricos recibidos (T<sub>3SH</sub> y T<sub>1SH</sub>, respectivamente), no así en el resto de los experimentos en los que el entrenamiento fue siempre el estándar.



**Figura IV.3.** Inhibición de CaN en el hipocampo dorsal luego del entrenamiento (estándar o débil) a la tarea de condicionamiento de miedo. Efecto en la memoria **contextual a largo término** **A)** Protocolo experimental. En el día 1 un grupo de animales se entrenó en la tarea de condicionamiento con un entrenamiento estándar (T<sub>3SH</sub>-Veh; n=10) y se inyectó con DMSO, mientras que otros dos grupos se entrenaron en la tarea de condicionamiento con un entrenamiento débil y se inyectaron con FK o DMSO (T<sub>1SH</sub>-FK, n=8; y T<sub>1SH</sub>-Veh, n=7, respectivamente). Se realizaron evaluaciones de la memoria contextual y la de clave a diferentes tiempos. TR, sesión de entrenamiento; T<sub>CTX</sub>, evaluación de la memoria contextual; T<sub>CUE</sub>, evaluación de la memoria de clave. **B)** Media del porcentaje de *freezing* ( $\pm$  SEM) en el entrenamiento y en las sucesivas evaluaciones de la memoria contextual. Dentro de cada día, se realizó un ANOVA de una vía comparando valores medios de porcentajes de *freezing* entre los tres grupos, seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls; \*: p<0,05; \*\*\*: p<0,001. Sólo se indican en el gráfico las comparaciones que resultaron significativas.

### IV.3. La facilitación de la memoria dada por la inhibición de calcineurina es dependiente de la activación de NF- $\kappa$ B

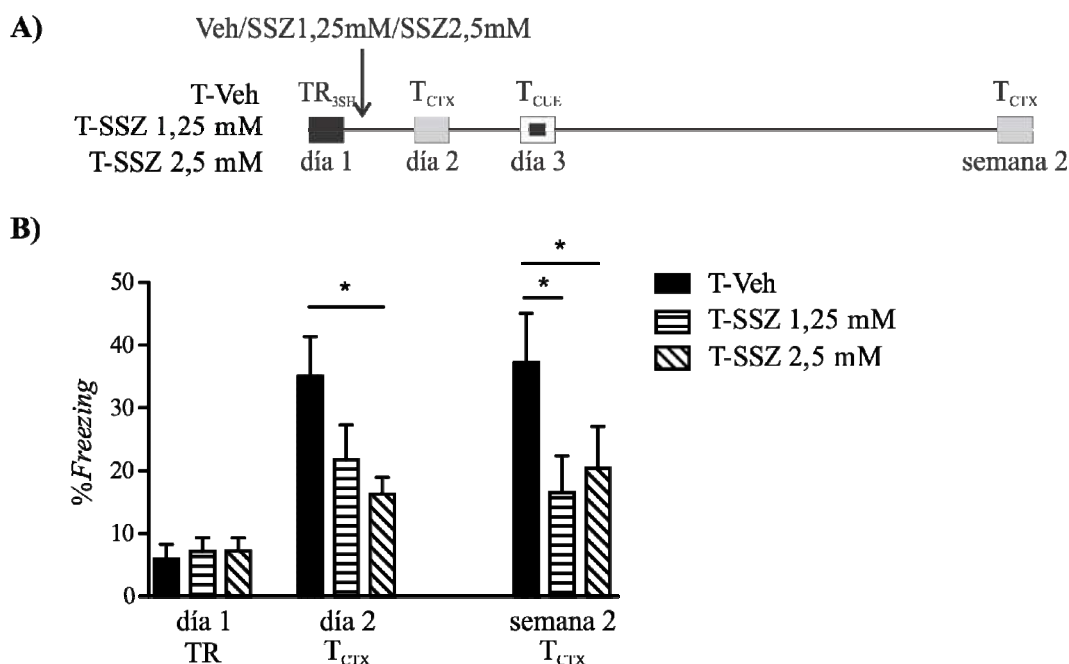
Nuestros resultados en el estudio de la reconsolidación y extinción apoyan una relación entre el FT NF- $\kappa$ B y la fosfatasa CaN (Capítulo III, sección III.2.3). Además, como ya mencionamos, hay evidencias que apuntan a que el balance de fosforilación/desfosforilación de ciertas proteínas es clave para la dirección que tomará eventualmente la memoria luego de la reexposición a un recordatorio. Teniendo en



cuenta esta información, nos propusimos estudiar si existe alguna relación entre el rol de NF- $\kappa$ B y de CaN en la formación de una nueva memoria. La hipótesis planteada es que CaN está involucrada de alguna manera en la regulación de los niveles de basales de fosforilación de NF- $\kappa$ B, cuyo estado de fosforilación, a su vez, contribuye al estado de activación del mismo. Particularmente se ha determinado que, por un lado, la fosforilación de I $\kappa$ B por IKK permite la activación del FT, y por otro lado, la fosforilación de p65 por PKA aumenta la actividad transcripcional de dicho FT (Zhong *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2008).

Para contestar nuestra pregunta diseñamos un experimento basado en la posibilidad de inhibir al mismo tiempo ambas proteínas en estudio. Es importante aclarar el propósito de la utilización de una nueva droga para lograr la inhibición de NF- $\kappa$ B, la SSZ, que a diferencia del Decoy puede disolverse en la misma solución que la droga FK (DMSO), lo que permite entonces preparar un cóctel de ambas. Típicamente la SSZ se utiliza como anti inflamatorio, y su acción fue originalmente atribuida a la inhibición de la ciclooxigenasa, hasta que fue descripta su acción inhibitoria sobre NF- $\kappa$ B vía IKK (Wahl *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2000). Experimentos de nuestro laboratorio utilizando la droga Indometacina, otro inhibidor de la ciclooxigenasa pero no de IKK, prueban que los efectos observados de la SSZ sobre la memoria se deben a su acción sobre NF- $\kappa$ B y no sobre la ciclooxigenasa (Merlo *et al.*, 2002; Freudenthal *et al.*, 2005; Boccia *et al.*, 2007).

Fue imprescindible la realización de un experimento previo que probara que la dosis de SSZ a utilizar fuese amnésica. En un trabajo anterior, nuestro grupo ya había utilizado esta droga en el hipocampo de ratón, pero en otra cepa y con otro paradigma de memoria (Freudenthal *et al.*, 2005). El protocolo de este experimento se muestra en la Figura IV.4.A. Se entrenaron 3 grupos de animales con un protocolo de entrenamiento estándar. Un grupo, luego del entrenamiento, recibió una inyección de SSZ (1,25 mM; T-SSZ<sub>1,25mM</sub>) dentro del hipocampo, mientras que otro recibió una dosis mayor (2,5 mM; T-SSZ<sub>2,5mM</sub>). El tercer grupo fue inyectado con DMSO (T-Veh). En la Figura IV.4.B podemos ver que la dosis de 2,5 mM resultó amnésica en el día 2, y por eso fue la utilizada en los experimentos subsiguientes [ANOVA de una vía comparando entre grupos, dentro de cada día: día 2:  $F(2,25) = 3,40$ ,  $p < 0,05$ ; Prueba *post hoc* de Dunnett comparando los dos grupos inyectados con droga vs. el control: T<sub>3SH</sub>-Veh vs. T<sub>3SH</sub>-SSZ<sub>2,5mM</sub>:  $p < 0,05$ ; semana 2:  $F(2,25) = 4,72$ ,  $p < 0,05$ ; T<sub>3SH</sub>-Veh vs. T<sub>3SH</sub>-SSZ<sub>1,25mM</sub>:  $p < 0,05$  T<sub>3SH</sub>-Veh vs. T<sub>3SH</sub>-SSZ<sub>2,5mM</sub>:  $p < 0,05$ ].



**Figura IV.4.** Inhibición de NF- $\kappa$ B en el hipocampo dorsal luego del entrenamiento a la tarea de condicionamiento de miedo, utilizando la droga SSZ. Efecto en la memoria **contextual** a **largo** término. **A)** Protocolo experimental. En el día 1 tres grupos se entrenaron e inmediatamente se inyectaron con DMSO (T-Veh; n=9), con SSZ 1,25 mM (T-SSZ<sub>1,25mM</sub>; n=10), o con SSZ 2,5 mM (T-SSZ<sub>2,5mM</sub>; n=9). Se realizaron evaluaciones de la memoria contextual y la de clave a diferentes tiempos. TR, sesión de entrenamiento; T<sub>CTX</sub>, evaluación de la memoria contextual; T<sub>CUE</sub>, evaluación de la memoria de clave. **B)** Media del porcentaje de *freezing* ( $\pm$  SEM) en el entrenamiento y en las sucesivas evaluaciones de la memoria contextual. Dentro de cada día, se realizó un ANOVA de una vía comparando valores medios de porcentajes de *freezing* entre los tres grupos, seguido de una prueba *post hoc* de Dunnett comparando los dos grupos inyectados con droga vs. el control; \*: p<0,05. Sólo se indican en el gráfico las comparaciones que resultaron significativas.

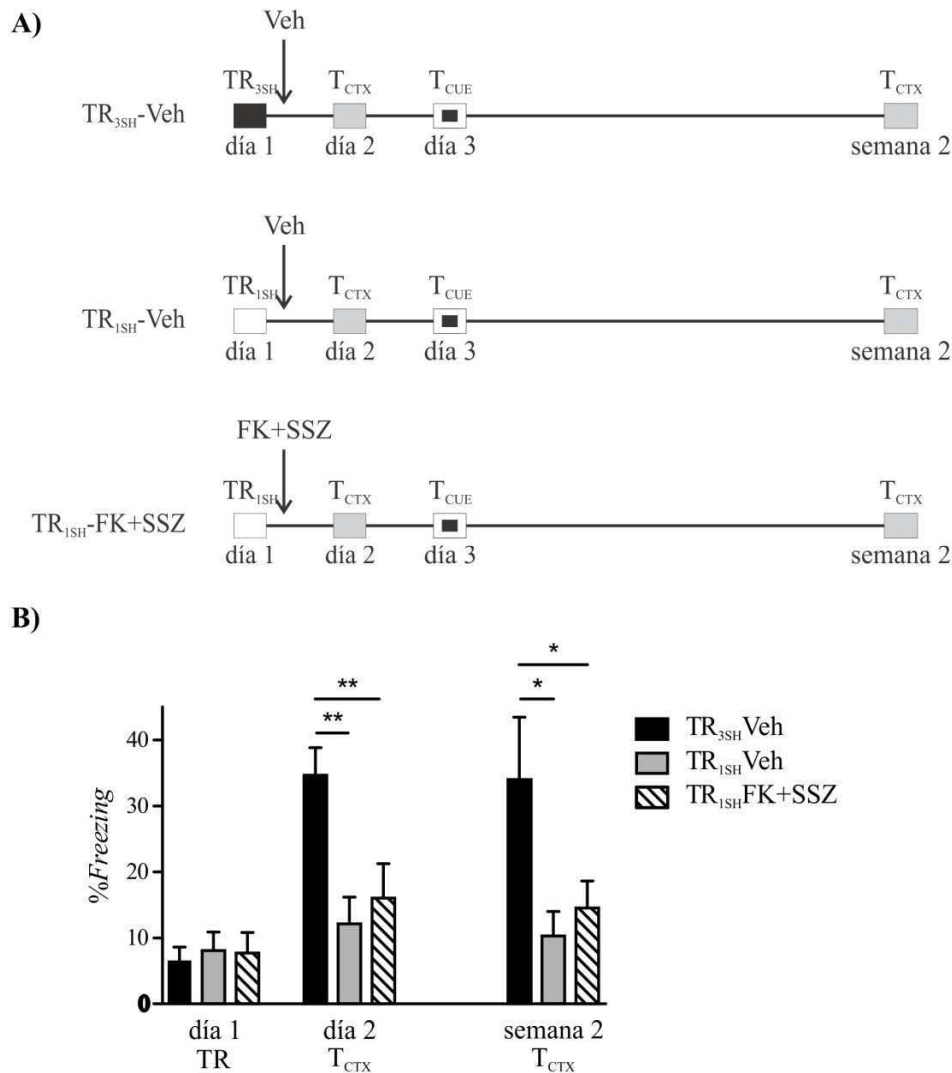
Una vez conocida la dosis amnésica de SSZ a utilizar, realizamos el experimento en el que utilizamos el cóctel con FK (Figura IV.5.A): un grupo recibió un entrenamiento débil (1SH) e inmediatamente después recibió una inyección intrahipocampal FK más SSZ (T<sub>1SH-FK+SSZ</sub>). Si la facilitación por inhibición de CaN vista anteriormente ocurre vía activación de NF- $\kappa$ B, entonces esperaríamos un porcentaje de *freezing* bajo en el grupo T<sub>1SH-FK+SSZ</sub>. Los últimos dos grupos fueron controles, uno positivo que consistió en un entrenamiento estándar, y uno negativo, que consistió en un entrenamiento débil, ambos inyectados con DMSO (T<sub>3SH-Veh</sub> y T<sub>1SH-Veh</sub>, respectivamente).

En la Figura IV.5.B puede observarse que la facilitación inducida por la inhibición de CaN es bloqueada por la administración de SSZ, lo que apoya el hecho que efectivamente la facilitación de la memoria dada por la inhibición de CaN es

dependiente de NF- $\kappa$ B [ANOVA de una vía comparando entre grupos, dentro de cada día: día 2:  $F(2,22) = 7,41, p < 0,01$ ; Prueba *post hoc* de Newman-Keuls para todos los pares de grupos: T<sub>3SH</sub>-Veh vs. T<sub>1SH</sub>-Veh:  $p < 0,01$ ; T<sub>3SH</sub>-Veh vs. T<sub>1SH</sub>-FK+SSZ:  $p < 0,01$ ; semana 2:  $F(2,22) = 5,22, p < 0,05$ ; Prueba *post hoc* de Newman-Keuls para todos los pares de grupos: T<sub>3SH</sub>-Veh vs. T<sub>1SH</sub>-Veh:  $p < 0,05$ ; T<sub>3SH</sub>-Veh vs. T<sub>1SH</sub>-FK+SSZ:  $p < 0,05$ ].

Al realizar el testeo de clave observamos que tampoco hubo facilitación para la memoria de clave [ANOVA de dos vías de medidas repetidas con ‘tiempo’ y ‘grupo’ como factores independientes: tiempo:  $F(1,22) = 3,31, p = 0,08$ ; grupo:  $F(2,22) = 1,36, p = 0,28$ ; interacción:  $F(2,22) = 7,04, p < 0,01$ ; Prueba *post hoc* de Bonferroni entre ‘pre-tono’ y ‘durante el tono’ para todos los grupos: T<sub>3SH</sub>-DMSO:  $p < 0,001$ ].

*Los resultados en esta sección indican que la facilitación dada por la inhibición de CaN depende de la actividad de NF- $\kappa$ B. CaN actuaría como limitante negativo de la memoria de miedo contextual probablemente regulando el balance de fosforilación/desfosforilación de dicho FT.*



**Figura IV.5.** Efecto de la inhibición de NF- $\kappa$ B por SSZ sobre la facilitación mediada por FK, en la memoria contextual a largo término. **A)** Protocolo experimental. En el día 1 un grupo de animales se entrenó en la tarea de condicionamiento con un entrenamiento estándar y se lo inyectó intrahipocampalmente con DMSO (T<sub>3SH</sub>-Veh; n=10); otros dos grupos se entrenaron en la tarea de condicionamiento con un entrenamiento débil y se inyectaron con DMSO o FK+SSZ (T<sub>1SH</sub>-Veh, n=7 y T<sub>1SH</sub>-FK+SSZ, n=8; respectivamente). Se realizaron evaluaciones de la memoria contextual y la de clave a diferentes tiempos. TR, sesión de entrenamiento; T<sub>CTX</sub>, evaluación de la memoria contextual; T<sub>CUE</sub>, evaluación de la memoria de clave. **B)** Media del porcentaje de *freezing* ( $\pm$  SEM) en el entrenamiento y en las sucesivas evaluaciones de la memoria contextual. Dentro de cada día, se realizó un ANOVA de una vía comparando valores medios de porcentajes de *freezing* entre los tres grupos, seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls; \*: p<0,05; \*\*: p<0,01. Sólo se indican en el gráfico las comparaciones que resultaron significativas.

#### IV.4. NFAT no actuaría como limitante negativo en la consolidación de la memoria de miedo contextual

Teniendo en cuenta que nuestros resultados sobre el papel de NFAT en extinción indican que está relacionado con CaN, y que esta fosfatasa es necesaria para su

activación, decidimos evaluar si NFAT tiene un rol similar a CaN en la consolidación de la memoria. En este sentido, llevamos adelante el experimento que se muestra en la Figura IV.6.A. Dos grupos de ratones recibieron un entrenamiento débil, luego del cual, uno de los grupos recibió la inyección intrahipocampal del inhibidor específico de NFAT, el NFATinh (T<sub>1SH</sub>-NFATinh), mientras que el otro recibió DMSO (T<sub>1SH</sub>-Veh). Como control, se entrenó un tercer grupo de ratones con el protocolo estándar (T<sub>3SH</sub>-Veh)<sup>23</sup>.

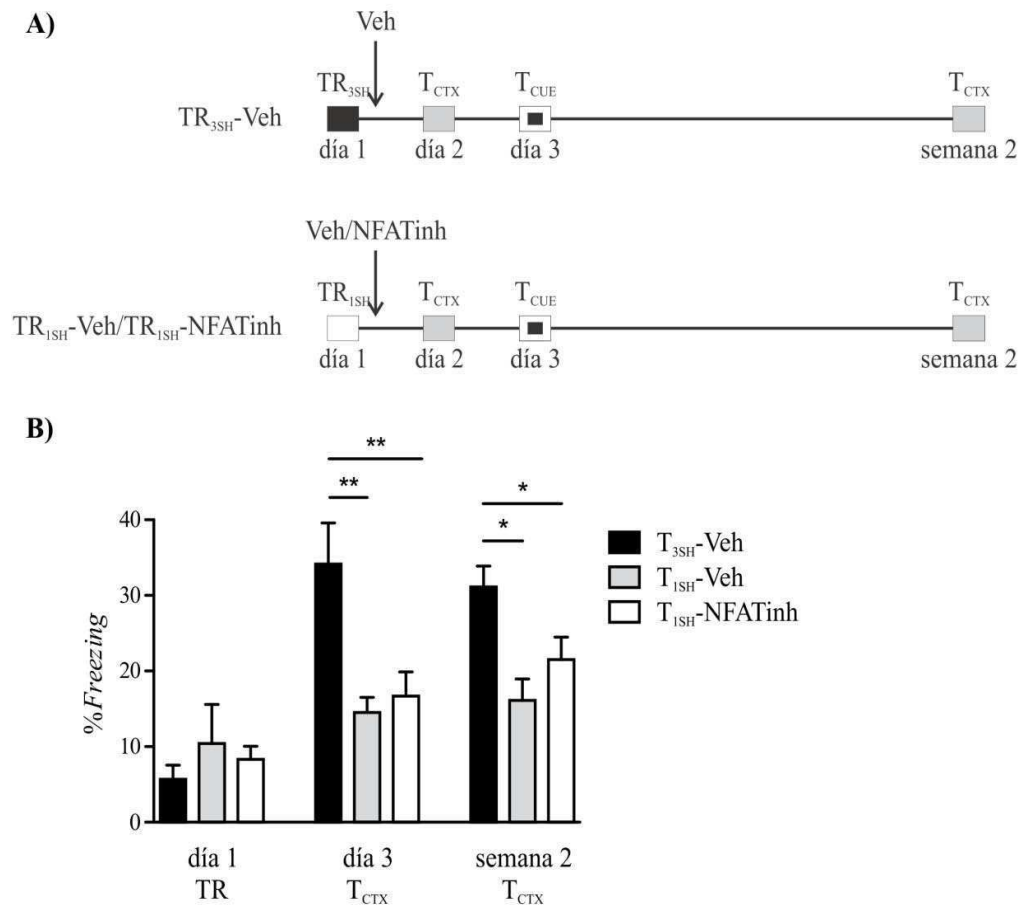
Como se observa en la Figura IV.6.B en el entrenamiento no hubo diferencias significativas entre los grupos, y el porcentaje de *freezing* fue bajo. En el día de la primera evaluación de la memoria contextual, podemos ver que, como esperábamos, el grupo T<sub>3SH</sub>-Veh muestra un alto nivel de *freezing*, indicio de que los animales recuerdan la experiencia aversiva del día anterior. Ambos grupos entrenados débilmente muestran un nivel de *freezing* bajo respecto al grupo que recibió el entrenamiento estándar, y no muestran diferencias entre sí, indicio de que la inhibición de NFAT no facilita la memoria de miedo al contexto. Los resultados se repiten al evaluar una memoria más remota, a 2 semanas del entrenamiento [ANOVA de una vía comparando entre grupos, dentro de cada día: día 2:  $F(2,19) = 7,29, p < 0,01$ ; Prueba *post hoc* de Newman-Keuls para todos los pares de grupos: T<sub>3SH</sub>-Veh vs. T<sub>1SH</sub>-Veh:  $p < 0,01$ ; T<sub>3SH</sub>-Veh vs. T<sub>1SH</sub>-NFATinh:  $p < 0,01$ ; semana 2:  $F(2,19) = 5,22, p < 0,05$ ; Prueba *post hoc* de Newman-Keuls para todos los pares de grupos: T<sub>3SH</sub>-Veh vs. T<sub>1SH</sub>-Veh:  $p < 0,05$ ; T<sub>3SH</sub>-Veh vs. T<sub>1SH</sub>-NFATinh:  $p < 0,05$ ].

Al realizar el testeo de clave observamos que tampoco hubo facilitación para la memoria de clave [ANOVA de dos vías de medidas repetidas con ‘tiempo’ y ‘grupo’ como factores independientes: tiempo:  $F(1,22) = 7,25, p < 0,05$ ; grupo:  $F(2,22) = 4,15, p < 0,05$ ; interacción:  $F(2,22) = 7,19, p < 0,01$ ; Prueba *post hoc* de Bonferroni entre ‘pre-tono’ y ‘durante el tono’ para todos los grupos: T<sub>3SH</sub>-DMSO:  $p < 0,001$ ].

*Los resultados de esta sección indicarían que, a pesar de estar regulado por CaN, NFAT no actúa como limitante negativo de la memoria.*

---

<sup>23</sup> Nótese que para mayor claridad, en este experimento en el que se utilizan diferentes tipos de entrenamientos (estándar y débil), la nomenclatura de cada grupo incluye el número de choques eléctricos recibidos (T<sub>3SH</sub> y T<sub>1SH</sub>, respectivamente), no así en el resto de los experimentos en los que el entrenamiento fue siempre el estándar.



**Figura IV.6.** Inhibición de NFAT en el hipocampo dorsal luego del entrenamiento (estándar o débil) a la tarea de condicionamiento de miedo. Efecto en la memoria **contextual a largo término** **A)** Protocolo experimental. En el día 1 un grupo de animales se entrenó en la tarea de condicionamiento con un entrenamiento estándar y se lo inyectó con DMSO (T<sub>3SH</sub>-Veh; n=6), mientras que otros dos grupos se entrenaron en la tarea de condicionamiento con un entrenamiento débil y se inyectaron con NFATinh o DMSO (T<sub>1SH</sub>-NFATinh, n=10; y T<sub>1SH</sub>-Veh, n=6, respectivamente). Se realizaron evaluaciones de la memoria contextual y la de clave a diferentes tiempos. TR, sesión de entrenamiento; T<sub>CTX</sub>, evaluación de la memoria contextual; T<sub>CUE</sub>, evaluación de la memoria de clave. **B)** Media del porcentaje de *freezing* ( $\pm$  SEM) en el entrenamiento y en las sucesivas evaluaciones de la memoria contextual. Dentro de cada día, se realizó un ANOVA de una vía comparando valores medios de porcentajes de *freezing* entre los tres grupos, seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ . Sólo se indican en el gráfico las comparaciones que resultaron significativas.



# CAPÍTULO V

Rol de NF- $\kappa$ B en la plasticidad estructural.

Consolidación y reconsolidación





---

*En este capítulo estudiaremos el rol de NF- $\kappa$ B en la plasticidad morfológica o estructural, tanto en la consolidación como la reconsolidación de la memoria. Los resultados obtenidos darán luz también sobre la naturaleza de la labilización de la memoria.*

Los resultados de este capítulo fueron realizados en parte en el laboratorio del Dr Lucas Pozzo-Miller, Universidad de Alabama en Birmingham (UAB), Birmingham, Alabama, Estados Unidos.

La hipótesis que postula que el almacenaje de información en el cerebro implica modificaciones en las conexiones entre neuronas fue propuesta hace más de 100 años [Ramón y Cajal S, 1894<sup>24</sup>; citado por (Milner *et al.*, 1998)]. A pesar de ello, recién en los últimos años se ha comenzado a aceptar ampliamente el hecho de que el aprendizaje puede estar asociado a cambios en las espinas dendríticas<sup>25</sup>. Estos cambios pueden ocurrir a nivel de una modificación en el número de espinas, y a nivel de su morfología (Lamprecht y LeDoux, 2004).

En los últimos años, se ha puesto particular empeño en estudiar la dinámica de espinas individuales, con el advenimiento de nuevas tecnologías que así lo permitieron. Acorde a esto, en trabajos recientes (Xu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009) se estudiaron espinas individuales de neuronas piramidales de la corteza cerebral antes y después de un aprendizaje, utilizando microscopios de dos fotones, y ratones que expresan la proteína fluorescente amarilla (YFP, del inglés *Yellow Fluorescent Protein*). Particularmente sus resultados apuntan a que un nuevo aprendizaje induce la formación de nuevas espinas pero que con el paso del tiempo, no todas perduran. Las que sí lo hacen junto al circuito preexistente serían las que codificarían ese nuevo aprendizaje y, de esta manera dinámica, se almacenaría la información en distintas áreas del cerebro. Si bien esta metodología aporta la gran ventaja de analizar espinas individuales *in vivo* a través del tiempo, no permite estudiar otros tipos de memorias más que los que dependen de zonas cerebrales de fácil acceso como la corteza cerebral. Estudios similares en áreas de más difícil acceso tales como el hipocampo son posibles mediante

---

<sup>24</sup> Texto original: Cajal, S.R. (1894). *La fine structure des centres nerveux*. Proc. R. Soc.Lond. 55, 444–468.

<sup>25</sup> La mayoría de las sinapsis excitatorias en el cerebro terminan en espinas dendríticas, que son protrusiones que nacen de las dendritas. Estas proveen un microambiente cuasi cerrado de difusión restringida que permite cambios rápidos en las concentraciones de moléculas de señalización, permitiendo respuestas eficientes ante estímulos.

técnicas *ex vivo*, como la técnica de *DiOlistics*. Brevemente, la misma consiste en la administración de un fluoróforo liposoluble (por ejemplo DiI) utilizando una pistola génica (*gene gun*) que dispara partículas recubiertas con el fluoróforo sobre cortes histológicos. Dichas partículas impactan con el tejido y en particular con algunas células por las que el colorante difunde por la membrana celular, tiñendo los procesos (dendritas y axones) de las neuronas con las que hizo contacto (Gan *et al.*, 2000).

Teniendo en cuenta nuestros avances en el estudio del rol de NF- $\kappa$ B en las distintas fases de la memoria, considerando que este FT está involucrado en la plasticidad estructural (Gutierrez *et al.*, 2008; Russo *et al.*, 2009; Boersma *et al.*, 2011), y que además regula la transcripción de genes relacionados con la matriz extracelular (ver Capítulo I y <http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>), decidimos estudiar posibles mecanismos que se encuentren *río abajo* de la transcripción. En este sentido, nuestro objetivo fue estudiar el rol de NF- $\kappa$ B en los cambios de densidad de espinas inducidos por las diferentes fases de la memoria en el modelo de condicionamiento de miedo al contexto.

### **V.1. La consolidación de una memoria de condicionamiento de miedo contextual induce cambios en la densidad de espinas en dendritas basales y apicales de la región CA1**

En primer lugar, evaluamos si la consolidación de la memoria de condicionamiento de miedo al contexto implica efectivamente cambios estructurales, particularmente cambios en la densidad de espinas dendríticas. Nuestra zona de estudio fue la región CA1 del hipocampo. Como vimos en los capítulos anteriores, en esta región la inhibición de NF- $\kappa$ B afectó la memoria de miedo.

El objetivo del siguiente experimento fue estudiar cambios estructurales al mismo momento en que la memoria fue evaluada y observada en experimentos comportamentales. En el caso de la consolidación de la memoria, ese punto temporal es 24 h post entrenamiento (ver Capítulo IV).

Utilizamos dos grupos de animales, un grupo *Naïve*<sup>26</sup> y un grupo entrenado inyectado con mDecoy luego del entrenamiento (T-mDec; Figura V.1.A). La inyección de mDecoy se realizó para después comparar con otro grupo de animales inyectados con

---

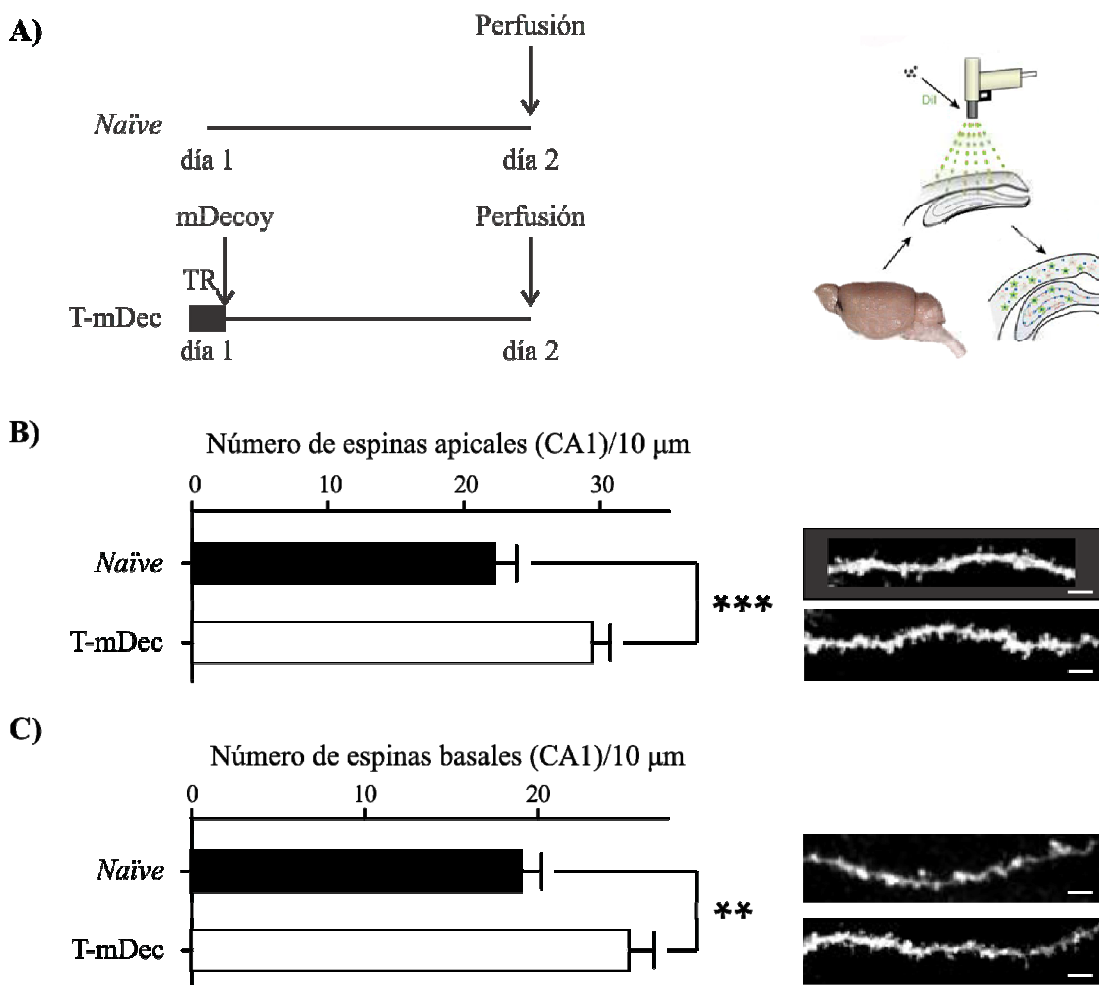
<sup>26</sup> Los animales *Naïve* de todos los experimentos de este Capítulo fueron canulados pero no inyectados.

el inhibidor de NF- $\kappa$ B, el Decoy (ver sección V.2). Asumimos que la presencia de ambos oligodeoxinucleótidos no afecta *per se* la densidad de espinas.

Los animales del grupo entrenado se anestesiaron y perfundieron (PFA 4%) un día después del entrenamiento, y sus cerebros se removieron. Ese mismo día los animales *Naïve* sufrieron el mismo protocolo de extracción de tejido cerebral. Posteriormente se llevó adelante la técnica de *DiOlistics* (ver Materiales y métodos). En particular, cuantificamos la densidad de espinas en dendritas apicales y basales de neuronas piramidales de la región CA1 (ver Capítulo I).

La Figura V.1.B muestra que existe un aumento en la densidad de espinas en dendritas apicales y basales de la región CA1 en animales entrenados respecto de animales *Naïve* (ver estadística junto con el análisis de la Figura V.2).

*Estos resultados indican que como consecuencia del aprendizaje ocurren cambios estructurales en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo.*



**Figura V.1.** Efecto del aprendizaje sobre la densidad de espinas de dendritas apicales y basales de

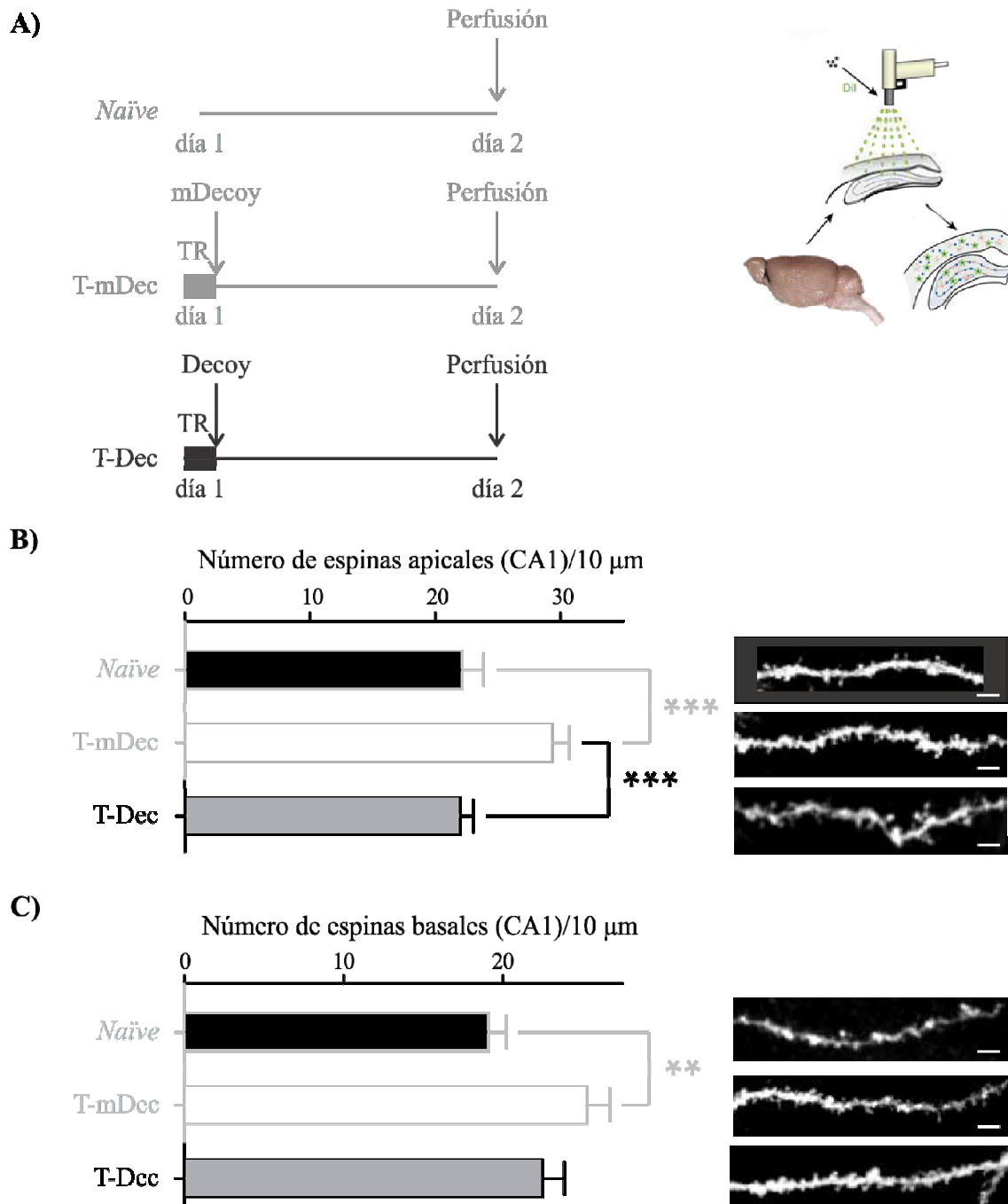
neuronas piramidales de la CA1, evaluado a 24 h del entrenamiento. **A)** Protocolo experimental. Un grupo de animales se entrenó y se inyectó intrahipocampalmente con mDecoy (T-mDec, n=5). Los animales se anestesiaron y perfundieron a las 24 h de la inyección. Un grupo *Naïve* se utilizó como control, n=5. **B)** Los resultados de densidad de espinas apicales se muestran como media del número de espinas/10  $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$ ; número total de dendritas analizadas<sub>Naïve</sub> = 27; longitud total de dendritas<sub>Naïve</sub> = 458,0  $\mu\text{m}$ ; número total de dendritas analizadas<sub>T-mDec</sub> = 29; longitud total de dendritas<sub>T-mDec</sub> = 438,9  $\mu\text{m}$ . **C)** Ídem B para espinas basales. Número total de dendritas analizadas<sub>Naïve</sub> = 53; longitud total de dendritas<sub>Naïve</sub> = 892,1  $\mu\text{m}$ ; número total de dendritas analizadas<sub>T-mDec</sub> = 26; longitud total de dendritas<sub>T-mDec</sub> = 403,3  $\mu\text{m}$ . Los datos se analizaron en conjunto con el grupo experimental mostrado en la Figura V.2, por eso se realizó un ANOVA de una vía comparando valores medios de número de espinas /10  $\mu\text{m}$ , seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls; \*\*:  $p < 0,01$ ;\*\*\*:  $p < 0,001$ . Se muestran imágenes representativas (barra: 1 $\mu\text{m}$ ).

## V.2. El aumento en la densidad de espinas apicales luego de un aprendizaje es dependiente de NF- $\kappa$ B

Para evaluar si NF- $\kappa$ B está involucrado en la plasticidad estructural que observamos luego del aprendizaje, incluimos en el experimento anterior (Figura V.1.A) un grupo más (realizado simultáneamente, ver Figura V.2.A): animales inyectados con Decoy inmediatamente después del entrenamiento (T-Dec). Este tratamiento resulta amnésico (ver Capítulo IV, sección IV.1). Un día después de la inyección (24 h después del entrenamiento) los animales se anestesiaron y perfundieron (PFA 4%), y sus cerebros fueron removidos.

La Figura V.2.B muestra que los animales inyectados con Decoy tienen una densidad de espinas similar al grupo *Naïve*, en dendritas apicales de la CA1. En las basales, si bien la densidad de espinas no difiere de las del grupo *Naïve*, tampoco presenta diferencias con la del grupo control entrenado inyectado con mDecoy [apicales: ANOVA de una vía comparando entre grupos:  $F(2,94) = 9,58$ ,  $p < 0,001$ ; Prueba *post hoc* de Newman-Keuls para todos los pares de grupos: *Naïve* vs. T-mDec:  $p < 0,001$ ; T-mDec vs. T-Dec:  $p < 0,001$ ; basales: ANOVA de una vía comparando entre grupos:  $F(2,113) = 5,28$ ,  $p < 0,01$ ; Prueba *post hoc* de Newman-Keuls para todos los pares de grupos: *Naïve* vs. T-mDec:  $p < 0,01$ ].

*Estos resultados sugieren que NF- $\kappa$ B tendría un rol clave en la plasticidad estructural asociada a la consolidación de la memoria, en las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la región CA1.*



**Figura V.2.** A) Ídem Figura V.1, con el agregado de un grupo (realizado simultáneamente): los animales se entrenaron y se inyectaron intrahipocampalmente con Decoy (T-Dec;  $n=5$ ). Se anestesiaron y perfundieron a las 24 h del entrenamiento. B) Los resultados de densidad de espinas apicales se muestran como media del número de espinas/10  $\mu\text{m}$   $\pm$  SEM. Número total de dendritas analizadas<sub>T-Dec</sub> = 41; longitud total de dendritas<sub>T-Dec</sub> = 723,8  $\mu\text{m}$ . C) Ídem B para espinas basales. Número total de dendritas analizadas<sub>T-Dec</sub> = 37; longitud total de dendritas<sub>T-Dec</sub> = 635,8  $\mu\text{m}$ . Se realizó un ANOVA de una vía comparando valores medios de número de espinas /10  $\mu\text{m}$ , seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ . Sólo se indican en el gráfico las comparaciones que resultaron significativas. Se muestran imágenes representativas (barra: 1  $\mu\text{m}$ ).

### **V.3. El aumento en la densidad de espinas en dendritas basales y apicales de la región CA1 observado 24 h luego del entrenamiento sigue presente 48 h después del entrenamiento**

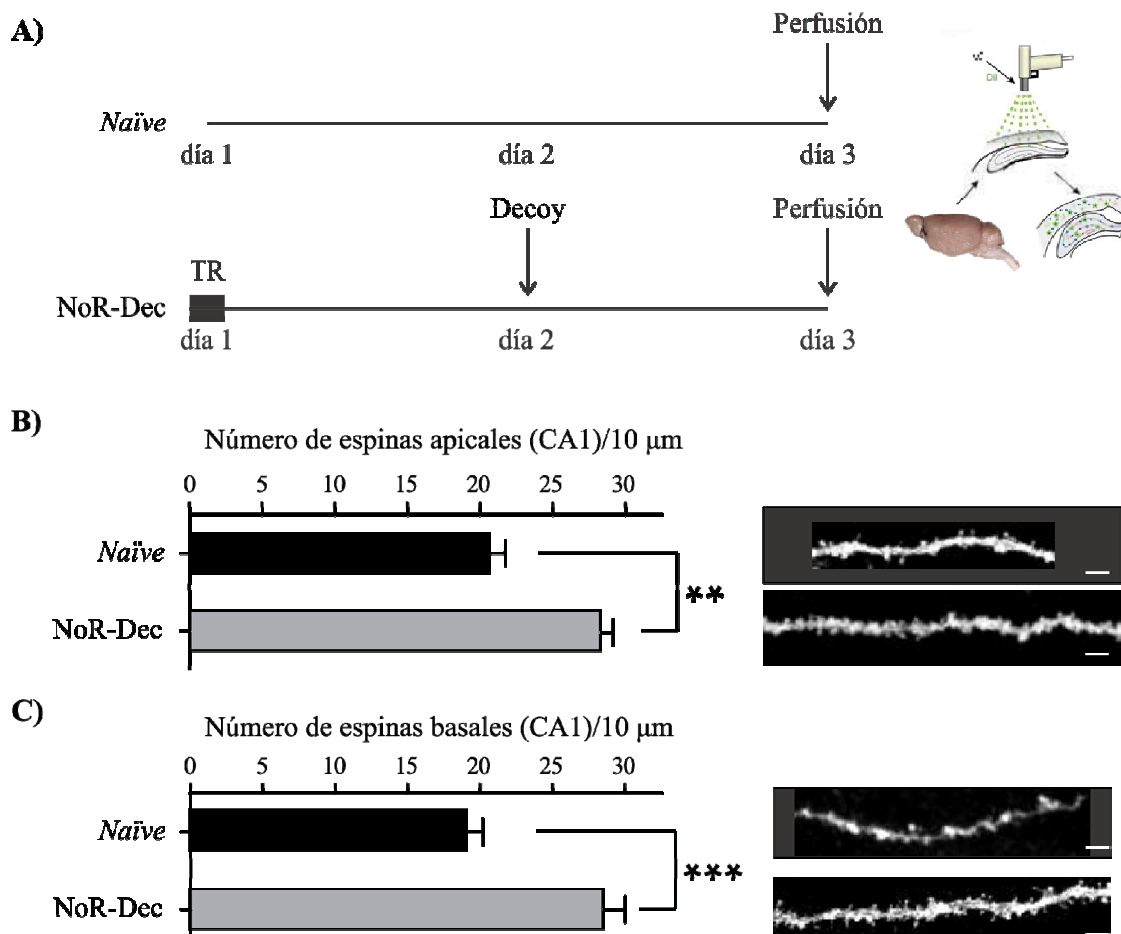
Con el objetivo de continuar el estudio del rol de NF- $\kappa$ B en plasticidad morfológica en las distintas fases de la memoria, particularmente en la reconsolidación, una pregunta importante que nos propusimos responder fue si el aumento de densidad de espinas observado un día después del entrenamiento se mantiene en el tiempo en correlación con la retención de la memoria. Recordemos que con el paradigma de memoria utilizado en esta Tesis, la memoria persiste a 48 h del entrenamiento (por ejemplo, ver Capítulo III; sección III.1).

Utilizamos dos grupos de animales, un grupo *Naïve* y un grupo entrenado. Al día siguiente del entrenamiento, al grupo entrenado no se lo reexpuso al contexto de entrenamiento, pero sí se lo inyectó intrahipocampalmente con Decoy (NoR-Dec; Figura V.3.A). La inyección de Decoy se realizó para después comparar con otros grupos de animales inyectados con el inhibidor de NF- $\kappa$ B, el Decoy, o con el oligodeoxinucleótido control, el mDecoy (ver sección V.4). Recordemos que la inyección de Decoy sin reexposición, no afecta la reconsolidación de la memoria (ni los niveles de *freezing* de los animales; ver Capítulo III, sección III.1). Nuevamente asumimos que la presencia de los oligodeoxinucleótidos no afecta *per se* la densidad de espinas.

Un día después de la inyección (48 h después del entrenamiento) los animales de ambos grupos se anestesiaron y perfundieron (PFA 4%), y sus cerebros fueron removidos. Posteriormente se llevó adelante la técnica de *DiOlistics*. Al igual que en el estudio de la consolidación mostrado en las secciones V.1 y V.2 de este capítulo, estudiamos la densidad de espinas en dendritas apicales y basales de las neuronas piramidales de la región CA1.

La Figura V.3.B muestra que el aumento de la densidad de espinas apicales y basales sigue observándose 48 h después del entrenamiento.

Este resultado nos permite continuar con el estudio, esta vez morfológico, de fenómenos involucrados en la reestabilización de la memoria luego de una reactivación, es decir, en la reconsolidación. Quizás, más interesante aún, dada la poca información que se tiene sobre el tema, nos permite estudiar los fenómenos involucrados en la labilización de la memoria.



**Figura V.3.** Efecto del aprendizaje sobre la densidad de espinas de dendritas basales y apicales de neuronas piramidales de la CA1, evaluado a 48 h del entrenamiento. **A)** Protocolo experimental. Un grupo de animales se entrenó en el día 1 y en el día 2 se lo inyectó intrahipocampalmente con Decoy (NoR-Dec,  $n=5$ ). Un grupo *Naïve* se utilizó como control,  $n=5$ . Los animales se anestesiaron y perfundieron a las 48 h del entrenamiento. **B)** Los resultados de densidad de espinas apicales se muestran como media del número de espinas/10  $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$ . Número total de dendritas analizadas<sub>Naïve</sub> = 18; longitud total de dendritas<sub>Naïve</sub> = 458,9  $\mu\text{m}$ . Número total de dendritas analizadas<sub>NoR-Dec</sub> = 14; longitud total de dendritas<sub>NoR-Dec</sub> = 280,5  $\mu\text{m}$ . **C)** Ídem B para espinas basales. Número total de dendritas analizadas<sub>Naïve</sub> = 53; longitud total de dendritas<sub>Naïve</sub> = 892,1  $\mu\text{m}$ . Número total de dendritas analizadas<sub>NoR-Dec</sub> = 28; longitud total de dendritas<sub>NoR-Dec</sub> = 549,9  $\mu\text{m}$ . Los datos se analizaron en conjunto con el grupo experimental mostrado en la Figura V.4, por eso se realizó un ANOVA de una vía comparando valores medios de número de espinas /10  $\mu\text{m}$ , seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls; \*\*:  $p<0,01$ ; \*\*\*:  $p<0,001$ . Se muestran imágenes representativas (barra: 1 $\mu\text{m}$ ).



#### **V.4. El aumento de la densidad de espinas en dendritas apicales de la CA1 debido al aprendizaje se ve impedido con la inhibición intrahipocampal de NF- $\kappa$ B luego de la reactivación de la memoria**

En el Capítulo III encontramos que la activación de NF- $\kappa$ B es necesaria para la reestabilización de la memoria luego de la reactivación, es decir, para que tenga lugar la reconsolidación. Considerando también que dicho FT sería clave en los cambios morfológicos que ocurren en la consolidación de la memoria, nos resultó relevante investigar si su participación en la reestabilización de la memoria luego de la reactivación tiene que ver con algún rol a nivel de la plasticidad estructural. De modo general, la pregunta que subyace es **¿la labilización implica cambios a nivel estructural, que luego tienen que ser reestablecidos por la reconsolidación?** En este sentido, el grupo de Kaang mostró que algunas proteínas sinápticas necesitan ser degradadas en el proceso de labilización para luego ser resintetizadas en la reconsolidación (Lee *et al.*, 2008). No existen evidencias sobre si estas proteínas estarían involucradas en la morfología sináptica (por ejemplo, podría tratarse de proteínas no estructurales). A la luz de los antecedentes mencionados, planteamos la hipótesis de que la labilización podría involucrar una disminución en la densidad de espinas dendríticas.

En esta sección, intentamos responder la pregunta planteada en el primer párrafo. La línea de razonamiento para el siguiente experimento fue: sabemos que ante ciertas características de la evocación de la memoria tiene lugar la labilización de la traza mnésica (por ejemplo 5 min de reexposición al contexto de entrenamiento), y que NF- $\kappa$ B es necesario para la reestabilización de esta memoria, entonces ¿la labilización implica la retracción (*prunning*) de espinas? Si este fuera el caso, NF- $\kappa$ B podría estar involucrado en dicha plasticidad estructural, y una disminución perdurable de la densidad de espinas debiera ser observada cuando la memoria es reactivada y NF- $\kappa$ B inhibido. Si no se observara dicha disminución, no podríamos descartar la retracción como mecanismo de labilización, porque podría ser que NF- $\kappa$ B no estuviese involucrado en la reconstitución de las espinas. También podría ser que la labilización no involucre la retracción de espinas, y que la degradación y resíntesis propuesta por Kaang se trate de elementos no estructurales. Por último, y ante este mismo resultado,

podría ser que esta técnica no fuese lo suficientemente sensible para detectar dichos cambios.

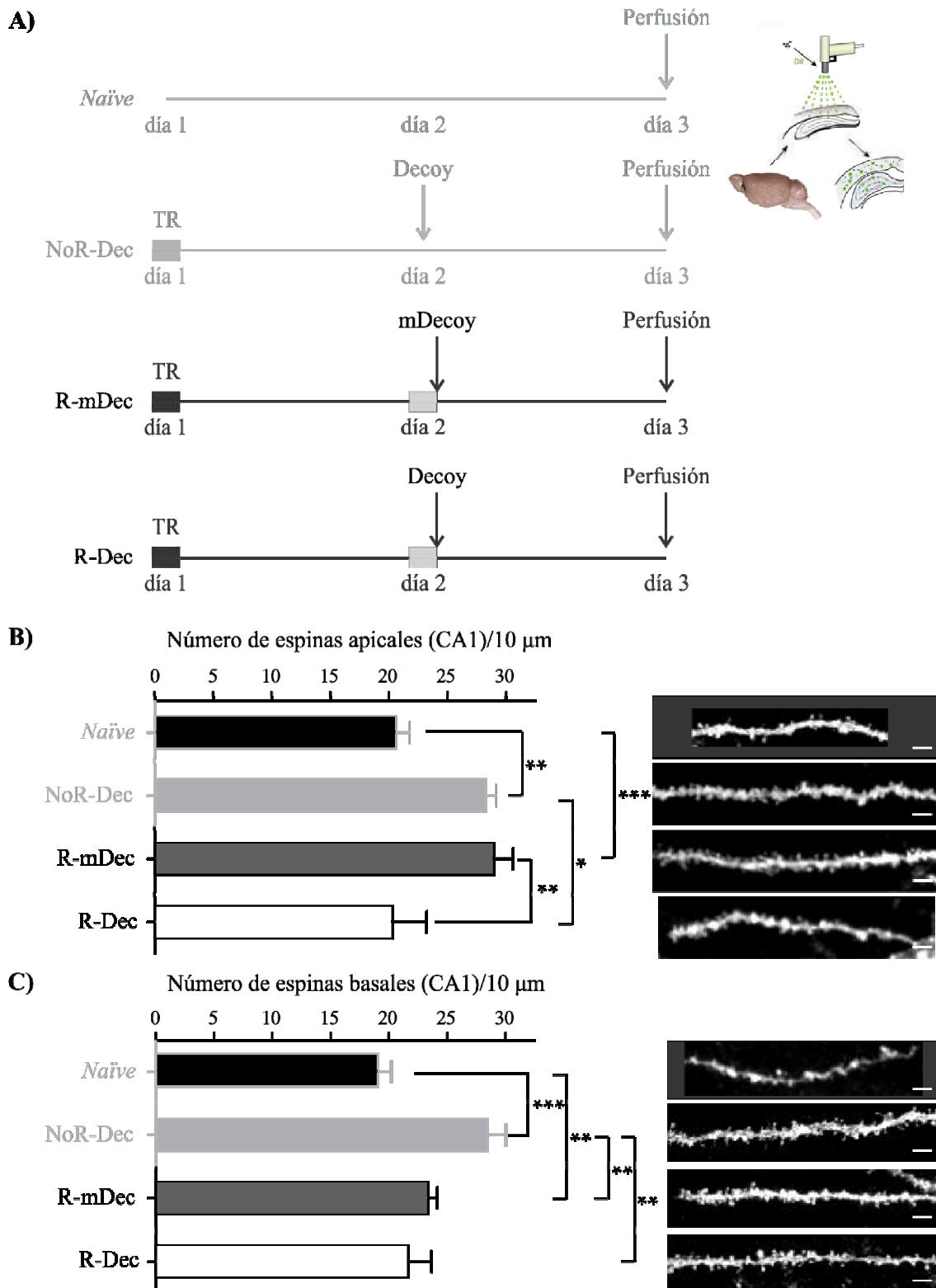
En primer lugar, entonces, fue necesario evaluar si la reexposición *per se* modifica la densidad de espinas. Para ello, el protocolo de la Figura V.3.A incluía dos grupos más (realizados simultáneamente, ver Figura V.4.A): los ratones de ambos grupos se entrenaron, se reexpusieron al contexto de entrenamiento al día siguiente, e inmediatamente se inyectaron con mDecoy o con Decoy (R-mDec y R-Dec, respectivamente). Este último tratamiento resulta amnésico (ver Capítulo III, sección III.1). Un día después de la inyección (día 3, 48 h después del entrenamiento) los animales de ambos grupos fueron anestesiados y perfundidos (PFA 4%), y sus cerebros fueron removidos. Posteriormente se llevó adelante la técnica de *DiOlistics*, y estudiamos la densidad de espinas en dendritas apicales y basales de la región CA1.

Los resultados se muestran en la Figura V.4.B. Con respecto a las espinas dendríticas apicales podemos observar que el grupo R-mDec tiene una densidad de espinas similar al grupo NoR-Dec y mayor que el grupo *Naïve*. En cuanto al grupo R-Dec, podemos ver que tiene menor densidad de espinas que los grupos NoR-Dec y R-mDec, y similar al *Naïve*. Por un lado, estos resultados indican que 24 h después de la reactivación de la memoria la densidad de espinas apicales es similar a la observada en animales cuya memoria no fue reactivada, lo que implica que la reexposición (labilización + reestabilización) *per se* no afecta la densidad de espinas apicales. Por otro lado, este estudio preliminar estaría indicando que la inhibición de NF- $\kappa$ B afecta el número de espinas sólo si ocurre la reexposición al contexto, es decir, la reactivación de la memoria. Una interpretación posible es que NF- $\kappa$ B sería efectivamente necesario luego de la labilización para restaurar el aumento en la densidad de espinas inducido durante la consolidación, y que había sido eliminado mediante por el proceso de labilización. Este resultado preliminar es muy importante ya que constituiría la primera evidencia indirecta de que la labilización implicaría la retracción de espinas apicales y que NF- $\kappa$ B estaría involucrado en el reestablecimiento de dichas espinas, proceso que permitiría la reestabilización de la memoria.

Con respecto a las espinas basales, el grupo R-mDec presentó una densidad de espinas mayor que el grupo *Naïve*. Sin embargo, por otro lado, resultó significativamente menor que la densidad de espinas del grupo no reexpuesto (NoR-Dec). Estos resultados sugieren que la inducción de la reconsolidación *per se* tendría como consecuencia una reducción perdurable en la densidad de espinas basales de la

CA1, que sin embargo se mantienen a un nivel mayor que en animales no entrenados. Por otro lado, el grupo R-Dec también presentó una densidad de espinas menor que el grupo NoR-Dec y no mostró diferencias con el R-mDec. *Con estos resultados podemos interpretar que este FT no cumpliría ningún rol en la plasticidad estructural luego de la reactivación de la memoria en dendritas basales de neuronas piramidales de la CA1.*

Las conclusiones mencionadas en este capítulo son preliminares. Por un lado, valen suponiendo que la inyección de Decoy y de mDecoy no afecta la densidad de espinas *per se*. Para la interpretación completa de estos resultados es necesario estudiar la densidad de espinas de los siguientes grupos control: *Naïve-Dec* y *Naïve-mDec*, que serán incluidos en el análisis mediante un experimento en curso. Por otro lado, debido a que son resultados preliminares, algunos poseen un número de dendritas relativamente bajo. Lo mismo sucede con la longitud total de dendritas medidas. Una vez que contemos con más datos, realizaremos otros tipos de análisis estadísticos que suelen hacerse en estudios morfológicos de este estilo, con los que nos estamos familiarizando.



**Figura V.4.** A) Ídem Figura V.3, con el agregado de dos grupos (realizados simultáneamente): dos grupos de animales se entrenaron en el día 1 y en el día 2 se reexposieron al contexto de entrenamiento e inmediatamente se los inyectó intrahipocampalmente con mDecoy (R-mDec,  $n=5$ ) o con Decoy (R-Dec,  $n=5$ ). Los animales se anestesiaron y perfundieron a las 48 h del entrenamiento. B) Los resultados de densidad de espinas apicales se muestran como media del número de espinas/10  $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$ ; Número total de dendritas analizadas<sub>R-mDec</sub> = 24; longitud total de dendritas<sub>R-mDec</sub> = 423,9  $\mu\text{m}$ . Número total de dendritas analizadas<sub>R-Dec</sub> = 10; longitud total de dendritas<sub>R-Dec</sub> = 356,8  $\mu\text{m}$ . C) Ídem B para espinas basales. Número total de dendritas analizadas<sub>R-mDec</sub> = 72; longitud total de dendritas<sub>R-mDec</sub> = 1348,8  $\mu\text{m}$ ;

## *Resultados*

---

Número total de dendritas analizadas<sub>R-Dec</sub> = 23; longitud total de dendritas<sub>R-Dec</sub> = 797,7  $\mu\text{m}$ . Se realizó un ANOVA de una vía comparando valores medios de número de espinas /10  $\mu\text{m}$ , seguido de una prueba *post hoc* de Newman–Keuls; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ . Sólo se indican en el gráfico las comparaciones que resultaron significativas. Se muestran imágenes representativas (barra: 1 $\mu\text{m}$ ).

# CAPÍTULO VI

## Discusión



## VI.1 Sobre el *switch* de factores de transcripción entre la reconsolidación y extinción de la memoria

En el aprendizaje asociativo, la reactivación de la memoria por la presentación del EC puede inducir dos procesos mnésicos aparentemente opuestos, la reconsolidación y la extinción. En los Capítulos III y IV de este trabajo describimos dos mecanismos de transcripción que se inducen diferencialmente por dichos procesos (Figura VI.1). Estos hallazgos constituyen el primer estudio de los mecanismos moleculares que determinan la dirección del reprocesamiento de la memoria luego de la reactivación.

Encontramos que el FT NF- $\kappa$ B se activa en el hipocampo y que dicha activación es necesaria para la reconsolidación de la memoria. La inhibición de NF- $\kappa$ B intrahipocampal luego de una reactivación breve, que normalmente conlleva a la reconsolidación de la memoria, induce un déficit mnésico de al menos 2 semanas, lo que sugiere un deterioro permanente. Analizando la inhibición de NF- $\kappa$ B luego de un protocolo de extinción, observamos un retardo en la recuperación espontánea, que es interpretado como una facilitación de la extinción.

El FT NFAT, por su parte, es necesario para que el proceso de extinción tenga lugar: la inhibición intrahipocampal de dicho FT, previo a un protocolo que induce extinción, impide el establecimiento de la extinción de largo término y deja la memoria original intacta. Como correlato bioquímico observamos una translocación al núcleo de la isoforma NFATc4 un tiempo después de la finalización del protocolo de extinción. En cuanto a la reconsolidación, parecería que este FT no tendría ningún rol para que dicho proceso tenga lugar.

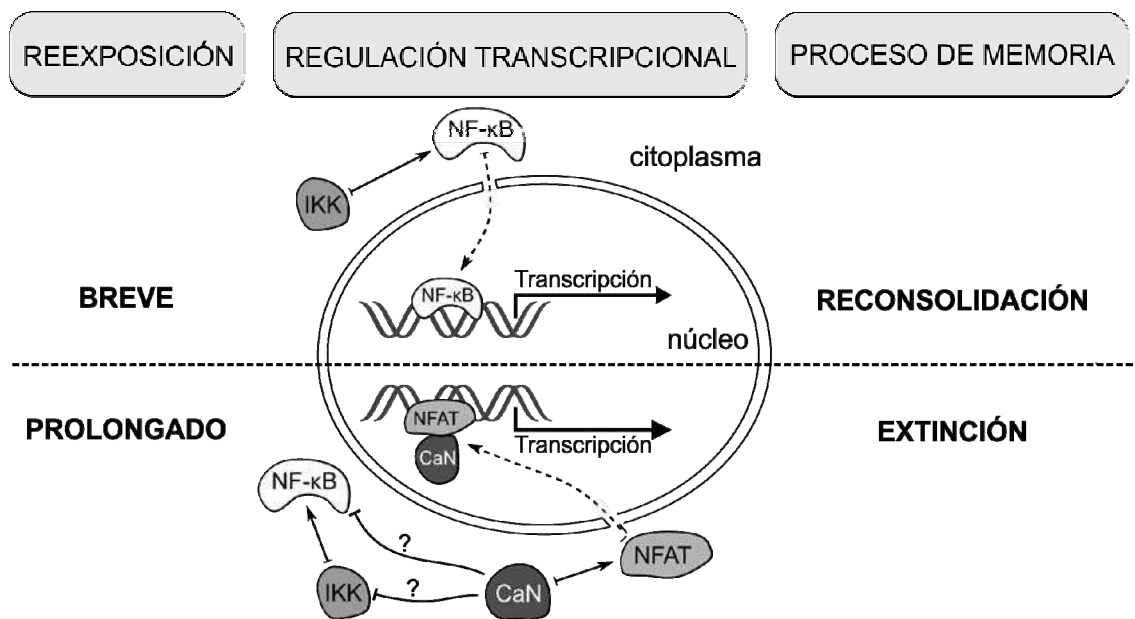
En relación a la actividad de la fosfatasa CaN en el hipocampo, encontramos que, en semejanza a lo observado para NFAT, es necesaria para que se lleve a cabo el proceso de extinción. La inhibición de CaN en el hipocampo previo a un protocolo que induce extinción no sólo bloquea dicha fase, sino que impide su propia translocación y la de NFATc4.

CaN jugaría un doble papel, por un lado induciendo la activación y translocación del FT NFAT desde el citoplasma hacia el núcleo, bloqueando a la vez la activación de NF- $\kappa$ B. Nosotros proponemos que la restricción de este FT sería parte de los mecanismos implicados en la vía de extinción. La observación de que la inhibición de NF- $\kappa$ B por la inyección de Decoy facilita la extinción puede explicarse como un



reforzamiento de la restricción de dicho FT, proceso que normalmente ocurre en el hipocampo ante una reexposición prolongada al contexto de entrenamiento.

Este *switch* entre FTs, regulado por la fosfatasa CaN, generaría un cambio determinante en la regulación de la transcripción que cambiaría la expresión génica desde la que sería necesaria para la reestabilización de la memoria original, a la requerida para la extinción. En la Figura VI.1 se muestra un esquema de los hallazgos obtenidos en esta Tesis con respecto a los mecanismos involucrados en la regulación transcripcional en reconsolidación y extinción.



**Figura VI.1.** *Switch* de FTs entre reconsolidación y extinción. Bajo una breve reexposición al contexto de entrenamiento, el FT NF-κB se activa e induce la transcripción de sus genes blanco. Este estímulo breve lleva a la reconsolidación de la memoria. Por el contrario, si el estímulo es prolongado, la fosfatasa CaN se activa y bloquea la activación de NF-κB. A su vez, activa al FT NFAT por desfosforilación directa, e induciría la transcripción de sus genes blanco. CaN y NFAT translocan al núcleo juntos, impidiendo la refosforilación de dicho FT. En este caso, ocurre la extinción. Los signos de pregunta indican que no conocemos el/los blanco/s de CaN en la vía de señalización de NF-κB

## VI.2 Sobre CaN, NF-κB y NFAT y sus relaciones

A la fecha no hay evidencias claras disponibles sobre la interacción directa entre alguna subunidad de NF-κB y CaN. Existen varios trabajos que incluso en oposición a nuestros resultados, sugieren una activación de la vía de señalización de NF-κB mediada por esta fosfatasa, mediante la inactivación de IκB por fosforilación indirecta (Frantz *et al.*, 1994; Alzuherri y Chang, 2003; Kim *et al.*, 2004). Sin embargo, también existen otros trabajos que proponen que CaN resulta inhibitoria para dicha vía de

señalización, mediante la desfosforilación de I $\kappa$ B (Pons y Torres-Aleman, 2000; Fernandez *et al.*, 2007). Como mencionamos anteriormente, nuestros resultados apoyan esta última posibilidad. Considerando las evidentemente contradictorias observaciones sobre la regulación de CaN sobre NF- $\kappa$ B, parecería ser que existe una gran dependencia del tipo y del contexto celular (Fernandez *et al.*, 2007). En nuestro caso, sería relevante realizar más estudios para corroborar nuestra propuesta. Sabemos por un lado que I $\kappa$ B fosforilada activa la vía de NF- $\kappa$ B, por lo que una desfosforilación activa por parte de CaN resultaría inhibitoria. Por otro lado, sabemos que la fosforilación de p65 aumenta la actividad de transactivación, siendo entonces también un posible blanco para CaN generando una inhibición. Durante esta Tesis utilizamos la técnica de co-inmunoprecipitación para intentar encontrar esta posible interacción directa entre CaN y p65 o I $\kappa$ B, sin obtener resultados reproducibles. Tal vez se deba a que, de existir la interacción entre dichas proteínas, podría ser muy transitoria y por lo tanto, difícil de detectar con esta metodología. Proponemos entonces otros tipos de abordajes para evaluar interacciones directas, como por ejemplo la técnica de doble híbrido en levaduras. Indirectamente, sin embargo, el panorama pareciera ser más simple. Podrían realizarse estudios del estado de fosforilación tanto de p65 como de I $\kappa$ B, con o sin inhibición de CaN. También podría evaluarse el efecto inhibitorio de CaN río arriba de NF- $\kappa$ B, por ejemplo sobre la quinasa IKK.

Para nuestro conocimiento, este trabajo es el primero en mostrar que NFAT tiene un rol clave en procesos de memoria. La forma canónica de activación de NFAT por CaN está muy caracterizada en otros sistemas (Sugiura *et al.*, 2001). Nuestro hallazgo de que FK no sólo inhibe la translocación de CaN sino también la de NFAT, apoya esta vía canónica y no una acción de NFAT sobre CaN. De hecho, el inhibidor de NFAT utilizado en el presente estudio (NFATinh) interfiere específicamente con el sitio de activación de CaN. Sería muy interesante ahondar en mecanismos celulares dependientes de NFAT, por ejemplo, indagando cuáles son sus genes blanco en la fase de extinción.

Existe un trabajo que muestra que NFAT es capaz de unirse a secuencias consenso para NF- $\kappa$ B (Casolaro *et al.*, 1995), lo cual a su vez se puede postular *a priori* al analizar la estructura de ambas secuencias consenso (NF- $\kappa$ B: GGGACTTTCC; NFAT: TTTCC). Dado que ambos FTs están involucrados diferencialmente en procesos comportamentalmente antagónicos, podría plantearse la hipótesis de una competencia entre ambos, en regiones reguladoras de genes activados en procesos de memoria.

Como vimos en el Capítulo I, BDNF es un gen blanco tanto de NF- $\kappa$ B como de NFAT, y podría representar una buena opción para comenzar este estudio.

### **VI.3 Sobre la competencia entre reconsolidación y extinción**

La naturaleza de la competencia entre reconsolidación y extinción ha sido investigada anteriormente utilizando inhibidores de la síntesis de proteínas, en varios modelos experimentales y analizando otras zonas cerebrales. En la memoria contextual, la inhibición de la síntesis de proteínas poco antes o después de una breve reexposición al contexto altera la memoria reactivada. Por el contrario, la administración de inhibidores de traducción en una reexposición prolongada afecta la extinción, dejando la memoria original intacta (Pedreira y Maldonado, 2003; Suzuki *et al.*, 2004).

La naturaleza dicotómica entre reconsolidación y extinción podría explicarse con un modelo propuesto anteriormente en nuestro laboratorio. Este modelo propone que el fin de la presentación del EC es una señal crítica que indicaría tanto la duración del EC (es decir, la duración de la reexposición al contexto de entrenamiento) como la presentación no reforzada (ausencia de refuerzo negativo, EI), y que definiría el curso de la memoria (Pedreira y Maldonado, 2003; Pedreira *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en el presente estudio apoyan ese modelo en el punto en que todas las activaciones/translocaciones de las proteínas estudiadas ocurren después de que los animales salen del contexto de entrenamiento. En reconsolidación, la disminución inicial de la actividad de NF- $\kappa$ B ocurre apenas los animales salen del contexto; mientras que la activación de dicho FT se observa 15 min después de la finalización del EC. Respecto a la extinción, las translocaciones de CaN y NFAT, se observan 45 min después de la finalización del EC; y por último, no encontramos cambios en la actividad de NF- $\kappa$ B dentro de los 30 min de reexposición prolongada que conllevan a la extinción. Así, el mecanismo de inhibición/activación de NF- $\kappa$ B en la reconsolidación, o de CaN en la extinción –y el consecuente bloqueo de NF- $\kappa$ B y translocación nuclear de NFAT-, podrían iniciarse después de que los animales hayan sido removidos del contexto entrenamiento, cuando tanto la presentación no reforzada como la duración del EC se han verificado.

Es importante considerar también el papel de los mecanismos que serían puestos en marcha *durante* la reexposición al EC (antes de su finalización) como se describe en trabajos anteriores (Lin *et al.*, 2003b; Fischer *et al.*, 2004; Merlo y Romano, 2008). En

ese tiempo de exposición, corto o largo, podrían acumularse diferencialmente señales que, al finalizar el EC, dispararían mecanismos moleculares, y sus procesos comportamentales asociados en función del tiempo de reexposición.

Cabe mencionar una crítica importante a dicho modelo que considera al fin del EC como disparador de procesos (y a los trabajos que estudian posibles mecanismos activados durante la reexposición al contexto). La misma reside en la imposibilidad metodológica de evaluar mecanismos involucrados *durante* la reexposición, porque siempre el investigador tiene que *sacar* a los animales del contexto para poder comenzar los estudios biológicos subyacentes. Así, necesariamente le pone un fin a la presentación del EC.

#### **VI.4 Sobre amnesias permanentes y transitorias, y su aplicación al tratamiento de desórdenes de miedo**

Algunos trabajos sugieren que la amnesia observada luego de interferir en la reactivación de la memoria puede deberse a otras razones que al bloqueo de la memoria original. Lattal y Abel, en su trabajo de 2004, sugieren que el bloqueo de la memoria luego de su reactivación no sería permanente y que en algún momento la RC se recupera con el tiempo (Lattal y Abel, 2004). Aunque no podemos descartar definitivamente esta interpretación, en nuestros experimentos de reconsolidación encontramos una alteración de la memoria por un período de tiempo relativamente largo (2 semanas), lo que sugiere que la interferencia sobre la memoria es permanente. Estos autores, además, sugieren que los efectos del deterioro en la memoria original encontrado con manipulaciones farmacológicas en la reconsolidación son atribuibles a la facilitación de la extinción que produce un retraso en la recuperación espontánea (y por eso antes de dicha recuperación se observaría amnesia). Nuestros resultados obtenidos en el experimento de extinción (Capítulo III) hacen que esta última interpretación sea difícil de sostener: por un lado, efectivamente observamos una recuperación espontánea de la respuesta de *freezing* una semana después del entrenamiento para el grupo control que recibió el protocolo de extinción (E-mDec) y 2 semanas después para los animales que recibieron el protocolo de extinción y una inyección intrahipocampal de Decoy (E-Dec). Por lo tanto, la falta de recuperación de la respuesta de *freezing* en los animales tratados con Decoy en el experimento de reconsolidación (R-Dec; Capítulo III), no sería compatible con una facilitación de la

extinción, ya que de ser así, hubiésemos esperado recuperación espontánea de la memoria a la semana o a las dos semanas del entrenamiento. Por esta misma razón descartamos la interpretación alternativa propuesta por el grupo de Nader en la que la extinción y la reconsolidación no serían fenómenos excluyentes (Duvarci *et al.*, 2006), pero sí competirían por recursos en común (por ej., síntesis de proteínas que se requieren en ambos procesos). Según esta idea, nuestros experimentos de extinción podrían interpretarse considerando que el tratamiento con Decoy interferiría no sólo con la formación de la extinción sino que también afectaría la reconsolidación de la memoria original. Nuestros resultados (Capítulo III, sección III.1.2), sin embargo, muestran que la RC reaparece a las 2 semanas y que por lo tanto la memoria original se encuentra intacta.

Como mencionamos en el Capítulo I, hoy en día se cuenta con dos estrategias para inhibir la expresión de memorias de miedo. Por un lado, interferir la reconsolidación de la memoria, y por otro, generar memorias de extinción, o incluso, facilitarlas. En este sentido, el hallazgo de un retraso en la recuperación espontánea (Capítulo III) es de gran importancia para el desarrollo potencial de tratamientos relacionados con enfermedades de miedo. Otros trabajos además del nuestro también han encontrado una facilitación de la extinción, utilizando la droga D-cicloserina (DCS). En un primer estudio, Ledgerwood y col. Encontraron que la memoria original de los animales a los que se les administró la droga, no podía ser reinstalada (Ledgerwood *et al.*, 2004). Sin embargo, en un segundo estudio mostraron que, aunque la extinción fue más pronunciada en los animales inyectados con DCS comparada con los controles, la recuperación espontánea fue similar en ambos grupos (Ledgerwood *et al.*, 2005). Es interesante notar que dicha droga es un agonista parcial del receptor NMDA, y varios trabajos demuestran que dicho receptor de glutamato es necesario tanto en la reconsolidación como en la extinción de la memoria. La administración de esta droga, por lo tanto, podría también inducir la facilitación de la reconsolidación de la memoria en cuestión, constituyendo así una herramienta de doble filo. Entonces, la aplicación de las estrategias antes mencionadas depende críticamente de los parámetros utilizados para inducir uno u otro proceso (Lee *et al.*, 2006). Entre dichos parámetros la duración de la reexposición al EC es de gran importancia (Pedreira y Maldonado, 2003; Suzuki *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006).

A diferencia de la DCS, la inhibición de NF- $\kappa$ B tiene un efecto comportamental similar sobre la memoria original evaluada en el día 3 en protocolos que generan

reconsolidación y en los que generan extinción: la respuesta de miedo resulta inhibida (de manera permanente en el caso de la reconsolidación, de manera facilitada pero transitoria en el caso de la extinción). Este hecho es de gran relevancia al considerar drogas para tratar enfermedades de miedo. En nuestro laboratorio ya estamos realizando experimentos en ratones inyectando inhibidores de NF- $\kappa$ B vía intraperitoneal [en dosis equivalentes a las que se administran en humanos para tratar enfermedades que involucran inflamación crónica como por ejemplo artritis reumatoidea (Plosker y Croom, 2005)]. Los resultados obtenidos hasta el momento son muy promisorios ya que resultan muy similares a los obtenidos en esta Tesis mediante inyección intrahipocampal.

## **VI.5 Sobre el papel del hipocampo en la extinción**

El papel del hipocampo en la extinción de la memoria de miedo no ha sido tan estudiado como el rol de otras áreas cerebrales tales como la amígdala y la corteza prefrontal (Maren y Quirk, 2004). De hecho, existen resultados contradictorios respecto a la necesidad de dicha área en memorias de extinción utilizando inhibidores de síntesis proteica (Lattal y Abel, 2001; Vianna *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004). En nuestro trabajo, la inhibición de eventos moleculares que regulan la expresión de genes en el hipocampo, mejoran o deterioran la extinción, apoyando el hecho de que la expresión de genes en esta estructura cerebral también sería clave en esta fase de la memoria. Esta participación se limitaría a los estímulos relacionados al contexto, ya que no se encontró ningún efecto de la inhibición de NF- $\kappa$ B, CaN o NFAT en hipocampo sobre memoria de miedo asociada a claves (tono). Estudios recientes también apoyan un papel fundamental del hipocampo en la extinción de la memoria de miedo contextual, con la participación de otros mecanismos como la reorganización del esqueleto de actina (Fischer *et al.*, 2004), la acción de los endocannabinoides a través de los receptores CB1 (de Oliveira Alvares *et al.*, 2008), la degradación proteica por el sistema de proteasoma (Lee *et al.*, 2008), señalización por cdk5 (Sananbenesi *et al.*, 2007), y la inactivación de la tirosin-quinasa Fyn (Isosaka *et al.*, 2009).

## VI.6 Sobre el papel de calcineurina como limitante negativo en procesos de memoria

Como mencionamos en el Capítulo I, desde hace algunos años varios autores han planteado que CaN sería una molécula clave en la regulación de la formación de memorias. Luego de haber encontrado una relación funcional entre NF- $\kappa$ B y dicha fosfatasa en los procesos de reconsolidación y extinción, nos propusimos indagar sobre la existencia de dicha relación en la regulación de la formación de memorias nuevas.

En el Capítulo IV, encontramos por un lado, que NF- $\kappa$ B se activa luego de un entrenamiento de condicionamiento de miedo, y dicha activación es necesaria para que se forme la memoria contextual. Por otra parte, en un protocolo de entrenamiento débil, encontramos que efectivamente la inhibición de CaN luego del entrenamiento facilita la formación de la memoria contextual. Utilizando como estrategia la inhibición simultánea de ambas proteínas en un protocolo de facilitación de la memoria en el entrenamiento, mostramos que la facilitación observada previamente por la inactivación de CaN no ocurre si también se inhibe NF- $\kappa$ B.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que CaN actúa como limitante negativo en la formación de memorias, pero a la vez aportan nueva información sobre un posible blanco de CaN: NF- $\kappa$ B. De esta forma profundizamos el modelo en el que quinasas y fosfatasas dependientes de calcio controlan activamente el procesamiento neuronal, mediante un equilibrio finamente regulado en el que se oponen entre sí (Lisman, 1994). Existen estímulos que favorecen el direccionamiento de ese balance hacia la fosforilación (por ejemplo, un entrenamiento estándar de 3 ensayos), generando memorias duraderas; y estímulos que favorecen el direccionamiento del balance hacia la desfosforilación, resultando perjudiciales para la formación de una memoria.

La vía de señalización de NF- $\kappa$ B constituye un buen ejemplo de *blancos celulares* modulables por fosforilación / desfosforilación. Se conoce ampliamente que para la activación de dicho FT es necesaria la fosforilación de la proteína regulatoria I $\kappa$ B, así como también la fosforilación de p65. La quinasa PKA ha sido involucrada en este último proceso de fosforilación mediando la activación del FT. La evidencia de que CaN podría participar en el direccionamiento de la fosforilación en sentido opuesto constituye un aporte relevante en cuanto al conocimiento de vías de inhibición de dicho FT, hasta ahora no muy conocidas.

En apoyo al modelo general de regulación de procesos mnésicos propuesto en esta Tesis, existen varios trabajos que sugieren que la vía de señalización AMPc/PKA modula negativamente la activación de NFAT [revisado en (Sheridan *et al.*, 2002)].

Respecto a los trabajos que encuentran a la fosfatasa CaN como limitante negativo, pocos indagan sobre sus mecanismos de acción. Lin y col. mostraron que, asociado al entrenamiento de extinción de una memoria asociativa en ratas, se observa una disminución de la forma fosforilada (activa) del FT CREB en la amígdala, y que dicha disminución es dependiente de la actividad de CaN (Lin *et al.*, 2003b). Los mismos autores mostraron en otro trabajo que también disminuye la actividad de la quinasa AKT en amígdala [también llamada proteína quinasa B; (Lin *et al.*, 2003c)], en dependencia con la actividad de CaN. El grupo de Baumgartel, por su parte, utilizando un modelo de condicionamiento al miedo en ratas encuentra que en amígdala, la consolidación de la memoria de clave implica una disminución de la actividad de CaN, que correlaciona con un aumento del FT ZIF268. La sobreexpresión de dicho FT junto con la disminución de CaN utilizando animales transgénicos refuerza la memoria original y hace que sea resistente a protocolos de extinción (Baumgartel *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta los resultados presentados en esta Tesis, estos últimos datos resultan muy interesantes pues hay evidencias de que ZIF268 es un gen blanco de NF- $\kappa$ B (Levenson *et al.*, 2004; Carayol *et al.*, 2006; Lubin y Sweatt, 2007). Quizás, NF- $\kappa$ B constituya el nexo entre la relación CaN-ZIF268 observada por Baumgartel y col. (2008).

Cabe destacar que si bien la inhibición de CaN produce un reforzamiento de la memoria, la memoria reforzada no se equipara a una memoria fuerte inducida por tres ensayos. Esto se evidencia en que la duración de la misma es menor. Con el paradigma de comportamiento utilizado, es difícil especular sobre si lo que difiere es la cantidad o la calidad de memoria formada, es decir, si simplemente la memoria es más débil o si se aprenden menos cosas. Sí podemos mencionar que en la formación de una memoria se reclutan diversas vías moleculares (no sólo la activación de un FT) que contribuyen a la calidad/cantidad de esa memoria, y que probablemente no estarían siendo activadas con un entrenamiento débil. La modulación externa de *una* de esas vías, evidentemente no permite que se reúnan todas las características de una memoria generada con un entrenamiento estándar. Entre las vías moleculares que contribuyen a la persistencia de una memoria, podemos mencionar la activación de BDNF y del FT c-Fos (Bekinschtein *et al.*, 2007; Katche *et al.*, 2010) y la acetilación de histonas (Federman *et al.*, enviado).



Por otra parte, el haber encontrado que NFAT es necesario para que ocurra la extinción, también nos hizo plantear si este FT actuaría como limitante negativo para la formación de memorias nuevas. Su inhibición luego de un entrenamiento débil no mostró facilitación de la memoria, por lo que esta idea en principio quedaría descartada. Parecería ser que si ciertas condiciones no se dan, por más que se altere el balance de algunos procesos (en este caso, inhibir la transcripción dependiente de NFAT) no alcanza para que ocurra un fenómeno de mayor envergadura como la memoria. Particularmente en este caso, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la fosfatasa CaN, podríamos interpretar que por más que la transcripción dependiente de NFAT se altere, si no se activa la dependiente de NF- $\kappa$ B (por ejemplo, inhibiendo a CaN), la memoria no se facilita.

## **VI.7 Sobre la comparación de procesos mnésicos con LTP / LTD**

Como hemos comentado en el Capítulo I, se ha postulado que los procesos de plasticidad involucrados en memoria, principalmente en el hipocampo, se desencadenan mediante un desbalance entre quinasas y fosfatasas (Lisman, 1994).

Una aproximación a los procesos circuitales, celulares y moleculares que ocurren durante el almacenamiento de información nueva lo aportan fenómenos de plasticidad neuronal como la potenciación y depresión sinápticas (Pastalkova *et al.*, 2006; Whitlock *et al.*, 2006). La potenciación de largo término (LTP, del inglés *long term potentiation*), implica que la fuerza de las conexiones sinápticas puede ser aumentada sostenidamente en el tiempo como resultado en el cambio de la eficacia sináptica, y es generado con un protocolo de estimulación neuronal de alta frecuencia. Este fenómeno puede clasificarse en distintas fases que poseen un notable paralelo con los requerimientos moleculares y características de la memoria. Se ha establecido que para la inducción y mantenimiento del LTP es necesaria la actividad traduccional y transcripcional (Stanton y Sarvey, 1984; Huang *et al.*, 1994; Frey *et al.*, 1996). Como procesos particulares podemos mencionar a la activación de quinasas como PKC y CaMKII (Malinow *et al.*, 1989), la activación de FTs como NF- $\kappa$ B (Freudenthal *et al.*, 2004), la participación de receptores [glutamatérgicos de tipo NMDA; (Muller *et al.*, 1988)], y la necesidad de formar nuevas sinapsis (Toni *et al.*, 1999).

Por otro lado, protocolos de estimulación de baja frecuencia llevan a la depresión sináptica duradera o depresión de largo término (LTD, del inglés *long term*

*depression*). En estos procesos de debilitamiento sináptico ocurre una activación de fosfatasa, y a diferencia del LTP, se postuló que sería requerida la síntesis de nuevas proteínas y no la síntesis de mensajeros (Manahan-Vaughan *et al.*, 2000). Trabajos recientes sugieren también una retracción de espinas dendríticas (Zhou *et al.*, 2004). Entre las fosfatasas necesarias, CaN ha sido involucrada en este tipo de plasticidad neuronal (Mulkey *et al.*, 1994).

Nuestros resultados apoyan la hipótesis que sugiere que los mecanismos subyacentes a la memoria de consolidación y reconsolidación están mediados por mecanismos comunes a los descriptos para el LTP. A su vez, sostienen también la idea de que la extinción está mediada en parte por mecanismos comunes a los descriptos para el LTD, que debilitarían la memoria original.

Como trabajo a futuro, siguiendo nuestros resultados y los trabajos que muestran la relación de CaN con el fenómeno de LTD, sería interesante evaluar la necesidad de NFAT para el LTD. Por ejemplo, si las hipótesis son correctas, esperaríamos que el bloqueo de NFAT reduzca o impida el LTD.

## **VI.8 Sobre la plasticidad morfológica**

Resultados preliminares presentados en esta Tesis sugieren que existe un aumento en la densidad de espinas en dendritas basales y apicales de neuronas piramidales de la región CA1 asociados al aprendizaje.

A nivel general, este resultado apoya la idea de que el aprendizaje involucra cambios estructurales. Varios grupos de trabajo han arribado a esta misma conclusión, utilizando diferentes paradigmas, tanto en invertebrados como en vertebrados. En nuestro modelo de estudio en particular, teniendo en cuenta trabajos realizados en vertebrados y en el hipocampo, los resultados son heterogéneos. En concordancia con nuestros resultados, Restivo y col. (2009), utilizando el mismo paradigma de comportamiento, mostraron un aumento de la densidad tanto de espinas de dendritas basales como apicales en el área CA1 (Restivo *et al.*, 2009). No obstante, el grupo de Leuner encontró cambios sólo en dendritas basales pero no en apicales de dicha región (Leuner *et al.*, 2003). El grupo de Moser, por su parte, mostró un aumento también en la densidad de espinas en dendritas basales y no en apicales de la región CA1, utilizando en este caso como modelo de estudio un paradigma de memoria espacial, el *test* de Morris (Moser *et al.*, 1994). Por otro lado, el aprendizaje olfativo aumenta la densidad

de espinas, esta vez en las dendritas apicales, no basales, de la región CA1 (Knafo *et al.*, 2004). Más allá del compartimiento celular donde ocurran estos cambios –que seguramente depende del paradigma utilizado- resulta claro que el común denominador de estos estudios es el hecho de que el aprendizaje efectivamente produce cambios en la densidad de espinas.

Poco se conoce sobre los mecanismos moleculares que están involucrados en dicha plasticidad morfológica. Particularmente ha sido estudiado el rol del receptor de glutamato NMDA, y si bien parece ser importante en el hipocampo en memorias no espaciales, no es esencial para los cambios estructurales sinápticos inducidos por la experiencia (Rampon *et al.*, 2000). Se propone que otros componentes celulares tendrían un rol importante: los filamentos de actina del citoesqueleto, de los que depende en última instancia la arquitectura celular; receptores AMPA, y proteínas GTPasas de tipo Rho (Lamprecht y LeDoux, 2004).

En este trabajo sugerimos que el FT NF- $\kappa$ B tendría un rol clave en el aumento de la densidad de espinas en dendritas apicales de neuronas piramidales de la CA1 asociados al aprendizaje, pero no en el aumento de densidad de espinas en dendritas basales. Sería relevante estudiar si dichos cambios están relacionados con su actividad transcripcional o con alguna otra actividad de este FT en espinas. Acorde a esta idea, se ha visto que NF- $\kappa$ B, particularmente el dímero p50/p65, está presente en las densidades post-sinápticas. Dicho FT podría enviar la señal hacia el núcleo por transporte retrógrado, o ejercer algún rol local en las espinas.

Con respecto a la reconsolidación, este es el primer trabajo que estudia la dinámica de las espinas en dicha fase de la memoria. En primer lugar encontramos que la reexposición al contexto de entrenamiento no modifica el aumento en la densidad de espinas en dendritas apicales de neuronas piramidales de la CA1 asociado al aprendizaje. Sin embargo, si el FT NF- $\kappa$ B es inhibido luego de esa reactivación de la memoria, disminuye la densidad de espinas en las dendritas de esa zona hipocampal. Esto podría sugerir que luego de la reactivación ocurre una disminución en el número de espinas que luego debe ser reestablecido por la reconsolidación. Por lo tanto, NF- $\kappa$ B estaría involucrado en esta reestabilización. Este sería también el primer estudio en el que se observa que la labilización de la memoria podría involucrar una retracción de espinas.

Por otro lado, encontramos que la reexposición al contexto de entrenamiento sí modifica el aumento en la densidad de espinas en dendritas basales de neuronas piramidales de la región CA1. Particularmente observamos una disminución en el número de espinas. Esta disminución no se ve modificada por la inhibición de NF- $\kappa$ B, por lo que este FT parecería no tener algún rol en los cambios morfológicos asociados a la reconsolidación de la memoria en dendritas basales de esta zona hipocámpal (en concordancia con lo observado en la consolidación).

Es interesante plantear la discusión de si “más” es “mejor”, en otras palabras: ¿más espinas implica más memoria? En el trabajo del grupo de Yang y col. se analiza en función del tiempo las espinas dendríticas formadas luego de una experiencia nueva (Yang *et al.*, 2009). Sus resultados indican que, si bien existe la formación de espinas nuevas, no todas perduran. Inclusive, algunas espinas preexistentes se pierden. Esto podría interpretarse a favor de la idea de que no siempre “más es mejor”, y que lo que importa son *ciertas* espinas.

Nuestros resultados conciben con los de este grupo en tanto el aprendizaje genera nuevas espinas, y en tanto existe una dinámica en su mantenimiento. Particularmente nosotros no las estudiamos a través del tiempo, pero sí a través de la experiencia (reactivando la memoria). La experiencia haría que no todas las espinas generadas perduren, en cambio, podría haber una selección activa de las mismas.

Es importante mencionar que ningún estudio ha demostrado si las espinas nuevas asociadas al aprendizaje son funcionales, es decir, si reciben *inputs* o están conectadas a un circuito. En relación a esto, se ha probado que no sólo la densidad cambia en relación al aprendizaje, sino también la morfología de las espinas. Dado que la forma de las espinas está relacionada con su grado de madurez, y su grado de madurez con la funcionalidad (Bourne y Harris, 2007; Bourne y Harris, 2008), este hecho tiene importancia en cuanto a su rol fisiológico. Sería muy relevante ahondar en este estudio.

Como mencionamos en el Capítulo V, es importante recordar que los resultados, y por lo tanto las conclusiones sobre nuestros estudios de plasticidad morfológica son preliminares.

## VI.9 Sobre la naturaleza de la extinción

En el Capítulo I hicimos una breve revisión de las hipótesis vigentes que intentan explicar el fenómeno de extinción. Considerando las teorías asociativas, está por un lado la hipótesis del *unlearning* y por otro, la de la *nueva memoria inhibitoria* sobre la original. En cuanto a la primera, por definición, propone un debilitamiento de la memoria original hasta que esta desaparece. Al no considerar la recuperación espontánea, creemos que esta hipótesis debería ser, al menos, reformulada. Respecto a la hipótesis de la nueva memoria, consideramos pertinente realizar varias observaciones, detalladas a continuación.

La necesidad de síntesis proteica durante cierto período de tiempo para que ocurra la extinción de la memoria fue y es considerada una fuerte evidencia a favor de la hipótesis de que dicha fase constituye en realidad una *nueva memoria* y que ésta estaría regulada por mecanismos similares a los que ocurren cuando se aprende algo nuevo (es decir, similar a la consolidación de la memoria original). Basándose en esta idea, muchos investigadores pusieron esfuerzo en encontrar similitudes mecánicas entre ambos procesos, y de hecho algunas similitudes fueron encontradas (Suzuki *et al.*, 2004).

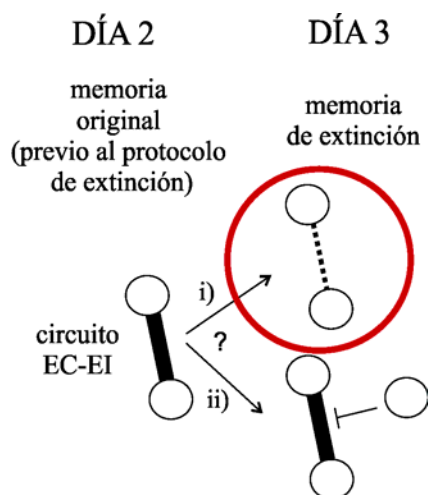
Nuestra propuesta sobre la necesidad de la actividad de un FT en la extinción de la memoria apoya los resultados que sugieren que la síntesis de mensajeros y proteínas es necesaria en esta fase, y por ende respaldan también la hipótesis de la formación de una *nueva memoria* basada en el requerimiento de síntesis proteica.

Sin embargo, analizando detalladamente la identidad de esas proteínas necesarias en la extinción, vemos que no son necesariamente las mismas que para la consolidación de una memoria, ni tienen funciones similares. Particularmente nosotros encontramos que la fosfatasa CaN es necesaria para la extinción, y que el FT implicado (NFAT), es activado por ésta última por multi-desfosforilación. Varios trabajos también apoyan la idea de que para la extinción son necesarias mayoritariamente las fosfatasas (Lin *et al.*, 2003a; Lin *et al.*, 2003c; Lin *et al.*, 2003b; Baumgartel *et al.*, 2008; Havekes *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta que para la consolidación y la reconsolidación son necesarias mayoritariamente las quinasas (y FT activables por fosforilación), estas evidencias apoyarían la idea de que la extinción necesita, al menos en el hipocampo, de mecanismos antagónicos a los implicados en la formación de una memoria nueva, y por

ende, que implica un *debilitamiento de la memoria original* (que no sería permanente pues la memoria original reaparece).

A la luz de nuestros resultados, que apoyan por un lado la necesidad de síntesis proteica, pero también la idea del *debilitamiento* de la memoria original, quizás habría que revisar no sólo la hipótesis del *unlearning* como mencionamos anteriormente, sino también la definición de la hipótesis de la *nueva memoria inhibitoria* basada en el requerimiento de síntesis proteica. La necesidad de un proceso celular tan básico evolutivamente e imprescindible para la vida como lo es la síntesis proteica no necesariamente implica que los mecanismos particulares de dos procesos que la necesitan sean iguales.

Proponemos pensar a los mecanismos subyacentes a la formación de las distintas fases de la memoria en relación a la *activación* (reforzamiento) o la *inhibición* (debilitamiento) de circuitos. En el caso de la extinción, es claro que a nivel comportamental lo que sucede es opuesto a lo que se observa cuando la memoria original se expresa. A nivel de circuitos, podríamos pensar que para que ocurra la extinción, el circuito que codifica la memoria original tiene que ser inhibido de alguna manera. Esta inhibición podría ser intrínseca al circuito original (involucrando los mismos componentes) o extrínseca (involucrando otros circuitos). En el primer caso, involucraría un debilitamiento del propio circuito; en el segundo, podría tratarse del reforzamiento de algún circuito inhibitorio que haga contacto con él. Tiene sentido entonces proponer que el primer caso involucra mecanismos celulares opuestos a los necesarios para la formación de las conexiones originales del circuito, por ejemplo activación de fosfatasa, retracción de sinapsis, etc.; mientras que es lógico también que, de tratarse del reforzamiento del circuito inhibitorio, se utilicen mecanismos celulares similares a los implicados en la formación de las conexiones originales del circuito (sólo que aplicadas a este nuevo circuito inhibitorio resultarían en el fortalecimiento de una inhibición, y consecuentemente el resultado sería el planteado originalmente), por ejemplo activación de quinasas, formación de nuevas sinapsis, etc. En la Figura VI.2 presentamos de una manera esquemática estas dos posibilidades.



**Figura VI.2.** Esquema del circuito neuronal implicado en la formación de la memoria original. Proponemos dos modificaciones a este circuito para explicar la respuesta comportamental de la extinción: i) el debilitamiento del circuito original, que para ocurrir implicaría mecanismos de plasticidad neuronal *opuestos* a los necesarios para la formación del circuito original; ii) la existencia de un circuito inhibitorio sobre el original, que para su formación implicaría mecanismos similares a los necesarios para la formación de este último. Nuestros resultados apoyan la propuesta i).

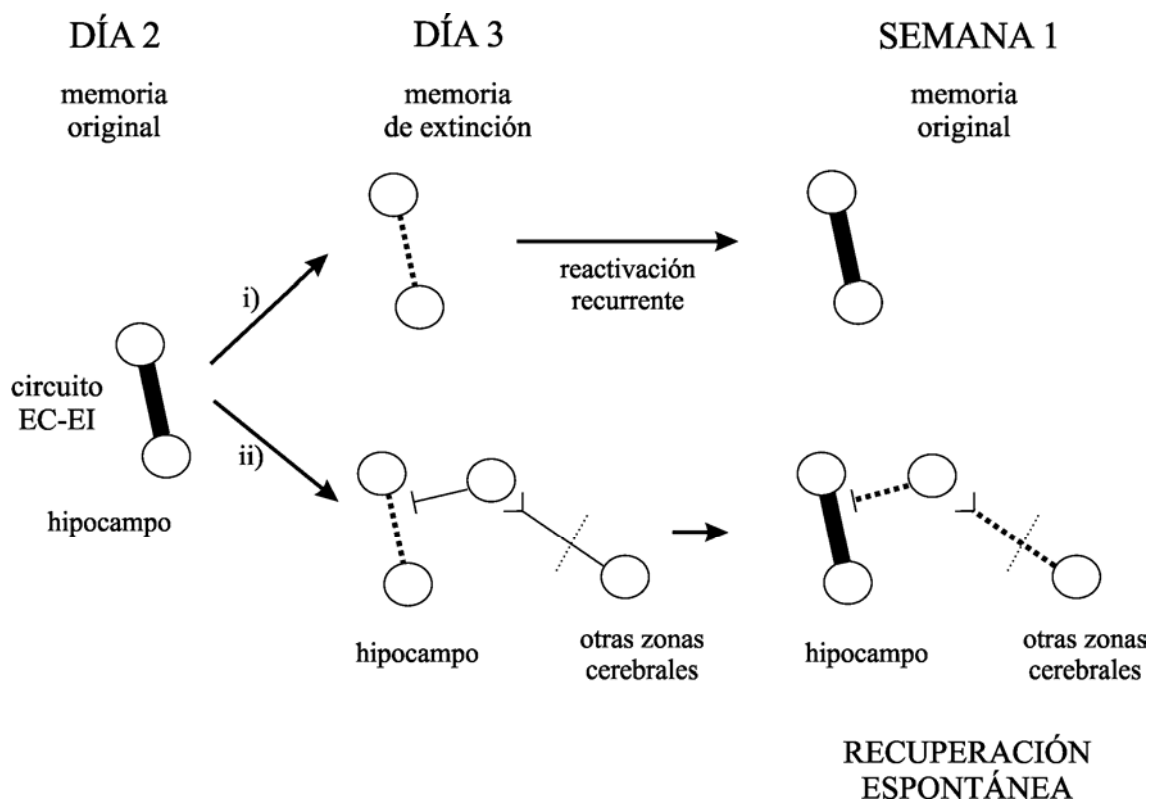
**En esta Tesis, proponemos que la extinción de la memoria implica en el hipocampo mecanismos de transcripción génica (y probablemente síntesis proteica) cuya función principal sería producir el debilitamiento de la memoria original (Figura VI.2).**

No obstante, nuestro modelo no explica la recuperación espontánea de la memoria original. Proponemos dos mecanismos alternativos que podrían dar cuenta de su existencia (Figura VI.3). Por un lado, el reforzamiento del circuito original podría estar dado por la presencia de mecanismos similares a los del mantenimiento o persistencia de la memoria a lo largo del tiempo. Estos podrían incluir *oleadas* tardías de reactivación recurrente de circuitos y la consecuente activación de vías moleculares, como se ha informado en algunos trabajos [Figura VI.3 i; (Bekinschtein *et al.*, 2007)].

Por otro lado, podrían existir simultáneamente circuitos inhibitorios que se activen cuando la memoria de extinción se expresa, pero que con el tiempo desaparezcan. Acorde a esto se ha planteado que la nueva memoria inhibitoria sería menos duradera que la original, por la naturaleza aversiva de esta última (Myers *et al.*, 2006). Nosotros no obtuvimos resultados a favor de la existencia de un circuito inhibitorio (NF- $\kappa$ B, activado por quinasas, no se requiere para la formación de la memoria de extinción), pero lo cierto es que no estudiamos otras proteínas que también son necesarias para el reforzamiento de una memoria (por ejemplo activación de

quinasas), y además, esa activación de circuitos inhibitorios podría ocurrir a tiempos diferentes a los que elegimos para estudiar NF- $\kappa$ B.

Un circuito inhibitorio que participa en la extinción de la memoria de miedo ha sido caracterizado entre la corteza prefrontal y la amígdala (Sotres-Bayon y Quirk, 2010) para memorias de clave. Particularmente, la corteza prefrontal envía proyecciones excitatorias a la amígdala, y dichas conexiones activan a su vez un circuito inhibitorio que suprime la respuesta de miedo (inhibe el circuito original EC-EI). En memorias contextuales, podría existir un circuito inhibitorio similar en el hipocampo (Figura VI.3 ii). Sería interesante evaluar esta posibilidad en nuestro modelo y una forma de hacerlo sería utilizando la activación o inhibición de receptores de GABA (neurotransmisor liberado en sinapsis inhibitorias) como herramienta para evaluar si se facilita o impide la extinción



**Figura VI.3.** Para explicar la recuperación espontánea agregamos a nuestro modelo de debilitamiento de la memoria original dos alternativas no excluyentes. i) La existencia de mecanismos tipo-mantenimiento o persistencia de la memoria, que refuercen el circuito original con el paso del tiempo. ii) La existencia simultánea de circuitos inhibitorios. En este esquema, en el día 3, se ven representados tanto mecanismos de debilitamiento como también la presencia de circuitos inhibitorios, dentro del hipocampo y tal vez regulados desde otras zonas. Estos se debilitarían con el tiempo, permitiendo la expresión de la memoria original (recuperación espontánea).



En función de los resultados presentados en esta Tesis y de otros oportunamente citados, la *consolidación de la memoria de extinción* requeriría de mecanismos parcialmente diferentes a la consolidación de la memoria original. Estas diferencias se deberían a que en parte el circuito intrínseco se debilita. Sin embargo, esto no sería excluyente con el modelo que involucra un circuito extrínseco inhibitorio. En este caso, la consolidación de la memoria de extinción requeriría de mecanismos similares a los de la consolidación de la memoria original.

Cabe remarcar que estas ideas son especulativas, y obedecen más bien a un principio de parsimonia en el que se busca la explicación más simple posible. No siempre estas explicaciones simples reflejan los mecanismos biológicos reales. El avance de las investigaciones respecto a este estudio seguramente nos dirá si habrá que reformular aún más nuestras hipótesis sobre los fenómenos observables, tal como hemos hecho nosotros con las hipótesis que intentan explicar la memoria de extinción hasta ahora.

Creemos que estudios realizados en los últimos años, como los presentados en esta Tesis, que analizan los mecanismos celulares y moleculares de la memoria, pueden aportar valiosa información para la comprensión de los procesos mnésicos. Junto con estudios realizados con técnicas electrofisiológicas y optogenéticas permitirán reformular las hipótesis actuales sobre la naturaleza de estos procesos.

## Conclusiones

- La actividad del FT NF- $\kappa$ B en el hipocampo dorsal es necesaria para la consolidación y reconsolidación de la memoria de condicionamiento de miedo contextual. La inhibición de dicho FT en un protocolo que genera extinción facilita dicho proceso.
- La fosfatasa CaN es necesaria en el hipocampo dorsal para que ocurra la extinción de la memoria de condicionamiento al miedo contextual.
- La activación del FT NFAT, mediada por la fosfatasa CaN, es necesaria en el hipocampo dorsal para que ocurra la extinción de la memoria de condicionamiento de miedo contextual. Esta es la primera evidencia directa que involucra a este FT en procesos de memoria.
- Al inducirse la extinción, la fosfatasa CaN no permite la activación del FT NF- $\kappa$ B, pero sí la del FT NFAT, indicando que existe un *switch* molecular que determina que ocurra la reconsolidación o la extinción de la memoria.
- CaN actúa, en el hipocampo dorsal, como limitante negativo en la formación de memorias nuevas, pues al inhibirla la memoria se facilita. Esta facilitación es dependiente de NF- $\kappa$ B.
- Resultados preliminares indican que, asociado al aprendizaje, existe un aumento en la densidad de espinas apicales y basales en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. El FT NF- $\kappa$ B estaría involucrado en dicha plasticidad morfológica en dendritas apicales, pero no en las basales.
- La reconsolidación no afectaría la densidad de espinas de dendritas apicales de la región CA1. La labilización induciría una disminución de la densidad de espinas en estas dendritas, que sería reconstituido en la reestabilización. NF- $\kappa$ B sería clave en dicha reconstitución.

- La reconsolidación *per se* afectaría la densidad de espinas de dendritas basales de la región CA1, generando una disminución. NF- $\kappa$ B no tendría un rol en este proceso.

---

# Referencias

- Abbott A (2010) Neuroscience: The rat pack. *Nature* 465:282-283.
- Abel T, Martin KC, Bartsch D, Kandel ER (1998) Memory suppressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory. *Science* 279:338-341.
- Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourtchouladze R (1997) Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88:615-626.
- Ahn HJ, Hernandez CM, Levenson JM, Lubin FD, Liou HC, Sweatt JD (2008) c-Rel, an NF-kappaB family transcription factor, is required for hippocampal long-term synaptic plasticity and memory formation. *Learn Mem* 15:539-549.
- Alberini CM (2009) Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev* 89:121-145.
- Alberini CM (2005) Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 28:51-56.
- Alberts B (1994) *Molecular biology of the cell*, 3rd Edition. New York: Garland Pub.
- Alzuherrri H, Chang KC (2003) Calcineurin activates NF-kappaB in skeletal muscle C2C12 cells. *Cell Signal* 15:471-478.
- Anagnostaras SG, Gale GD, Fanselow MS (2001) Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 11:8-17.
- Anagnostaras SG, Maren S, Fanselow MS (1999) Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J Neurosci* 19:1106-1114.
- Aramburu J, Rao A, Klee CB (2000) Calcineurin: from structure to function. *Curr Top Cell Regul* 36:237-295.
- Aramburu J, Yaffe MB, Lopez-Rodriguez C, Cantley LC, Hogan PG, Rao A (1999) Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 285:2129-2133.
- Aramburu J, Garcia-Cozar F, Raghavan A, Okamura H, Rao A, Hogan PG (1998) Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol Cell* 1:627-637.
- Baumgartel K, Genoux D, Welzl H, Tweedie-Cullen RY, Koshibu K, Livingstone-Zatchej M, Mamie C, Mansuy IM (2008) Control of the establishment of aversive memory by calcineurin and Zif268. *Nat Neurosci* 11:572-578.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilacqua 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* 53:261-277.
- Berman DE, Dudai Y (2001) Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science* 291:2417-2419.
- Bhakar AL, Tannis LL, Zeindler C, Russo MP, Jobin C, Park DS, MacPherson S, Barker PA (2002) Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival. *J Neurosci* 22:8466-8475.
- Blanchard RJ, Blanchard DC (1969) Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J Comp Physiol Psychol* 68:129-135.
- Blitzer RD, Wong T, Nouranifar R, Iyengar R, Landau EM (1995) Postsynaptic cAMP pathway gates early LTP in hippocampal CA1 region. *Neuron* 15:1403-1414.

- 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* 27:13436-13445.
- 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* 124:735-741.
- Boersma MC, Dresselhaus EC, De Biase LM, Mihalas AB, Bergles DE, Meffert MK (2011) A requirement for nuclear factor-kappaB in developmental and plasticity-associated synaptogenesis. *J Neurosci* 31:5414-5425.
- Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC (1998) Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett* 435:29-34.
- Borghaei RC, Rawlings PL, Jr., Javadi M, Woloshin J (2004) NF-kappaB binds to a polymorphic repressor element in the MMP-3 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 316:182-188.
- Bourne JN, Harris KM (2008) Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 31:47-67.
- Bourne J, Harris KM (2007) Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol* 17:381-386.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Bradley KC, Groth RD, Mermelstein PG (2005) Immunolocalization of NFATc4 in the adult mouse brain. *J Neurosci Res* 82:762-770.
- Carayol N, Chen J, Yang F, Jin T, Jin L, States D, Wang CY (2006) A dominant function of IKK/NF-kappaB signaling in global lipopolysaccharide-induced gene expression. *J Biol Chem* 281:31142-31151.
- Casolaro V, Georas SN, Song Z, Zubkoff ID, Abdulkadir SA, Thanos D, Ono SJ (1995) Inhibition of NF-AT-dependent transcription by NF-kappa B: implications for differential gene expression in T helper cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11623-11627.
- Castellucci V, Pinsker H, Kupfermann I, Kandel ER (1970) Neuronal mechanisms of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 167:1745-1748.
- Coghlan VM, Perrino BA, Howard M, Langeberg LK, Hicks JB, Gallatin WM, Scott JD (1995) Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science* 267:108-111.
- Colbran RJ (2004) Protein phosphatases and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci* 24:8404-8409.
- Crabtree GR, Olson EN (2002) NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl:S67-79.
- Czirjak G, Enyedi P (2006) Targeting of calcineurin to an NFAT-like docking site is required for the calcium-dependent activation of the background K<sup>+</sup> channel, TRESK. *J Biol Chem* 281:14677-14682.
- Chapleau CA, Calfa GD, Lane MC, Albertson AJ, Larimore JL, Kudo S, Armstrong DL, Percy AK, Pozzo-Miller L (2009) Dendritic spine pathologies in hippocampal pyramidal neurons from Rett syndrome brain and after expression of Rett-associated MECP2 mutations. *Neurobiol Dis* 35:219-233.
- Chen LF, Mu Y, Greene WC (2002) Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *EMBO J* 21:6539-6548.

- Chen L, Fischle W, Verdin E, Greene WC (2001) Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science* 293:1653-1657.
- Child FM, Epstein HT, Kuzirian AM, Alkon DL (2003) Memory reconsolidation in *Hermisenda*. *Biol Bull* 205:218-219.
- Davis HP, Squire LR (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 96:518-559.
- Dawson RG, McGaugh JL (1969) Electroconvulsive shock effects on a reactivated memory trace: further examination. *Science* 166:525-527.
- de Oliveira Alvares L, Pasqualini Genro B, Diehl F, Molina VA, Quillfeldt JA (2008) Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience* 154:1648-1655.
- Debiec J, LeDoux JE, Nader K (2002) Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36:527-538.
- Dineley KT, Hogan D, Zhang WR, Tagliavola G (2007) Acute inhibition of calcineurin restores associative learning and memory in Tg2576 APP transgenic mice. *Neurobiol Learn Mem* 88:217-224.
- Dong J, Jimi E, Zhong H, Hayden MS, Ghosh S (2008) Repression of gene expression by unphosphorylated NF-kappaB p65 through epigenetic mechanisms. *Genes Dev* 22:1159-1173.
- Dudai Y (2002a) Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol* 12:211-216.
- Dudai Y (2002b) *Memory from A to Z : keywords, concepts, and beyond*. Oxford, UK ; New York: Oxford University Press.
- Dudai Y (1996) Consolidation: fragility on the road to the engram. *Neuron* 17:367-370.
- Duncan CP (1949) The retroactive effect of electroshock on learning. *J Comp Physiol Psychol* 42:32-44.
- Duvarci S, Mamou CB, Nader K (2006) Extinction is not a sufficient condition to prevent fear memories from undergoing reconsolidation in the basolateral amygdala. *Eur J Neurosci* 24:249-260.
- Fanselow MS (2000) Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav Brain Res* 110:73-81.
- Federman N, de la Fuente V, Zalzman G, Onori A, Corbi N, Passananti C, Romano A (enviado) Object recognition memory persistence involves histone acetylation in hippocampus.
- Fernandez AM, Fernandez S, Carrero P, Garcia-Garcia M, Torres-Aleman I (2007) Calcineurin in reactive astrocytes plays a key role in the interplay between proinflammatory and anti-inflammatory signals. *J Neurosci* 27:8745-8756.
- Fischer A, Radulovic M, Schrick C, Sananbenesi F, Godovac-Zimmermann J, Radulovic J (2007) Hippocampal Mek/Erk signaling mediates extinction of contextual freezing behavior. *Neurobiol Learn Mem* 87:149-158.
- Fischer A, Sananbenesi F, Schrick C, Spiess J, Radulovic J (2004) Distinct roles of hippocampal de novo protein synthesis and actin rearrangement in extinction of contextual fear. *J Neurosci* 24:1962-1966.
- Forcato C, Rodriguez ML, Pedreira ME (2011) Repeated labilization-reconsolidation processes strengthen declarative memory in humans. *PLoS One* 6:e23305.
- Forcato C, Rodriguez ML, Pedreira ME, Maldonado H (2010) Reconsolidation in humans opens up declarative memory to the entrance of new information. *Neurobiol Learn Mem* 93:77-84.
- Franklin KBJ, Paxinos G (2001) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. London: Academic.

- Frantz B, Nordby EC, Bren G, Steffan N, Paya CV, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Keefe SJ, O'Neill EA (1994) Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I kappa B/MAD3, an inhibitor of NF-kappa B. *EMBO J* 13:861-870.
- 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* 21:2845-2852.
- Freudenthal R, Romano A, Routtenberg A (2004) Transcription factor NF-kappaB activation after in vivo perforant path LTP in mouse hippocampus. *Hippocampus* 14:677-683.
- Freudenthal R, Romano A (2000) Participation of Rel/NF-kappaB transcription factors in long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res* 855:274-281.
- 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* 242:143-146.
- Frey U, Frey S, Schollmeier F, Krug M (1996) Influence of actinomycin D, a RNA synthesis inhibitor, on long-term potentiation in rat hippocampal neurons in vivo and in vitro. *J Physiol* 490 ( Pt 3):703-711.
- Gan WB, Grutzendler J, Wong WT, Wong RO, Lichtman JW (2000) Multicolor "DiOlistic" labeling of the nervous system using lipophilic dye combinations. *Neuron* 27:219-225.
- Giachero M, Bustos SG, Molina VA (2011) Interaction between a consolidated fear memory and a stressful situation during reactivation is hippocampal BDNF dependent. En: XXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias, Huerta Grande, Córdoba, Argentina.
- Glowinski J, Iversen L (1966) Regional studies of catecholamines in the rat brain. 3. Subcellular distribution of endogenous and exogenous catecholamines in various brain regions. *Biochem Pharmacol* 15:977-987.
- Goelet P, Castellucci VF, Schacher S, Kandel ER (1986) The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* 322:419-422.
- Graef IA, Mermelstein PG, Stankunas K, Neilson JR, Deisseroth K, Tsien RW, Crabtree GR (1999) L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature* 401:703-708.
- Groth RD, Mermelstein PG (2007) NFAT-Dependent Gene Expression in the Nervous System: A Critical Mediator of Neurotrophin-Induced Plasticity. In: *Transcriptional regulation by neuronal activity : to the nucleus and back* (Dudek S, ed), pp xii, 425 p. New York: Springer.
- Groth RD, Coicou LG, Mermelstein PG, Seybold VS (2007) Neurotrophin activation of NFAT-dependent transcription contributes to the regulation of pro-nociceptive genes. *J Neurochem* 102:1162-1174.
- Groth RD, Mermelstein PG (2003) Brain-derived neurotrophic factor activation of NFAT (nuclear factor of activated T-cells)-dependent transcription: a role for the transcription factor NFATc4 in neurotrophin-mediated gene expression. *J Neurosci* 23:8125-8134.
- Guerrini L, Blasi F, Denis-Donini S (1995) Synaptic activation of NF-kappa B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9077-9081.
- Gutierrez H, O'Keefe GW, Gavalda N, Gallagher D, Davies AM (2008) Nuclear factor kappa B signaling either stimulates or inhibits neurite growth depending on the phosphorylation status of p65/RelA. *J Neurosci* 28:8246-8256.

- Havekes R, Nijholt IM, Visser AK, Eisel UL, Van der Zee EA (2008) Transgenic inhibition of neuronal calcineurin activity in the forebrain facilitates fear conditioning, but inhibits the extinction of contextual fear memories. *Neurobiol Learn Mem* 89:595-598.
- Heese K, Inoue N, Sawada T (2006) NF-kappaB regulates B-cell-derived nerve growth factor expression. *Cell Mol Immunol* 3:63-66.
- Hemenway CS, Heitman J (1999) Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochem Biophys* 30:115-151.
- Herry C, Ferraguti F, Singewald N, Letzkus JJ, Ehrlich I, Luthi A (2010) Neuronal circuits of fear extinction. *Eur J Neurosci* 31:599-612.
- Ho S, Timmerman L, Northrop J, Crabtree GR (1994) Cloning and characterization of NF-ATc and NF-ATp: the cytoplasmic components of NF-AT. *Adv Exp Med Biol* 365:167-173.
- Hoey T, Sun YL, Williamson K, Xu X (1995) Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity* 2:461-472.
- Hogan PG, Li H (2005) Calcineurin. *Curr Biol* 15:R442-443.
- Huang YY, Li XC, Kandel ER (1994) cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell* 79:69-79.
- Ikegami S, Inokuchi K (2000) Antisense DNA against calcineurin facilitates memory in contextual fear conditioning by lowering the threshold for hippocampal long-term potentiation induction. *Neuroscience* 98:637-646.
- Ikegami S, Kato A, Kudo Y, Kuno T, Ozawa F, Inokuchi K (1996) A facilitatory effect on the induction of long-term potentiation in vivo by chronic administration of antisense oligodeoxynucleotides against catalytic subunits of calcineurin. *Brain Res Mol Brain Res* 41:183-191.
- Ikura M, Osawa M, Ames JB (2002) The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: structure to function. *Bioessays* 24:625-636.
- Inda MC, Muravieva EV, Alberini CM (2011) Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *J Neurosci* 31:1635-1643.
- Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.). Committee on Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals. In: NIH publication, p v. Bethesda, Md.: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service.
- Isosaka T, Kida S, Kohno T, Hattori K, Yuasa S (2009) Hippocampal Fyn activity regulates extinction of contextual fear. *Neuroreport* 20:1461-1465.
- Jerusalinsky D, Quillfeldt JA, Walz R, Da Silva RC, Medina JH, Izquierdo I (1994) Post-training intrahippocampal infusion of protein kinase C inhibitors causes amnesia in rats. *Behav Neural Biol* 61:107-109.
- Kaltschmidt B, Ndiaye D, Korte M, Pothion S, Arbibe L, Prullage M, Pfeiffer J, Lindecke A, Staiger V, Israel A, Kaltschmidt C, Memet S (2006) NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Mol Cell Biol* 26:2936-2946.
- Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C (2005) Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1745:287-299.
- Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA (1993) Brain synapses contain inducible forms of the transcription factor NF-kappa B. *Mech Dev* 43:135-147.



- Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294:1030-1038.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) Principles of neural science, 4th Edition. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division.
- Katche C, Bekinschtein P, Slipczuk L, Goldin A, Izquierdo IA, Cammarota M, Medina JH (2010) Delayed wave of c-Fos expression in the dorsal hippocampus involved specifically in persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:349-354.
- 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* 23:5354-5360.
- Kepecs A, Uchida N, Zariwala HA, Mainen ZF (2008) Neural correlates, computation and behavioural impact of decision confidence. *Nature* 455:227-231.
- Kida S, Josselyn SA, Pena de Ortiz S, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, Silva AJ (2002) CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci* 5:348-355.
- Kim Y, Moon JS, Lee KS, Park SY, Cheong J, Kang HS, Lee HY, Kim HD (2004) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates the expression of iNOS through IKK and NF-kappaB activity in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages and RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 314:695-703.
- Kingsbury TJ, Bambrick LL, Roby CD, Krueger BK (2007) Calcineurin activity is required for depolarization-induced, CREB-dependent gene transcription in cortical neurons. *J Neurochem* 103:761-770.
- Klee CB, Draetta GF, Hubbard MJ (1988) Calcineurin. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 61:149-200.
- Klee CB, Crouch TH, Krinks MH (1979) Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:6270-6273.
- Knafo S, Ariav G, Barkai E, Libersat F (2004) Olfactory learning-induced increase in spine density along the apical dendrites of CA1 hippocampal neurons. *Hippocampus* 14:819-825.
- Kornhauser JM, Greenberg ME (1997) A kinase to remember: dual roles for MAP kinase in long-term memory. *Neuron* 18:839-842.
- Kupfermann I, Castellucci V, Pinsker H, Kandel E (1970) Neuronal correlates of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 167:1743-1745.
- Lamprecht R, LeDoux J (2004) Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci* 5:45-54.
- Lattal KM, Abel T (2004) Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4667-4672.
- Lattal KM, Abel T (2001) Different requirements for protein synthesis in acquisition and extinction of spatial preferences and context-evoked fear. *J Neurosci* 21:5773-5780.
- Lechner HA, Squire LR, Byrne JH (1999) 100 years of consolidation--remembering Muller and Pilzecker. *Learn Mem* 6:77-87.
- Ledgerwood L, Richardson R, Cranney J (2005) D-cycloserine facilitates extinction of learned fear: effects on reacquisition and generalized extinction. *Biol Psychiatry* 57:841-847.

- Ledgerwood L, Richardson R, Cranney J (2004) D-cycloserine and the facilitation of extinction of conditioned fear: consequences for reinstatement. *Behav Neurosci* 118:505-513.
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.
- Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, Bear MF, Huganir RL (2000) Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405:955-959.
- Lee JL (2010) Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Front Behav Neurosci* 4:168.
- Lee JL (2009) Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends Neurosci* 32:413-420.
- Lee JL (2008) Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci* 11:1264-1266.
- Lee JL, Milton AL, Everitt BJ (2006) Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *J Neurosci* 26:10051-10056.
- Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL (2004) Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304:839-843.
- Lee SH, Choi JH, Lee N, Lee HR, Kim JI, Yu NK, Choi SL, Kim H, Kaang BK (2008) Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science* 319:1253-1256.
- Leuner B, Falduo J, Shors TJ (2003) Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J Neurosci* 23:659-665.
- Levenson JM, Choi S, Lee SY, Cao YA, Ahn HJ, Worley KC, Pizzi M, Liou HC, Sweatt JD (2004) A bioinformatics analysis of memory consolidation reveals involvement of the transcription factor c-rel. *J Neurosci* 24:3933-3943.
- Lewis DJ (1979) Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol Bull* 86:1054-1083.
- Lewis DJ, Bregman NJ (1973) Source of cues for cue-dependent amnesia in rats. *J Comp Physiol Psychol* 85:421-426.
- Lewis DJ, Bregman NJ, Mahan JJ, Jr. (1972) Cue-dependent amnesia in rats. *J Comp Physiol Psychol* 81:243-247.
- Li H, Rao A, Hogan PG (2011) Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol* 21:91-103.
- Limback-Stokin K, Korzus E, Nagaoka-Yasuda R, Mayford M (2004) Nuclear calcium/calmodulin regulates memory consolidation. *J Neurosci* 24:10858-10867.
- Lin CH, Lee CC, Gean PW (2003a) Involvement of a calcineurin cascade in amygdala depotentiation and quenching of fear memory. *Mol Pharmacol* 63:44-52.
- Lin CH, Yeh SH, Lu HY, Gean PW (2003b) The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. *J Neurosci* 23:8310-8317.
- Lin CH, Yeh SH, Leu TH, Chang WC, Wang ST, Gean PW (2003c) Identification of calcineurin as a key signal in the extinction of fear memory. *J Neurosci* 23:1574-1579.
- Lisman J (1994) The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci* 17:406-412.
- Liu JL, Li M, Dang XR, Wang ZH, Rao ZR, Wu SX, Li YQ, Wang W (2009) A NMDA receptor antagonist, MK-801 impairs consolidating extinction of auditory conditioned fear responses in a Pavlovian model. *PLoS One* 4:e7548.

- Lubin FD, Sweatt JD (2007) The I $\kappa$ B kinase regulates chromatin structure during reconsolidation of conditioned fear memories. *Neuron* 55:942-957.
- Lubin FD, Ren Y, Xu X, Anderson AE (2007) Nuclear factor-kappa B regulates seizure threshold and gene transcription following convulsant stimulation. *J Neurochem* 103:1381-1395.
- Luoma JI, Zirpel L (2008) Deafferentation-induced activation of NFAT (nuclear factor of activated T-cells) in cochlear nucleus neurons during a developmental critical period: a role for NFATc4-dependent apoptosis in the CNS. *J Neurosci* 28:3159-3169.
- Mactutus CF, Riccio DC, Ferek JM (1979) Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. *Science* 204:1319-1320.
- Maldonado H (2008) *La memoria animal*. Buenos Aires: Eudeba.
- Malinow R, Schulman H, Tsien RW (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245:862-866.
- Malleret G, Haditsch U, Genoux D, Jones MW, Bliss TV, Vanhoose AM, Weitlauf C, Kandel ER, Winder DG, Mansuy IM (2001) Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* 104:675-686.
- Manahan-Vaughan D, Kulla A, Frey JU (2000) Requirement of translation but not transcription for the maintenance of long-term depression in the CA1 region of freely moving rats. *J Neurosci* 20:8572-8576.
- Manns JR, Eichenbaum H (2006) Evolution of declarative memory. *Hippocampus* 16:795-808.
- Mansuy IM, Mayford M, Jacob B, Kandel ER, Bach ME (1998) Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory. *Cell* 92:39-49.
- Maren S, Quirk GJ (2004) Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* 5:844-852.
- Maren S (2003) The amygdala, synaptic plasticity, and fear memory. *Ann N Y Acad Sci* 985:106-113.
- Marr D (1971) Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 262:23-81.
- Martinez-Martinez S, Rodriguez A, Lopez-Maderuelo MD, Ortega-Perez I, Vazquez J, Redondo JM (2006) Blockade of NFAT activation by the second calcineurin binding site. *J Biol Chem* 281:6227-6235.
- Mattson MP, Meffert MK (2006) Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ* 13:852-860.
- McGaugh JL (1966) Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153:1351-1358.
- McGaugh JL, Petrinovich LF (1966) Neural consolidation and electroconvulsive shock reexamined. *Psychol Rev* 73:382-387.
- Meberg PJ, Kinney WR, Valcourt EG, Routtenberg A (1996) Gene expression of the transcription factor NF-kappa B in hippocampus: regulation by synaptic activity. *Brain Res Mol Brain Res* 38:179-190.
- Medina JH, Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I (2008) Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behav Brain Res* 192:61-69.
- Meffert MK, Baltimore D (2005) Physiological functions for brain NF-kappaB. *Trends Neurosci* 28:37-43.

- Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D (2003) NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci* 6:1072-1078.
- Merlo E, Romano A (2008) Memory extinction entails the inhibition of the transcription factor NF-kappaB. *PLoS One* 3:e3687.
- 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* 12:23-29.
- Merlo E, Freudenthal R, Romano A (2002) The IkappaB kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience* 112:161-172.
- Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20:445-468.
- Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ (1968) Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 160:554-555.
- Montarolo PG, Goelet P, Castellucci VF, Morgan J, Kandel ER, Schacher S (1986) A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* 234:1249-1254.
- Morris RG, Inglis J, Ainge JA, Olverman HJ, Tulloch J, Dudai Y, Kelly PA (2006) Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron* 50:479-489.
- Moser MB, Moser EI (1998) Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8:608-619.
- Moser MB, Trommald M, Andersen P (1994) An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12673-12675.
- Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC (1994) Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* 369:486-488.
- Muller D, Joly M, Lynch G (1988) Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science* 242:1694-1697.
- Myers KM, Davis M (2007) Mechanisms of fear extinction. *Mol Psychiatry* 12:120-150.
- Myers KM, Ressler KJ, Davis M (2006) Different mechanisms of fear extinction dependent on length of time since fear acquisition. *Learn Mem* 13:216-223.
- Myers KM, Davis M (2002) Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* 36:567-584.
- Nader K (2003) Memory traces unbound. *Trends Neurosci* 26:65-72.
- Nader K, Schafe GE, LeDoux JE (2000a) The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci* 1:216-219.
- Nader K, Schafe GE, LeDoux JE (2000b) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722-726.
- Northrop JP, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmerman LA, Nolan GP, Admon A, Crabtree GR (1994) NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* 369:497-502.
- O'Keefe J (1978) Anatomy. In: *The hippocampus as a cognitive map* (O'Keefe J, Nadel L, eds), pp xiv, 570 p. Oxford New York: Clarendon Press ; Oxford University Press.

- O'Neill LA, Kaltschmidt C (1997) NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 20:252-258.
- Oberheim NA, Tian GF, Han X, Peng W, Takano T, Ransom B, Nedergaard M (2008) Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *J Neurosci* 28:3264-3276.
- Oliveria SF, Dell'Acqua ML, Sather WA (2007) AKAP79/150 anchoring of calcineurin controls neuronal L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity and nuclear signaling. *Neuron* 55:261-275.
- Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC (2006) Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 313:1141-1144.
- Pedreira ME, Perez-Cuesta LM, Maldonado H (2004) Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction. *Learn Mem* 11:579-585.
- Pedreira ME, Maldonado H (2003) Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* 38:863-869.
- Pedreira ME, Perez-Cuesta LM, Maldonado H (2002) Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *J Neurosci* 22:8305-8311.
- 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* 54:611-617.
- Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274-285.
- Plosker GL, Croom KF (2005) Sulfasalazine: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs* 65:1825-1849.
- Pons S, Torres-Aleman I (2000) Insulin-like growth factor-I stimulates dephosphorylation of ikappa B through the serine phosphatase calcineurin (protein phosphatase 2B). *J Biol Chem* 275:38620-38625.
- Przybylski J, Roulet P, Sara SJ (1999) Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J Neurosci* 19:6623-6628.
- Przybylski J, Sara SJ (1997) Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* 84:241-246.
- Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kiyin M, Tsien JZ (2000) Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 3:238-244.
- Rescorla RA (1988) Pavlovian conditioning. It's not what you think it is. *Am Psychol* 43:151-160.
- Restivo L, Vetere G, Bontempi B, Ammassari-Teule M (2009) The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *J Neurosci* 29:8206-8214.
- Richardson R, Riccio DC, Molenda S (1982) Reducing vulnerability to retrograde amnesia treatment: can new memory be deactivated? *Physiol Behav* 29:1117-1123.
- Romano A (2012) NF-kB transcription factor: a model for the study of transcription regulation in memory consolidation, reconsolidation and extinction. In:

- Transcription Factor Regulation of Synaptic Plasticity and Memory Encoding (Albensi BC, ed). NY: Bentham Science Publishers.
- Romano A, Freudenthal R, Merlo E, Routtenberg A (2006a) Evolutionarily-conserved role of the NF-kappaB transcription factor in neural plasticity and memory. *Eur J Neurosci* 24:1507-1516.
- Romano A, Locatelli F, Freudenthal R, Merlo E, Feld M, Ariel P, Lemos D, Federman N, Fustinana MS (2006b) Lessons from a crab: molecular mechanisms in different memory phases of *Chasmagnathus*. *Biol Bull* 210:280-288.
- Rusnak F, Mertz P (2000) Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80:1483-1521.
- Russo SJ *et al.* (2009) Nuclear factor kappa B signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward. *J Neurosci* 29:3529-3537.
- Sananbenesi F, Fischer A, Wang X, Schrick C, Neve R, Radulovic J, Tsai LH (2007) A hippocampal Cdk5 pathway regulates extinction of contextual fear. *Nat Neurosci* 10:1012-1019.
- Santini E, Muller RU, Quirk GJ (2001) Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *J Neurosci* 21:9009-9017.
- Sara SJ (2000) Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* 7:73-84.
- Sheridan CM, Heist EK, Beals CR, Crabtree GR, Gardner P (2002) Protein kinase A negatively modulates the nuclear accumulation of NF-ATc1 by priming for subsequent phosphorylation by glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 277:48664-48676.
- Shibasaki F, Hallin U, Uchino H (2002) Calcineurin as a multifunctional regulator. *J Biochem* 131:1-15.
- Shibasaki F, Price ER, Milan D, McKeon F (1996) Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* 382:370-373.
- Simpson CS, Morris BJ (2000) Regulation of neuronal cell adhesion molecule expression by NF-kappa B. *J Biol Chem* 275:16879-16884.
- Smith KE, Gibson ES, Dell'Acqua ML (2006) cAMP-dependent protein kinase postsynaptic localization regulated by NMDA receptor activation through translocation of an A-kinase anchoring protein scaffold protein. *J Neurosci* 26:2391-2402.
- Sotres-Bayon F, Quirk GJ (2010) Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Curr Opin Neurobiol* 20:231-235.
- Stanton PK, Sarvey JM (1984) Blockade of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 region by inhibitors of protein synthesis. *J Neurosci* 4:3080-3088.
- Sugiura R, Sio SO, Shuntoh H, Kuno T (2001) Molecular genetic analysis of the calcineurin signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* 58:278-288.
- 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* 24:4787-4795.
- Suzuki T, Mitake S, Okumura-Noji K, Yang JP, Fujii T, Okamoto T (1997) Presence of NF-kappaB-like and IkappaB-like immunoreactivities in postsynaptic densities. *Neuroreport* 8:2931-2935.
- Sweatt JD (2003) *Mechanisms of memory*. San Diego, Calif.: Academic Press.
- Takaishi T, Saito N, Kuno T, Tanaka C (1991) Differential distribution of the mRNA encoding two isoforms of the catalytic subunit of calcineurin in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 174:393-398.

- Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM (2001) The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci* 4:813-818.
- Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D (1999) LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402:421-425.
- Tronel S, Sara SJ (2002) Mapping of olfactory memory circuits: region-specific c-fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval. *Learn Mem* 9:105-111.
- Tulving E (1987) Multiple memory systems and consciousness. *Hum Neurobiol* 6:67-80.
- Vashishta A, Habas A, Pruunsild P, Zheng JJ, Timmusk T, Hetman M (2009) Nuclear factor of activated T-cells isoform c4 (NFATc4/NFAT3) as a mediator of antiapoptotic transcription in NMDA receptor-stimulated cortical neurons. *J Neurosci* 29:15331-15340.
- Vianna MR, Igaz LM, Coitinho AS, Medina JH, Izquierdo I (2003) Memory extinction requires gene expression in rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 79:199-203.
- Vianna MR, Szapiro G, McGaugh JL, Medina JH, Izquierdo I (2001) Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12251-12254.
- Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM (1998) Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 101:1163-1174.
- Weber CK, Liptay S, Wirth T, Adler G, Schmid RM (2000) Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of IkappaB kinases alpha and beta. *Gastroenterology* 119:1209-1218.
- Wehner JM, Radcliffe RA (2004) Cued and contextual fear conditioning in mice. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8:Unit 8 5C.
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313:1093-1097.
- Wiltgen BJ, Sanders MJ, Ferguson C, Homanics GE, Fanselow MS (2005) Trace fear conditioning is enhanced in mice lacking the delta subunit of the GABAA receptor. *Learn Mem* 12:327-333.
- Winder DG, Sweatt JD (2001) Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2:461-474.
- Winder DG, Mansuy IM, Osman M, Moallem TM, Kandel ER (1998) Genetic and pharmacological evidence for a novel, intermediate phase of long-term potentiation suppressed by calcineurin. *Cell* 92:25-37.
- Xu T, Yu X, Perlik AJ, Tobin WF, Zweig JA, Tennant K, Jones T, Zuo Y (2009) Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature* 462:915-919.
- Yakel JL (1997) Calcineurin regulation of synaptic function: from ion channels to transmitter release and gene transcription. *Trends Pharmacol Sci* 18:124-134.
- Yang G, Pan F, Gan WB (2009) Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature* 462:920-924.
- Yeh SH, Lin CH, Lee CF, Gean PW (2002) A requirement of nuclear factor-kappaB activation in fear-potentiated startle. *J Biol Chem* 277:46720-46729.
- Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S (2002) The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell* 9:625-636.

- Zhong H, Voll RE, Ghosh S (1998) Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* 1:661-671.
- Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S (1997) The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* 89:413-424.
- Zhou Q, Homma KJ, Poo MM (2004) Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44:749-757.