

Tesis Doctoral

# Análisis comparativo de mecanismos de plasticidad neuronal involucrados en la labilización y reconsolidación de la memoria

Fustiñana, María Sol

2013

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:

Fustiñana, María Sol. (2013). Análisis comparativo de mecanismos de plasticidad neuronal involucrados en la labilización y reconsolidación de la memoria. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Fustiñana, María Sol. "Análisis comparativo de mecanismos de plasticidad neuronal involucrados en la labilización y reconsolidación de la memoria". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

**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

**Análisis comparativo de mecanismos de plasticidad neuronal involucrados en la labilización y reconsolidación de la memoria**

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

Lic. María Sol Fustiñana

Director de Tesis: Dr. Arturo Romano

Director Asistente de Tesis: Dr. Ramiro Freudenthal

Consejero de estudios: Dra. Lidia Szczupak

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, 2013

# **Análisis comparativo de mecanismos de plasticidad neuronal involucrados en la labilización y reconsolidación de la memoria**

## RESUMEN

Una vez que la memoria de largo término es almacenada mediante el proceso de consolidación, la presentación de un recordatorio, tal como claves contextuales presentes durante el aprendizaje, puede desencadenar un proceso de labilización y reconsolidación. La labilización-reconsolidación de la memoria posee procesos que le son inherentes: reactivación, labilización y reestabilización de la traza mnésica. Si cualquiera de ellos es interrumpido, el proceso completo no tendrá lugar. La determinación de los mecanismos moleculares que subyacen a cada proceso es uno de los temas de intenso estudio y debate en este momento en el campo de la neurobiología de la memoria.

La primera parte de esta Tesis consistió en la puesta a punto de un nuevo protocolo de condicionamiento pavloviano contextual (CPC) en el cangrejo *Neohelice granulata*. Esto nos permitió realizar posteriormente estudios comparativos con otro paradigma de condicionamiento contextual en el ratón, *Mus musculus*. De esta manera, obtuvimos evidencias que indican que el cangrejo *Neohelice granulata* establece una asociación entre un contexto (estímulo condicionado, EC) y un estímulo aversivo (estímulo incondicionado, EI). El EC está compuesto por las características del contexto (iluminación, textura, color, patrón, etc.) y el EI es un estímulo visual de peligro.

Al inhibir la vía de señalización del factor de transcripción NF- $\kappa$ B encontramos que tanto la consolidación como la reconsolidación de la memoria se ven impedidas. Este efecto permitió el estudio de las características del recordatorio capaces de desencadenar la labilización-reconsolidación de la memoria. Observamos que el proceso de labilización-

reconsolidación es desencadenado únicamente ante la presentación específica del estímulo condicionado.

Posteriormente realizamos un estudio comparativo entre el CPC en cangrejos y el condicionamiento de miedo contextual en el ratón. Estudiamos mecanismos moleculares que subyacen a la labilización de la memoria, encontrando que la degradación de proteínas a través del sistema de ubiquitina-proteasoma juega un rol importante en la labilización tanto en cangrejos como en ratones.

Finalmente, pudimos determinar que una de las funciones que puede cumplir el proceso de reconsolidación está vinculada al reforzamiento de la memoria. Este fenómeno de reforzamiento ocurre en el CPC de *Neohelice*, mientras que no fue encontrado en el condicionamiento de miedo contextual en el ratón.

**Palabras clave:** Condicionamiento contextual, labilización, reconsolidación, NF- $\kappa$ B, proteasoma.

## **Comparative analysis of neural plasticity mechanisms involved in memory labilization and reconsolidation**

### ABSTRACT

After a long-term memory is stored through the memory consolidation process, the occurrence of a reminder, such as contextual cues present during learning, can trigger the labilization-reconsolidation process. Memory labilization-reconsolidation requires inherent steps: reactivation, labilization and stabilization of the memory trace. If any of these steps is interrupted, the entire process can not take place. Currently, the identification of the molecular mechanisms underlying each step is a topic of intense study and debate in the learning and memory field.

A new contextual pavlovian conditioning (CPC) protocol was developed for the *Neohélice granulata* crab in the first stage of this Thesis. This protocol allowed us to perform a comparative study with contextual conditioning in the *Mus musculus* mouse. We found that *Neohélice* can associate a specific environment (the conditioned stimulus, CS) with an aversive unconditioned stimulus (US). The CS is composed by the contextual cues (including illumination, texture, color, patterns, etc.) while the US is a visual danger stimulus.

We found that the inhibition of the NF- $\kappa$ B transcription factor pathway leads to the absence of both, consolidation and reconsolidation of this new CPC paradigm. This allowed us to study which features of the reminder are able to trigger memory labilization. We found that the labilization-reconsolidation process is triggered specifically and only by the presentation of the CS.

After the characterization of the CPC in the crab, we performed a comparative study between this contextual associative memory in crabs and the contextual fear conditioning in mice. We studied molecular mechanisms

underlying memory labilization finding that the ubiquitin-proteasome system plays a key role during labilization in both, crabs and mice.

Finally, we found that reconsolidation could may play a role in the memory reinforcement process, a role that we found in the CPC in crabs but not in the contextual conditioning in mice.

**Key words:** Contextual conditioning, labilization, reconsolidation, NF- $\kappa$ B, proteasome,

## AGRADECIMIENTOS

Estuve muchos años en el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria. En esta sección voy a hacer un intento de agradecimiento de lo que todas estas personas significaron para mi aunque dudo que todas mis palabras sean suficientes.

A la Universidad de Buenos Aires por permitirme perfeccionarme en mi profesión de manera libre, laica y gratuita

Agradezco infinitamente a Artur. Por ser mi maestro. Por haberme brindado un espacio para poder crecer. Por su increíble paciencia, por las discusiones, por respetar y considerar mis opiniones. Por comprender los momentos de frustración y ayudarme a salir de ellos. Por aconsejarme. Por enseñarme que un buen resultado es una gran satisfacción, por festejarla conmigo.

A Rami, por enseñarme con paciencia a trabajar con radiactivo de manera cuidadosa pero eficiente. Por estar siempre dispuesto a dar una mano. Por haberme permitido compartir lo que creo que representó un aprendizaje para los dos. Por las aventuras compartidas fuera del ámbito científico. Por haberme cuidado.

Agradezco a Hector por haber fundado este increíble laboratorio que después de 30 años sigue inundado de duendes. Lamento que no haya podido ver los resultados de esta Tesis que habrían confirmado su anticipada convicción de la respuesta anticipatoria.

A Lidia, por haberme aconsejado no sólo en los estudios. Por haberme dado un espacio único en la docencia.

A Gaby por haber puesto su ojo crítico en la lectura de este manuscrito. Por compartir amistades y vacíos.

A Vero, Noe por la inmensa paciencia al enseñarme y ayudarme a trabajar con ratones, con la psicología que eso implicó. Porque, junto con Gise, hicieron que los NotiBioter fueran divertidos.

A Marian, por compartir sus dudas científicas conmigo y valorar mi opinión. Por ser mi compañera de aventuras descabelladas laboratoriles.

A mis amigas del alma, aunque ya no estemos todas juntas siempre van a estar en mi corazón. Estas mujeres científicas que no se rinden, que son un ejemplo a seguir. Porque siempre me abrazaron cuando había que celebrar y cuando no me dejaron caer. A Gaby, Mache, Marian, Noe, Vero, gracias!

A Anita y Lau, en este último tiempo fueron una parte esencial de mi vida.

A Angel, por socorrerme cada vez que lo necesité dentro y fuera del laboratorio. Por enseñarme a disfrutar aún de las cosas más simples.

A Martín, por los maravillosos momentos compartidos en la ciencia y fuera de ella.

A Tincho, por estar siempre dispuesto a compartir su conocimiento conmigo. Por su solidaridad. Por confiar en mí.

A Euge, por las conversaciones científicas y personales. Por recordarme siempre las cosas positivas y no dejarme sucumbir en las negativas.

A Daniel por las charlas del último tiempo que me sirvieron para tomar decisiones sobre el rumbo de mi vida académica.

Agradezco a Amaicha, por los consejos, la confianza. Por ser una gran amiga.

A Martincito, por escucharme, por compartir las risas, por preguntarme siempre si necesito algo.

A Kary, Vero C y Luis S por venir a charlar conmigo a los pasillos del bioterio y las cervecitas en deportes.

Agradezco a todos los que fueron y vinieron en el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria (incluido el arco de enfrente) durante mi doctorado por haber generado un ámbito donde se puede hacer ciencia y disfrutar al mismo tiempo. Por los viajes de pesca, los cheese and wine, los días de tortas. Gracias por venir conmigo hasta acá.

Agradezco a mi otro ámbito, las chicas de flamenco. Por compartir su energía conmigo y dejarme zapatear a su lado; descarga fundamental.

A mis abuelas, porque es con ellas cuando comenzó mi historia.

A mi papá y Silvia por el cariño, por apoyarme siempre, por ayudarme en todo. Por confiar en mí.

A mi hermana, por su incondicionalidad. Por agarrarme firme de la mano para ayudarme a cruzar cada momento desde que era chiquita.

A mi mamá, porque habría sido impensable transitar este camino sin ella. Por haberme dado todo su amor. Por ser la madre que siempre hubiera querido tener.



Al Flaco, por haberme devuelto al mundo de los vivos, por ayudarme a disfrutar esta última etapa de mi Tesis. Por haberme dejado amarlo y entrar en su vida aún con fecha de vencimiento. A sus hijas, Zina y Nurit por haber llenado de alegría mi vida.

A todos los que de alguna manera contribuyeron a que yo llegara hasta acá,  
Gracias!

## PUBLICACIONES

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

### **CONTEXTUAL PAVLOVIAN CONDITIONING IN THE CRAB CHASMAGNATHUS**

Fustiñana MS, Carbó Tano M, Romano A, Pedreira ME.

Anim. Cogn. 2013 Mar;16(2):255-72. doi: 10.1007/s10071-012-0570-2. Epub 2012 Nov 1.

### **PROTEIN DEGRADATION BY UBIQUITIN-PROTEASOME SYSTEM IN MEMORY FORMATION AND LABILIZATION**

María Sol Fustiñana, Verónica de la Fuente, Noel Federman, Ramiro Freudenthal and Arturo Romano. Manuscrito enviado a publicación.

## INDICE

Abreviaturas	13
<b>Capítulo I – Introducción</b>	<b>17</b>
I.1 APRENDIZAJE Y MEMORIA	17
I.2 CATEGORÍAS DE LA MEMORIA Y DISTINTOS TIPOS DE APRENDIZAJE	19
I.3 MODELOS EXPERIMENTALES	22
I.3.1 Memoria contexto-senal en cangrejo <i>Neohelice granulata</i>	22
I.3.2 Condicionamiento de miedo en ratón	23
I.4 FASES DE LA MEMORIA	25
I.4.1 Consolidación	25
I.4.2 Reconsolidación	27
I.4.3 Extinción	29
I.5 BASES CELULARES Y MOLECULARES DE LA MEMORIA	31
I.5.1 Memoria de largo termino y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B	33
I.5.2 Memoria de largo termino y degradación de proteínas	34
OBJETIVOS E HIPOTESIS	35
<b>Capítulo II – Materiales y Métodos</b>	<b>38</b>
II.1 <i>Neohelice granulata</i>	38
II.1.1 Sujetos experimentales	38
II.1.2 Dispositivo experimental	40
II.1.3 Procedimiento experimental	41
II.1.4 Grupos experimentales	41
II.1.5 Análisis estadístico	43

II.2 <i>Mus musculus</i>	44
II.2.1 Sujetos experimentales	44
II.2.2 Condicionamiento al miedo	45
II.2.3 Análisis estadístico	47
II.2.4 Cirugía e infusión de drogas	48
II.3 Drogas	50
<b>Capítulo III - Desarrollo de una tarea de condicionamiento contextual en <i>Neohelice granulata</i></b>	<b>52</b>
III.1 INTRODUCCIÓN	52
III.2 RESULTADOS	55
III.2.1 El entrenamiento de condicionamiento pavloviano induce una robusta retención de la memoria.	55
III.2.2 El entrenamiento de condicionamiento pavloviano induce una asociación específica entre el contexto y el estímulo visual de peligro	57
III.2.3 Importancia de la relación temporal entre estímulos en el condicionamiento contextual	58
III.2.4 La tarea de condicionamiento desarrollada es una asociación contextual y no una asociación de clave	60
III.2.5 El proceso de extinción en la memoria de condicionamiento pavloviano	62
III.2.6 Dependencia de la síntesis de proteínas en la consolidación de la memoria de condicionamiento pavloviano.	63
III.2.7 Un antagonista del receptor GABAA facilita la consolidación de la memoria de condicionamiento pavloviano	64
III.2.8 El condicionamiento pavloviano induce una respuesta	65

anticipatoria	
III.2.9 La respuesta anticipatoria de la memoria de corto término es expresada en períodos mayores a 2hs	66
III.3 DISCUSIÓN	67
<b>Capítulo IV- El papel de NF-<math>\kappa</math>B en la memoria de condicionamiento pavloviano contextual en <i>Neohelice</i></b>	<b>71</b>
IV.1 INTRODUCCIÓN	71
IV.2 RESULTADOS	74
IV.2.1 Efecto de la inhibición de NF- $\kappa$ B durante la consolidación de la memoria de condicionamiento contextual en <i>Neohelice</i>	74
IV.2.2 Efecto de la inhibición de NF- $\kappa$ B durante la reconsolidación de la memoria en el paradigma del cangrejo	75
IV.2.3 ¿Qué características debe cumplir el recordatorio para que labilice la memoria?	76
IV.3 DISCUSIÓN	78
<b>Capítulo V - Efecto paradójico de la inhibición del proteasoma en la consolidación y reconsolidación de la memoria</b>	<b>80</b>
V.1 INTRODUCCIÓN	80
V.2 RESULTADOS	84
V.2.1 Rol del proteasoma en la consolidación de la memoria en el condicionamiento pavloviano contextual	84
V.2.2 Aparece la paradoja – Rol del proteasoma durante la Reconsolidación de la memoria	86
V.2.3 Rol del proteasoma durante la evocación de la memoria	87
V.2.4 La inhibición del proteasoma impide el efecto amnésico	88

de la sulfasalazina	
V.2.5 Efecto del cóctel M132G/SSZ en consolidación	89
V.2.6 La inhibición del proteasoma en la fase de reconsolidación impide el efecto de otras drogas sobre la memoria	90
V.2.7 Rol del proteasoma en la consolidación de la memoria en el condicionamiento de miedo en ratones	92
V.2.8 La inhibición del UPS en el hipocampo de ratón durante la reconsolidación bloquea el efecto amnésico de la sulfasalazina sobre memorias de miedo	94
V.2.9 La inhibición del UPS en el hipocampo de ratón durante la reconsolidación bloquea el efecto facilitador del FK sobre memorias de miedo	95
V.3 DISCUSIÓN	97
<b>Capítulo VI - Posible papel de la labilización-reconsolidación en el fortalecimiento de la memoria</b>	<b>100</b>
VI.1INTRODUCCIÓN	100
VI.2RESULTADOS	103
VI.2.1 Efecto sobre la memoria del CPC de tres reexposiciones al contexto de entrenamiento en días sucesivos	103
VI.2.2 Efecto sobre la memoria del CPC de tres reexposiciones sucesivas en un mismo día	104
VI.2.3 Efecto de tres reexposiciones al contexto de entrenamiento sobre la memoria de miedo contextual en el ratón	105
VI.3 DISCUSIÓN	106
<b>Capítulo VII – Discusión general</b>	<b>109</b>

VII.1 El nuevo paradigma	109
VII.2 El factor de transcripción NF- $\kappa$ B	111
VII.3 El Recordatorio	111
VII.4 El sistema ubiquitina proteasoma	112
VII.5 Fortalecimiento	115
<b>Conclusiones generales</b>	<b>117</b>
<b>Referencias</b>	<b>119</b>

## ABREVIATURAS

APP:	Proteína precursora de amiloide, del inglés <i>amyloid precursor protein</i> .
BDNF:	Factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés <i>brain derived neurotrophic factor</i>
BIC:	Bicuculina
CaN:	Calcineurina (=PP2B)
CHX:	Cicloheximida
CPC:	Condicionamiento pavloviano contextual
CT:	Grupo control
DMSO:	Dimetilsulfóxido
EC:	Estímulo condicionado
EI:	Estímulo incondicionado
EN:	Grupo entrenado
EVP:	Estímulo visual de peligro
FK:	FK506
IEE:	Intervalo entre EVPs
IKK:	Quinasa de IκB
IKK:	Quinasa de IκB
IκB:	Proteína inhibitoria κB
LTD:	Depresión de largo término, del inglés <i>long term depression</i>
LTF:	Facilitación de largo término, del inglés <i>long term facilitation</i>
LTP:	Potenciación de largo término, del inglés <i>long term potentiation</i>
MCT:	Memoria de corto término
MG:	MG132
MK:	MK801
MLT:	Memoria de largo término
NF-κB:	Factor nuclear kappaB, del inglés <i>nuclear factor kappaB</i>



NGF: Factor de crecimiento nervioso, del inglés *nerve growth factor*

PKA: Proteína quinasa dependiente de AMPc, del inglés *cAMP dependent protein kinase*

RC: Respuesta condicionada

SSZ: Sulfasalazina

UPS: Sistema ubiquitin-proteasoma, del inglés *ubiquitin proteasome system*

VHC: Vehículo

ZIF 268: Factor inducible "dedos de zinc", del inglés *zinc finger inducing factor 268*

# Capítulo I

## **Introducción General**

## Introducción General

### I.1. APRENDIZAJE Y MEMORIA

Los dioses le pidieron a Zeus que creara divinidades capaces de cantar el nuevo orden establecido en el Universo. Disfrazado de pastor, Zeus se unió durante nueve noches consecutivas con Mnemosine, hija de Gea y Urano, hermana de Kronos y Okeanos. Mnemosine, personificación de la memoria, "sabe todo lo que ha sido, es y será "; posee el conocimiento de los orígenes y de las raíces, poder que traspasa los límites del más allá. En Lebadea, ciudad de Beocia, existía una fuente con su nombre, de donde tenían que beber los asistentes al oráculo de Trofonio para tener acceso a la revelación. En las regiones infernales, en el oscuro reino de Hades, existía también una fuente de Mnemosine, a la que se le oponía la de Lete, el río del olvido, del que bebían los difuntos para olvidar su vida terrena. Para los griegos, los muertos son aquellos que han perdido la memoria. Para ellos la *memoria* parece haber sido considerada una herramienta muy importante para defender la verdad, para defendernos a nosotros mismos.

Más allá de la mitología y de las creencias culturales y religiosas, la memoria es un importante tema de interés científico,

Una característica universal de los animales es la capacidad de formar representaciones internas del medio exterior mediante experiencias sensoriales. En este proceso de conocimiento, los individuos aprenden acerca de la presencia y de las relaciones existentes entre los distintos estímulos que los rodean. Esta capacidad cognitiva permite a los animales hacer predicciones acerca de estos estímulos y de relaciones de contingencia entre estímulos, lo que les provee de grandes ventajas, dado que pueden producir cambios adaptativos en el comportamiento. La pregunta que surge entonces es, ¿cuáles son los procesos que conducen a esas relaciones de contingencia?

(Rescorla 1972, Dickinson 1980, Mackintosh 1975, Pearce y Hall 1980).

El aprendizaje y la memoria son mecanismos claves a través de los cuales el comportamiento de un animal puede ser modelado como producto de la propia experiencia y a partir de la interacción con el medio ambiente. De esta manera, la comprensión sobre dónde se almacena la memoria, cómo se recuerda y cómo se olvida han sido de gran interés para la humanidad y en particular para las neurociencias. Durante el transcurso de esta Tesis intentamos abordar algunos aspectos acerca de este tema tan complejo con la intención de contribuir a encontrar respuestas a estas preguntas.

Como en cualquier disciplina, es necesario definir determinados conceptos. En este caso es indispensable definir *Memoria* dado que para la ciencia ha dejado de ser una diosa o una propiedad abstracta del alma o de la mente y por tanto puede ser estudiada y comprendida, al menos desde el punto de vista neurobiológico.

Dado que la memoria es generada por el aprendizaje, primero debemos definir este concepto desde el punto de vista neurobiológico. *El aprendizaje es el proceso o acto que produce un cambio en el comportamiento debido a una experiencia comportamental (sensorial, motora, emocional)* (Maldonado 2008). Ahora sabemos que estos cambios no son propiedades del alma sino que ocurren a nivel cerebral y actualmente se conocen ejemplos de circuitos neuronales que codifican aprendizajes específicos. La capacidad de cambiar las propiedades reactivas de las neuronas como resultado de una activación previa es lo que se llama *plasticidad neuronal* (Konorski 1948). Podemos definir entonces a *la memoria como una representación interna de una experiencia comportamental codificada espacio-temporalmente en circuitos neuronales mediante cambios en las propiedades reactivas de las neuronas que puede guiar el comportamiento* (Kandel et al., 2000; Dudai, 2002b; Dudai, 2002a). Sin embargo, es importante aclarar que no toda plasticidad neuronal implica un proceso de memoria ya que hay plasticidad en el desarrollo del sistema nervioso, en la regeneración, etc. Existen también aquellas memorias innatas, codificadas genéticamente y establecidas en el desarrollo, es decir no

adquiridas mediante un aprendizaje (Dudai, 2002b).

En la naturaleza, las presiones de selección actúan sobre distintas características del individuo. El comportamiento y la memoria no son una excepción y, como ocurre con otras características fenotípicas de los individuos, la evolución también puede operar sobre estos. Poder modificar el comportamiento para poder predecir acontecimientos futuros con un alto grado de certeza, parece resultar altamente adaptativo para cualquier organismo. La manera que tiene un animal para establecer estas predicciones es almacenar la información referente al pasado, procesarla e integrarla a la información previa y utilizarla como predictiva en circunstancias similares, es decir, formar memorias.

Para el estudio de la memoria y sus mecanismos biológicos, se utiliza una gran variedad de modelos animales, desde insectos y crustáceos hasta roedores y primates. En todos ellos, típicamente, se somete a los individuos a una sesión de entrenamiento en la que estos aprenden una tarea que produce un cambio en el comportamiento. Pasado cierto tiempo, se evalúa comportamentalmente si los animales retienen la memoria adquirida en el entrenamiento. Durante este intervalo entre la adquisición y la evaluación de la memoria, distintas intervenciones y tratamientos pueden poner de manifiesto los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la adquisición, el almacenamiento y la evocación de la memoria.

## I.2. CATEGORÍAS DE LA MEMORIA Y DISTINTOS TIPOS DE APRENDIZAJE

El estudio de la memoria constituye un gran desafío por la complejidad del fenómeno y por los distintos niveles de análisis que implica. Estudios clínicos en pacientes con déficit mnésicos y gran cantidad de estudios en modelos de aprendizaje experimentales han permitido distinguir dos tipos básicos de memoria: la memoria *explícita o declarativa* y la memoria *implícita o de procedimiento*. La primera (explícita) es el tipo de memoria autobiográfica,

semántica y de hechos factuales, que en humanos puede ser evocada mediante un acto deliberado. Por lo general no requiere de la repetición de los estímulos o de la experiencia para establecerse. La segunda (implícita) en cambio, abarca reflejos, habilidades motoras y habilidades perceptuales. Normalmente se fija a lo largo de numerosas repeticiones y no requiere de una evocación deliberada (Squire, 1987 y 2004).

La memoria *implícita* comprende formas de aprendizaje según las características y modalidades de la experiencia comportamental que pueden ser o no asociativos. El aprendizaje no asociativo consiste en la percepción de los distintos estímulos del medio y sus características y abarcan a la sensibilización y a la habituación, en las que el animal aprende las propiedades de un único estímulo. La sensibilización es un aumento en la respuesta a una amplia variedad de estímulos luego de la exposición a uno inicial, intenso o nocivo. En términos generales, es posible definirla como un aumento inespecífico de la tendencia a responder. La habituación, en cambio, es el decremento de la respuesta ante la presentación reiterada del estímulo que la desencadena. Para poder caracterizar un decremento de la respuesta como la habituación es necesario descartar los fenómenos de fatiga motora y adaptación sensorial. Al contrario de la sensibilización, la habituación es estímulo-específica. La capacidad habituante de un estímulo es inversamente proporcional a su nocividad.

El aprendizaje asociativo, en cambio, consiste en el establecimiento de relaciones, o asociaciones, entre estos estímulos, lo que permite al individuo formular predicciones. Éste es el principio básico del condicionamiento, un fenómeno cognitivo descrito por primera vez en 1927, por Ivan Pavlov. En sus clásicos experimentos con perros, Pavlov observó que si se presentaba al individuo, en forma repetida, un estímulo emocionalmente neutro (el timbre) seguido inmediatamente de otro estímulo emocionalmente relevante (alimento), se producía una asociación entre ambos estímulos de modo que el primero pasaba a tener un valor predictivo, anticipatorio, del segundo. Es decir, el individuo aprendía una relación de contingencia entre ambos

estímulos que se evidenciaba porque al presentar sólo el primer estímulo, denominado estímulo condicionado (EC) comenzaba a producirse en el animal una respuesta comportamental (salivación) que hasta entonces sólo era desencadenada por el segundo estímulo, el estímulo incondicionado (EI). De este modo, lo que antes era una respuesta incondicionada, es decir, producida siempre por el EI, se convierte en una respuesta condicionada: una respuesta producida por el EC, sólo después de que la asociación fue establecida. Este tipo de condicionamiento se denomina clásico o pavloviano y representa un ejemplo de cómo los animales aprendemos las relaciones existentes entre los estímulos que nos rodean.

En 1957, Burrhus Skinner describió un tipo de condicionamiento cualitativamente distinto, en el que el individuo; en lugar de aprender que el EC predice la llegada del EI, aprende que él mismo debe llevar a cabo una acción para que ocurra el EI (por ejemplo, recibir una recompensa o evitar un castigo). Entonces, la asociación establecida es una relación de contingencia entre su acción (respuesta operante) y la consecuencia de ésta. Este tipo de condicionamiento es conocido como operante o instrumental y representa un ejemplo de cómo los animales aprendemos las consecuencias de nuestras propias acciones.

Basados en estos tipos de condicionamiento, existen una gran cantidad de protocolos de entrenamiento y evaluación de la memoria en modelos animales, paradigmas comportamentales, utilizados para el estudio del aprendizaje y la memoria y de sus distintas fases, mecanismos y sustratos biológicos.

Resumiendo, los tres niveles principales de complejidad están vinculados al aprendizaje de la existencia de un estímulo (habitación y sensibilización), al aprendizaje de la relación entre estímulos (condicionamiento clásico) y al aprendizaje del efecto de las acciones propias (condicionamiento operante) (Rescorla y Wagner, 1972). Es probable que todas estas formas de memoria coincidan en las fases que las forman. Sin embargo, los procesos que subyacen a cada una de estas fases pueden ser distintos, haciendo que varíen sus

características y duración. Dichos procesos estarán determinados en gran medida por el tipo de información que compone a cada memoria.

### I.3 MODELOS EXPERIMENTALES

#### I.3.1 *Memoria contexto-señal en el cangrejo Neohelice granulata*

*Neohelice granulata* (anteriormente llamado *Chasmagnathus granulatus*) es la presa preferida de muchas gaviotas, en consecuencia, un objeto que se aproxima o mueve por encima del animal provoca en éste una reacción innata de escape. Si bien la respuesta de escape es la reacción más común, el cangrejo posee al menos otras dos estrategias defensivas en su repertorio, una respuesta agresiva, en la cual expone lateralmente sus quelas, y un comportamiento de inmovilidad o congelamiento. La respuesta de escape del cangrejo frente a un estímulo visual de peligro (EVP) es fácilmente evocable y cuantificable de manera muy confiable en el laboratorio. Esto, junto a otras ventajas experimentales que ofrece *Neohelice*, algunas de las cuales serán descritas a lo largo de esta tesis, fueron las razones para que desde el año 1984 el Dr. Maldonado junto a un grupo de jóvenes colaboradores iniciara un programa de investigación sobre las bases fisiológicas del comportamiento utilizando como modelo experimental este cangrejo. Treinta años más tarde, el modelo de *Neohelice* para estudios de aprendizaje y memoria es reconocido internacionalmente (Tomsic et al., 1998; Romano et al, 2006b). A continuación, describiremos brevemente el modelo clásico de memoria que se ha venido utilizando hasta el desarrollo del nuevo modelo de condicionamiento que es parte de esta Tesis, y del cual deriva. El EVP que se utiliza en este paradigma clásico consiste en el desplazamiento de una pantalla por encima del animal, que no conlleva aparejado ningún daño inmediato para el cangrejo. Frente a este estímulo *Neohelice* despliega una típica respuesta de escape que decae con una curva de forma característica luego de unas pocas presentaciones del



EVP. La reducción de la respuesta durante la presentación repetida del EVP no puede ser explicada en términos de fatiga motora o adaptación sensorial (Lozada et al., 1990). De hecho, la reducción de la respuesta de escape frente al EVP es el resultado de un proceso mnésico que persiste por al menos 5 días luego de concluido el entrenamiento (Maldonado et al., 1997).

Esta memoria es llamada “memoria contexto-señal” (MCS), ya que en el entrenamiento los cangrejos asocian el EVP (la señal) al contexto del entrenamiento (Tomsic et al., 1998). Esta asociación se evidencia sólo cuando se observa retención al evaluar la memoria en el mismo contexto del entrenamiento. Al evaluar los animales en un contexto distinto, estos responden al EVP del mismo modo que los animales no entrenados, es decir que no muestran retención. Esta MCS se adquiere siempre que se aplique un entrenamiento espaciado, que consiste en 15 o más ensayos con un intervalo entre ensayos mayor a 30 segundos (Pedreira et al., 1998). La capacidad de adquisición de la MCS en *Neohelice* es sensiblemente superior a la de otras especies de cangrejos filogenéticamente emparentadas pero que difieren en las características de su hábitat. Este fenómeno evidencia una adaptación de las capacidades cognitivas de *Neohelice* frente a las presiones ecológicas que debe enfrentar en su entorno natural (Tomsic et al., 1993).

Como mencionamos anteriormente, durante el transcurso de esta Tesis, nosotros desarrollamos un nuevo paradigma en el cangrejo *Neohelice*. El protocolo y los mecanismos subyacentes a la memoria en este nuevo paradigma se encuentran explicados en los capítulos II y III.

### *1.3.2 Condicionamiento de miedo en ratón*

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). Este aprendizaje presenta dos variantes, el condicionamiento de miedo al contexto y el condicionamiento de miedo a una clave o al tono (conocidos en inglés como *contextual fear conditioning* y *cued fear conditioning*, respectivamente), en el que el sujeto experimental, típicamente un ratón o una rata, es colocado en una caja con determinadas características contextuales (EC1); luego de un tiempo de habituación, puede presentarse o no, un tono (EC2) 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 (EC1) o en otra diferente pero se le presenta el tono (EC2), el mismo muestra un conjunto de comportamientos de miedo, entre ellos el de *freezing* (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, evitación del 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.

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). Se cree 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 (Anagnostaras et al., 2001). 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.4. FASES DE LA MEMORIA

##### *I.4.1 Consolidación*

Durante más de un siglo ha prevalecido la idea de que la memoria, tras su adquisición, atraviesa un período de labilidad antes de conformarse de un modo estable y permanente en el sistema nervioso (McGaugh 2000). Este período de labilidad está definido operacionalmente por la sensibilidad de la memoria recién adquirida a diversos agentes amnésicos experimentales como, por ejemplo, intervenciones farmacológicas o comportamentales. El paso del tiempo permite que la memoria adquirida sea gradualmente estabilizada en el sistema nervioso, de modo que se vuelve permanente a largo término, por períodos que pueden extenderse de días a años, o incluso a toda la vida del individuo. Una vez conformada en este estado estable, la memoria es insensible a los agentes antes mencionados (McGaugh 1966; Squire y Alvarez 1995). Este proceso de estabilización de la memoria a largo término es conocido como *consolidación de la memoria*.

La teoría de la consolidación fue formulada a principios del siglo XX. Müller y Pilzecker realizaron una serie de experimentos de interferencia en humanos que no poseían patologías cerebrales. La conclusión a la que llegaron fue que

luego de un entrenamiento existe un proceso interno que fija las asociaciones que se han formado, al que llamaron *consolidación* (Lechner et al., 1999, Maldonado, 2008). La hipótesis de la consolidación fue ignorada por casi 50 años hasta que en 1949 Hebb replanteó el estudio de la consolidación (Hebb 1949) y realizó una serie de experimentos en animales no humanos entre los cuales se encuentran los realizados por Duncan y Gerard con roedores (Duncan et al., 1949). Estos determinaron que el fenómeno de la consolidación se ponía de manifiesto como resultado de la amnesia cuando un factor de interferencia es introducido dentro de un determinado intervalo de tiempo luego del entrenamiento. Este fenómeno fue encontrado en especies muy diversas, incluyendo al cangrejo *Neohelice granulata* (i.e. Pedreira et al., 1996; Romano et al., 1996).

En líneas generales, la teoría postula que toda nueva memoria, inicialmente lábil, es gradualmente consolidada, tras lo cual puede permanecer largo término. Este postulado lleva implícito el concepto de que el fenómeno de consolidación ocurre una sola vez, tras la adquisición de la memoria (Dudai 2002a).

Inicialmente los tratamientos amnésicos aplicados eran sistémicos e inespecíficos como los electrochoques convulsivos (Duncan 1949; McGaugh 1966). Pero con el desarrollo de la farmacología se fueron utilizando agentes amnésicos cada vez más específicos tales como drogas que bloquean distintos procesos moleculares de manera específica. De esta manera comenzaron a revelarse distintos eventos moleculares involucrados en la consolidación de la memoria. Generalmente el efecto amnésico encontrado era evidente sólo si se evaluaba la memoria uno o más días luego de la adquisición pero no si la evaluación ocurría luego de unas pocas horas (Agranoff et al. 1965; Geller et al. 1969). Esto condujo a la idea de que existían dos representaciones en el sistema nervioso que servían a una misma memoria. Estas representaciones eran cualitativamente distintas dado que una era susceptible a la interrupción mientras que la otra no. Además, poseían distintos cursos temporales siendo una de corto término (MCT), observada a unas pocas horas e insensible al

tratamiento y la otra de largo término (MLT) afectada por el tratamiento y observada días después. Sólo esta idea de dos representaciones, basadas en mecanismos y/o sustratos distintos, podía explicar el hecho que un tratamiento amnésico no afectara la memoria inmediatamente después de aplicado (ni durante las horas subsiguientes) pero sí lo hiciera a largo plazo.

A lo largo de un siglo de estudio, la consolidación de la memoria ha demostrado ser un fenómeno universal, respecto de los tipos de memoria, las especies y los paradigmas comportamentales en los que ha sido puesta a prueba (McGaugh 2000; Dudai 2004).

Es necesario aclarar que en la literatura el término consolidación no sólo es usado para referirse al fenómeno que describimos, por el cual una memoria es estabilizada durante un período de unas pocas horas. En algunas memorias particulares se ha observado que durante un período post-adquisición del orden de las semanas, se produce una transferencia de la memoria desde circuitos representados en determinadas áreas del cerebro en donde reside inicialmente, hacia circuitos localizados en regiones distintas del cerebro, en particular desde el hipocampo hacia la corteza (Debiec et al. 2002). Se ha propuesto que este proceso, al que también se denomina consolidación, representa una estabilización ulterior que ocurre en algunas memorias, aunque para diferenciarlo del proceso anterior, en este caso se hace referencia a una *consolidación sistémica* (Debiec et al. 2002; Dudai 2004), mientras que al primero se lo denomina *consolidación sináptica* (Dudai 2004) o consolidación celular (Debiec et al. 2002).

### *1.4.2 Reconsolidación*

La teoría de la consolidación de la memoria se mantuvo como un dogma durante gran parte de los cien años que pasaron desde su formulación por Müller y Pilzecker a principios del siglo XX. Se consideraba que luego del aprendizaje la memoria atravesaba un período en el cual era lábil, susceptible

a la acción de agentes interferentes, luego del cual se fijaba y no podía modificarse. Se decía que la memoria quedaba consolidada, en un estado inactivo o durmiente y podía ser evocada pero en ningún caso afectada (bloqueada o potenciada) por un factor de interferencia (Hebb, 1949; Davis y Squire, 1984). A fines de la década del 60, varios autores encontraron que una memoria ya consolidada podía ser bloqueada si se la evocaba mediante la presentación del EC e inmediatamente se la interfería con un electrochoque convulsivo (Lewis y Maher, 1965; Misanin et al., 1968; Lewis, 1969). Los mismos resultados se obtuvieron usando hipotermia en lugar de electrochoques, una inyección de anisomicina (antibiótico que bloquea la síntesis proteica), o una interferencia tal como otro aprendizaje como agente amnésico (Mactutus et al., 1979; Judge y Quartermain, 1982; Gordon, 1983). Esos resultados fueron olvidados durante más de veinte años, hasta que en el año 1997 se produjo un resurgimiento del interés por el tema. El grupo de Susan Sara demostró que la memoria de una discriminación espacial ya consolidada podía pasar de un estado inactivo a un estado activado (reactivación) luego de la presentación de un recordatorio, seguido por un proceso de reestabilización. Así, la memoria podía ser dañada si se presentaba luego de la reactivación un antagonista de los receptores de NMDA o de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Przybylski y Sara, 1997; Przybylski et al., 1999). Estos investigadores denominaron a este fenómeno como *reconsolidación* dado que pensaron que recapitulaba la consolidación.

Hasta ese momento se utilizaron el electrochoque convulsivo, inhibidores de la síntesis proteica o bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos inyectados sistémicamente, que tenían efecto a nivel de todo el organismo, como agentes amnésicos que interferían con la reconsolidación. Un año más tarde, el grupo de Joseph LeDoux demostró la fase de reconsolidación en una memoria aversiva (Nader et al., 2000a) en el cual el agente amnésico estuvo dirigido al locus principal implicado en el procesamiento y almacenaje de las memorias aversivas: la amígdala basolateral. Este tratamiento localizado, demostró de manera inequívoca la existencia de la reconsolidación al

bloquear específicamente la síntesis proteica en esta estructura, luego de la reactivación de la memoria. De esta manera, sus experimentos marcaron un punto de inflexión a partir del cual la fase de reconsolidación se convirtió en un área de intensa investigación en las neurociencias. Desde entonces ha sido demostrada en una gran variedad de especies como roedores, pollos, peces, caracoles de agua dulce, cangrejos, entre otros y en diferentes tipos de memoria, incluyendo memorias motoras en el humano (Forcato et al., 2007; Anokhin et al., 2002; Eisenberg et al., 2003; Pedreira y Maldonado, 2003; Sangha et al., 2003; Walker et al., 2003).

Desde su inicio el término reconsolidación se tomó como una segunda instancia de consolidación (Przybylski y Sara, 1997; Przybylski et al., 1999; Nader et al., 2000a). Actualmente es entendida como un fenómeno que si bien recapitula dicho proceso, presenta diferencias en algunos mecanismos y cinéticas. Estas diferencias pueden deberse a que en la consolidación se estabiliza una nueva traza y en la reconsolidación se reestabiliza una traza mnésica previamente formada (Dudai 2004; Alberini, 2005; Forcato et al., 2011).

En suma, la presencia de un recordatorio puede desencadenar procesos conceptualmente diferentes que son inherentes: la reactivación, que consiste en el pasaje de la memoria de un estado inactivo a un estado activo; la labilización, entendida como la desestabilización de la traza mnésica y la reestabilización de la memoria como la reconsolidación propiamente dicha. Como veremos en esta Tesis, no cualquier recordatorio es suficiente para desencadenar estos procesos.

### *1.4.3 Extinción*

En el apartado anterior vimos que la presentación de un recordatorio como el EC sin la presentación de EI desencadena el fenómeno de reconsolidación. Sin embargo se ha probado (Pedreira et al., 2003) que esto sólo sucede si la

presentación del EC es breve. Si el mismo EC es presentado en repetidos eventos o por un tiempo prolongado, la resultante comportamental es el decaimiento en la respuesta condicionada. Este proceso determina la *extinción* de la memoria (Pavlov, 1927; Falls et al. 1992; Rescorla 2001; Santini et al. 2001; Myers y Davis 2002) en lugar de la reconsolidación.

Mientras que algunos autores han propuesto que la extinción de la memoria está determinada por una destrucción o borrado de la asociación original «EC–EI» (Rescorla y Wagner 1972; McClelland 1985), actualmente, la visión más extendida del fenómeno propone que la extinción supone una nueva asociación «EC–no EI» adquirida como consecuencia de la exposición al EC sin reforzar y que toma el control del comportamiento (Brooks y Bouton 1994; Myers y Davis 2002) en lugar de la pérdida u “olvido” de la asociación original. En otras palabras, no se trataría de un desaprendizaje sino de un nuevo aprendizaje, producto de una nueva experiencia.

Esta “persistencia silenciosa” de la memoria original puede evidenciarse por distintos fenómenos comportamentales, considerados características diagnósticas inherentes a la extinción (Bouton 2002; Myers y Davis 2002) tales como:

(a) la Recuperación espontánea: la respuesta condicionada original puede recuperarse pasado cierto tiempo desde que la extinción tuvo lugar sin ningún entrenamiento adicional (Pavlov, 1927).

(b) la Readquisición y ahorro (*saving*): cuando se realiza el entrenamiento original luego de haber extinguido la memoria (reentrenamiento) se requiere un menor número de ensayos para expresarlo nuevamente (“ahorro” de entrenamiento). Entonces se pone en evidencia una facilitación del aprendizaje producto de una persistencia en el sistema de esta memoria original tras la extinción (Bouton 1993).

(c) la Reinstalación (*reinstatement*): luego de la extinción del condicionamiento, la sola presentación del EI (que al no estar asociado al EC pierde valor predictivo y por lo tanto no opera como reentrenamiento), puede



restaurar o reinstalar parcialmente la respuesta al EC (Rescorla y Heth 1975).

Si se considera los momentos de entrenamiento o evaluación, como distintos contextos temporales, este último aspecto puede explicar también la recuperación espontánea (Bouton 1988, 1993, 2002).

Finalmente, si se impide selectivamente la consolidación de la memoria de extinción, sin afectar su adquisición, mediante la administración de agentes amnésicos como los ya descritos, al evaluar la memoria comportamentalmente puede observarse la retención de la memoria original (Falls et al. 1992; Pedreira y Maldonado 2003). Este hecho provee evidencia de que la memoria original permanece intacta, a pesar de la adquisición de la memoria de extinción.

A nivel de mecanismos celulares y moleculares, la formación y consolidación de la memoria de extinción son fenómenos menos estudiados que los de la adquisición y consolidación de la memoria original. No obstante, varios trabajos han mostrado ciertas coincidencias en los eventos celulares y moleculares que subyacen estos dos procesos (e.g. Lu et al. 2001; Santini et al. 2001), en concordancia con la idea de que la extinción es un nuevo aprendizaje asociativo (Pavlov 1927; Berman y Dudai 2001; Myers y Davis 2002). Sin embargo, otros trabajos muestran diferencias entre los mecanismos de consolidación y reconsolidación y los de extinción, cuestionando parcialmente la hipótesis del nuevo aprendizaje (Lin et al., 2003; de la Fuente et al., 2011; Tronson et al., 2011)

## I.5 BASES CELULARES Y MOLECULARES DE LA MEMORIA

En 1894, Santiago Ramón y Cajal (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 casi un siglo, pero 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.

Actualmente es ampliamente aceptado que durante el aprendizaje ocurren cambios reversibles en la transmisión sináptica que deben ser 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.

En 1949, Donald Hebb postuló un modelo en el cual las MCT y las MLT se encontraban en serie, de esta manera, la consolidación de la primera daría lugar a la segunda, planteando así una relación de dependencia entre ambas representaciones. Aunque en correspondencia con esta hipótesis ha sido demostrado en repetidas ocasiones que el bloqueo de la MCT impide también a la MLT (Gibbs y Ng 1984), hoy se conocen fármacos capaces de impedir selectivamente una sin afectar a la otra (Emptage y Carew 1993; Izquierdo et al. 1998), lo que abogaría por dos procesos en paralelo, es decir, dos representaciones independientes. Más allá de tener periodos de duración distintos, estas memorias se diferencian también por los mecanismos subyacentes. Es por esto que en muchos casos las memorias de largo, intermedio y corto término se definen guiándose por los procesos involucrados y no por su persistencia en el tiempo.

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. Se postula entonces que, como producto de un patrón específico de estimulación se inducen

modificaciones post-transcripcionales rápidas, entre las cuales se encuentran la modulación de canales iónicos, la afinidad de receptores post-sinápticos, la síntesis y movilización de vesículas sinápticas a la zona activa de liberación, entre otras. Estos mecanismos afectan directamente la eficacia sináptica aumentando o disminuyendo la habilidad de la neurona presináptica de liberar neurotransmisor o afectando la sensibilidad al neurotransmisor de la neurona post-sináptica (Dudai 2002a).

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 reciclado de proteínas suele ser más rápido de lo que duran las MLT. El interrogante que surge entonces es ¿Cuáles son los cambios necesarios para que una MLT persista en el tiempo? Es interesante destacar que no es la actividad recurrente de los circuitos lo que perdura, sino la capacidad de ser reactivados aún en ausencia del estímulo que lo originó.

#### *1.5.1 Memoria de largo término y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B*

Algunos modelos experimentales han servido para probar que algunos cambios en el patrón de expresión génica son necesarios para producir alteraciones fisiológicas y morfológicas de largo término en las terminales sinápticas así como en procesos de sinaptogénesis (Montarolo et al.1986, Castellucci et al.1989, Glanzman et al.1990). Se postula que tales procesos de plasticidad neuronal que llevan a la reorganización de los contactos sinápticos de las neuronas involucradas constituyen los mecanismos celulares básicos que dan sustento a la formación de la MLT.

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

Uno de los mecanismos moleculares que participan en procesos de

plasticidad sináptica y memoria, inicialmente descritos por nuestro grupo en el modelo de memoria contexto-señal (MCS) de *Neohelice*, es la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Freudenthal et al., 2000; Merlo et al., 2005; Freudenthal et al., 2005; Boccia et al., 2007; Miller y Sweatt 2006; revisado en Romano et al., 2006 y en Meffert y Baltimore, 2005). En el sistema nervioso central, los factores de transcripción de la familia REL/ NF-kappa B se asocian a varias funciones como por ejemplo, respuesta a agresiones (isquemia, excitotoxicidad y trauma) (Yu et al., 1999; Blondeau et al., 2001; Shen et al., 2002), regulación de la apoptosis (Kucharczak et al., 2003), desordenes neurodegenerativos (Barger et al., 1995; O'Neill y Kaltschmidt, 1997; Mattson y Camandola, 2001), desarrollo y crecimiento (Gutierrez et al., 2005).

Algunas vías de transducción de señales asociadas a receptores de neurotransmisores como el glutamato, TNF $\alpha$ , ligando de Fas, factor de crecimiento nervioso (NGF) y la forma secretada de la proteína precursora del  $\beta$ -amiloide (APP) también son capaces de activar a estos factores de transcripción. La activación y translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B es parte de los mecanismos de regulación de la expresión génica que tienen lugar durante la formación de la memoria, tanto en vertebrados como en invertebrados (Meffert y Baltimore, 2005; Romano et al., 2006a y 2006b). Se ha demostrado así que la activación de estos factores de transcripción es un elemento común en la consolidación y reconsolidación, tanto en vertebrados como en invertebrados, en base a lo cual ha sido postulado como un mecanismo básico de plasticidad neuronal (Merlo y Romano, 2005; Boccia et al., 2007; de la Fuente et al., 2011).

### *1.5.2 Memoria de largo término y degradación de proteínas*

La plasticidad de largo término implica no sólo cambios funcionales en la fuerza sináptica sino también cambios estructurales en la forma y tamaño de las sinapsis, así como la conectividad física de las redes. Dicha modificación de

las sinapsis depende de eventos de síntesis y degradación de proteínas de manera coordinada (Bingol y Schuman, 2005; Yi y Ehlers, 2007).

La primer evidencia de una conexión entre la degradación de proteínas y el aprendizaje y la plasticidad sináptica se encontró en *Aplysia*, donde la estimulación repetida de neuronas sensoriales con serotonina induce una forma de plasticidad sináptica llamada facilitación de largo término (LTF, por sus siglas en inglés) (Hegde et al., 1993). LTF depende de la activación de la quinasa A (PKA), la cual necesita de la degradación mediada por el proteasoma de la subunidad reguladora negativa R. En la memoria contexto señal del cangrejo *Neohelice* y en la evitación inhibitoria en ratas se ha observado que la degradación de I $\kappa$ B, la proteína inhibidora de NF- $\kappa$ B, por parte del proteasoma es necesaria para la consolidación de la memoria (Merlo y Romano, 2006; López-Salón 2001)

En particular, se ha propuesto que el sistema de degradación de proteínas dependiente del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS del inglés *ubiquitin proteasome system*) de tipo 26S es necesario para dar lugar a cambios plásticos en las conexiones sinápticas tanto en modelos de vertebrados como de invertebrados (Chain et al., 1999b; Hegde et al., 1997; Lopez-Salón et al., 2001). Básicamente, se considera que la degradación de elementos negativos que controlan y limitan la plasticidad neuronal es un paso necesario en los procesos de memoria. Asimismo, la extinción de las memorias de miedo así como la consolidación y reconsolidación de memorias espaciales también dependen de la actividad del proteasoma (Artinian et al., 2008; Lee et al., 2008).

## OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El objetivo general de esta Tesis fue estudiar mecanismos moleculares implicados en los procesos de labilización y reconsolidación de la memoria y su funcionalidad. En este sentido nos propusimos comparar su conservación en términos evolutivos entre dos modelos de memoria asociativa, uno en el cangrejo *Neohelice granulata* (antes llamado *Chasmagnathus granulatus*) y el otro en el ratón *Mus musculus*.

Objetivos específicos:

A continuación presentamos de manera general los objetivos e hipótesis de esta tesis que serán desarrollados detalladamente en cada uno de los capítulos correspondientes.

1) Desarrollar un paradigma pavloviano en cangrejo *Neohelice* de modo de poder comparar los resultados obtenidos en esta memoria asociativa contextual en crustáceos con los encontrados en un paradigma asociativo contextual en ratón. La hipótesis que subyace es que *Neohelice granulata* es capaz de establecer asociaciones contextuales de tipo pavloviano.

2) Relacionado con el objetivo anterior, planteamos la hipótesis que afirma que la transcripción génica dependiente de NF- $\kappa$ B es necesaria para la consolidación y reconsolidación de la memoria asociativa contextual de tipo pavloviano en *Neohelice granulata*.

3) El efecto sobre la retención de la memoria de la inhibición de NF- $\kappa$ B en el proceso de reconsolidación servirá como herramienta para evidenciar que este proceso ha tenido lugar. Esto nos permitirá estudiar las características que debe cumplir un recordatorio de modo de desencadenar la labilización de la memoria y su consecuente reestabilización. De esta manera pondremos a

prueba la hipótesis que establece que no todo recordatorio es capaz de desencadenar el proceso de labilización-reconsolidación.

4) Partiendo de la hipótesis que postula que la labilización implica degradación de proteínas dependiente de proteasoma, nos propusimos estudiar el efecto de la inhibición del sistema ubiquitina-proteasoma en el proceso de labilización de la memoria. Este estudio se realizó en forma comparativa entre los modelos de memoria asociativa contextual de tipo pavloviano en cangrejo y en el condicionamiento de miedo contextual en ratón.

5) Teniendo en cuenta que el proceso de reconsolidación implica poner en juego una memoria ya consolidada, nos preguntamos cuál sería el valor adaptativo de dicho mecanismo. La hipótesis que planteamos es que tendría una funcionalidad en el fortalecimiento de determinadas memorias.

# Capítulo II

## **Materiales y Métodos**



Figura II.1

A



B



C



D



Figura II.1: A) y B) Fotografías del cangrejo *Neohelice granulata* en su ambiente natural. C) Fotografía de una ría de San Clemente del Tuyú donde se capturan los cangrejos D) Fotografía de un cangrejo *Neohelice granulata* capturado por una gaviota cangrejera.

## Materiales y Métodos

Los experimentos de esta tesis se realizaron en dos modelos animales: el cangrejo *Neohelice granulata* (Figura II.1) y el ratón *Mus musculus* (Figura II.3)

### II.1 *Neohelice granulata*

#### II.1.1 Sujetos experimentales

En el laboratorio de Neurobiología de la Memoria (FCEN-UBA, IFIByNE-CONICET) se realizan desde el año 1986 estudios comportamentales y mecanísticos sobre procesos mnésicos, utilizando al cangrejo *Neohelice granulata* (previamente denominado como *Chasmagnathus granulatus*) como animal experimental (Figura II.1). *Neohelice* tiene todas las facilidades de experimentación atribuidas a un sistema simple, pero presenta además otras ventajas, como la posibilidad de ser capturado durante todo el año; su fácil mantenimiento en el laboratorio; la constancia de su respuesta de escape ante un estímulo de peligro, base del paradigma de aprendizaje utilizado; y el hecho de carecer de una barrera hemato-encefálica endotelial, lo que permite detectar, en muchos casos, el efecto de drogas inyectadas por vía sistémica en bajas dosis (Maldonado et al.1997, Romano et al. 2006a). Para entender el diseño de los experimentos comportamentales en este modelo, es relevante destacar ciertas características de la biología y hábitat de la especie. La clasificación taxonómica de esta especie la ubica dentro del Phylum Arthropoda, subphylum Crustacea, clase Malacostraca, Orden Decapoda, familia Varunidae. Posee hábitos semiterrestres, pasa gran parte del tiempo fuera del agua, dentro de cuevas que cava en el barro (Figura II.1.B) las cuales forman extensos “cangrejales” que pueden ocupar cientos de hectáreas (Figura II.1.C). Es una especie propia de la costa del Atlántico Sur: su distribución geográfica va desde Río de Janeiro hasta el golfo de San Matías

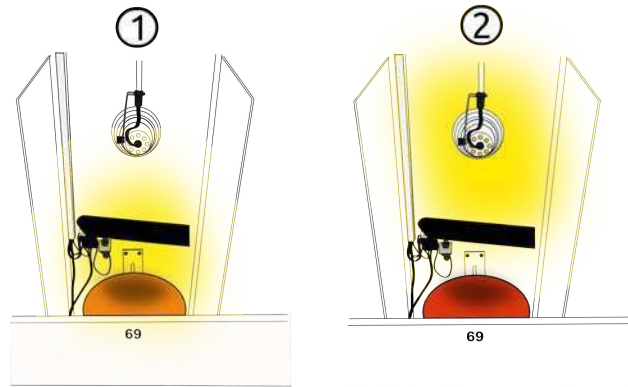
en las costas patagónicas argentinas, ubicándose en zonas de transición de agua dulce y salada (Spivak 1997). Su régimen alimentario es variable de acuerdo a las zonas, pero está mayormente compuesto por sedimentos con restos de pequeños invertebrados y vegetales (Alberti et al. 2008, Gutierrez e Iribarne 2004). Por otro lado, su principal predador es la gaviota cangrejera (Figura II.1.D) (Berón 2003), lo cual constituye un dato fundamental, dado que los estímulos que pasan por encima del horizonte visual son interpretados por el animal como potencialmente peligrosos (Zeil y Zanker 1997).

Para la realización de los experimentos, se emplearon ejemplares machos adultos, con un tamaño de largo lateral del caparazón comprendido entre 2,6 y 2,9 cm y un peso medio de  $(17 \pm 0,2)$ g. Los cangrejos fueron recolectados en aguas salobres de menos de un metro de profundidad en las rías de San Clemente del Tuyú, Argentina; y transportados al laboratorio donde fueron alojados en cubas plásticas (35 x 45 x 20 cm) con una profundidad de agua marina de 2 cm a una densidad de 20 cangrejos por recipiente. El agua utilizada en las cubas y durante los experimentos fue preparada con sal marina Marinex (Winex-Germany) (salinidad 10-14 ‰, pH 7,4-7,6). La habitación de permanencia de los cangrejos (cangrejario) se mantuvo con un período de 12hs luz: 12hs oscuridad (Luz de 8 a 20hs). La temperatura se mantuvo dentro del rango 22-24°C. Los experimentos fueron realizados dentro de la primera semana de llegada de los animales y cada cangrejo fue utilizado sólo una vez. Durante la permanencia en el laboratorio, los animales fueron mantenidos con cambios periódicos del agua cada 48hs.

Figura II.2

A

Equipo experimental



B

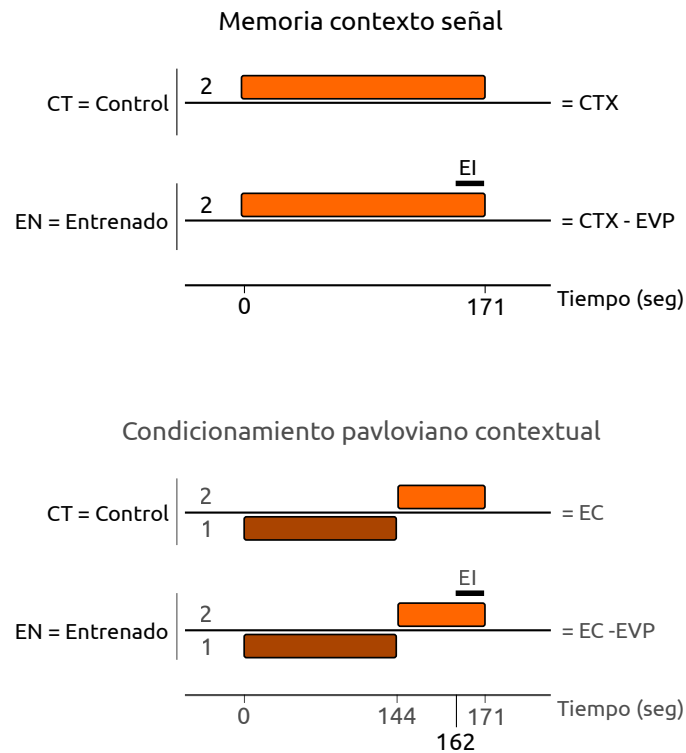


Figura II.2: Equipo experimental. (A) Configuración lumínica del actómetro. El mismo cuenta con dos fuentes de iluminación, una inferior 1 y otra superior 2. (B) Panel superior: esquema de un ensayo del protocolo de MCS. El dispositivo se encuentra iluminado superiormente durante todo el experimento. En los grupos entrenados, el estímulo visual de peligro es presentado cada 171 seg. Panel inferior: Esquema de un ensayo del nuevo paradigma de CPC. El dispositivo es iluminado desde la fuente lumínica inferior antes del comienzo de cada experimento y durante los intervalos entre presentaciones del EC (caja marrón). La iluminación superior conforma el EC (caja naranja). El mismo tiene una duración de 27 seg. En los grupos entrenados, el EI (guión negro), tiene una duración de 9 seg, y es presentado durante los últimos 9 segundos del EC. De esta manera el EC co-termina con el EI.

### *II.1.2 Dispositivo experimental*

El dispositivo experimental utilizado, el actómetro (Figura II.2), consiste en un contenedor plástico de color naranja, en forma semiesférica, con piso circular plano donde se colocan 50ml de agua marina, allí se alojan los cangrejos individualmente. En la parte superior hay una pantalla opaca de forma rectangular (25 x 7,5cm) que se mueve horizontalmente sobre el animal operada por un motor controlado por una computadora. Cada ciclo de estimulación dura 2,5 segundos y consiste en el desplazamiento de la pantalla, con una trayectoria de ida y vuelta, formando un ángulo de 90° cada vez. Por encima de la pantalla hay una lamparita de 5 W que permite iluminar de forma indirecta el dispositivo (condición (2) en la Figura II.2.A), así el pasaje de la pantalla genera en el animal, la percepción de un objeto trasladándose por sobre él, significando un estímulo visual de peligro (EVP). La base circular plana del recipiente tiene externamente adosados 4 micrófonos, capaces de registrar las vibraciones producidas en el contenedor. Estas vibraciones, transducidas a señales eléctricas, son recogidas por una computadora que las integra y las convierte en unidades numéricas arbitrarias, entre cero y 6000.

Debajo del contenedor plástico se encuentran una lámpara que permiten cambiar la iluminación del actómetro de manera inferior (condición (1) en la Figura II.2.A).

La sala experimental posee 40 actómetros aislados entre sí por paneles y el experimentador puede registrar la respuesta de 40 animales de forma simultánea. La misma computadora de registro es utilizada para programar las secuencias y duración de los ensayos, así como los intervalos entre los mismos, para los 40 actómetros.

### II.1.3 *Procedimiento experimental*

Cada actómetro fue llenado inicialmente con 50 ml de agua marina y luego se colocó al azar un cangrejo por dispositivo, previa evaluación del estado general del animal. Esta evaluación consistió en una breve maniobra dando vuelta al animal sobre su lado dorsal, verificando la recuperación de su postura en forma inmediata. En caso contrario, el animal era descartado como sujeto experimental. Este procedimiento permitió tener una idea del estado general de los animales y descartar aquellos cuyas condiciones no eran óptimas para el experimento. No más del 10% de los animales fueron descartados.

### II.1.4 *Grupos experimentales*

Las sesiones de entrenamiento fueron precedidas por 10 minutos de adaptación en el actómetro iluminado desde abajo. Una sesión de entrenamiento estándar consistió en 15 ensayos con o sin presentación del estímulo visual de peligro (EVP = EI) dependiendo del tratamiento aplicado a cada grupo de animales. Cada presentación del EVP consistió en dos ciclos de pasaje de la figura sobre el actómetro cuya duración fue de 2,5seg, con 2seg de intervalo entre ciclos de modo que la duración total de la presentación del EI fue de 9 segundos. Todos los animales recibieron una primera presentación del EVP como ensayo pre-entrenamiento de manera de poder determinar si el nivel de respuesta inicial era igual para todos los grupos. Cada ensayo duró 27 segundos con iluminación superior (EC) y durante los últimos 9 segundos se presentó el EVP. El intervalo entre EVPs (IEE) fue de 171 segundos. Sin embargo, el intervalo entre cada EC fue de 153 segundos en los cuales los

actómetros se encontraban con iluminación inferior provocando un cambio virtual en las características del entorno (Figura II.2). Los animales control, que sólo recibieron una presentación del EVP, permanecieron el mismo tiempo en los actómetros con el cambio de iluminación en simultáneo con los entrenados, pero sin las posteriores presentaciones del EVP. Inmediatamente luego de cada sesión todos los cangrejos fueron retirados de los actómetros y colocados en contenedores cilíndricos plásticos individuales con agua hasta una profundidad de 0,5 cm.

Durante la sesión de reexposición, los animales fueron colocados en los actómetros durante 5 minutos con la iluminación inferior y en el caso del protocolo de reconsolidación recibieron sólo una presentación de la iluminación superior (27 segundos). Los casos en los que se realizó un protocolo de extinción, el tiempo de permanencia de la configuración con luz de arriba fue mayor y se encuentra especificado en la sección de resultados del capítulo III. En todos los casos luego de la presentación de la luz de arriba, se volvió a la iluminación desde abajo y los animales fueron retirados nuevamente a sus contenedores cilíndricos plásticos individuales. Aquéllos cangrejos que no eran reexpuestos, eran colocados en los actómetros con la iluminación inferior pero no recibían el cambio a la iluminación superior en ningún momento, de esta manera, todos los grupos de animales fueron manipulados de la misma manera. Cuando correspondía, la presentación del EVP durante la reexposición ocurrió en los últimos 9 seg de la iluminación superior, al igual que durante la sesión de entrenamiento y evaluación.

La evaluación de la memoria se realizó colocando a los cangrejos nuevamente en los actómetros durante 10 minutos con iluminación inferior y luego todos los animales recibieron un ensayo (cambio a iluminación superior y presentación del EVP). El nivel de respuesta medida corresponde a la integración de los 9seg que dura la presentación del estímulo visual de

peligro.

### *II.1.5 Análisis estadístico*

Los resultados del estudio comportamental fueron analizados utilizando análisis de la varianza general de un factor (ANOVA) con una tasa de error = 0,05, de acuerdo con el método estándar (Howell 1987). La retención de la memoria se determina operacionalmente como la presencia de diferencias significativas entre la respuesta de un grupo entrenado y la de su respectivo control durante la sesión de evaluación. La ausencia de esta diferencia es indicativo de una falta en la retención de la memoria. En el caso en el que se presentó un protocolo de extinción, la falta de retención fue considerada memoria de extinción.

Con el objetivo de determinar efectos inespecíficos en el nivel de respuesta, debidos a las drogas o la manipulación de los animales, realizamos comparaciones entre los grupos control que recibieron diferentes tratamientos. En general, el análisis estadístico incluyó tres comparaciones planeadas *a priori*, cada par CT-EN y la comparación entre los dos grupos CT, utilizando comparaciones planeadas de Cuadrados Mínimos con una tasa de error por comparación  $<0,05$  (Rosenthal and Rosnow 1985; Howell 1987). En cada experimento realizamos una predicción basada en el diseño experimental. En la primer comparación, era esperable una diferencia entre el CT y EN debido a una reducción en el nivel de respuesta de este último inducida por el entrenamiento (este grupo recibió un protocolo de entrenamiento fuerte sin otro tratamiento). Por el contrario, en la segunda comparación, si la relación temporal entre el estímulo cambiaba o la droga impedía la retención, no se esperaban diferencias entre el par CT-EN. Finalmente, mientras la manipulación comportamental o la droga no afectara



el nivel de respuesta *per sé* en la sesión de evaluación, entonces no se esperaban diferencias en la comparación entre grupos controles.

Se utilizaron entre 30 y 40 animales por grupo para cada experimento (detallado en el epígrafe de cada figura).

Todos los valores de las respuestas se muestran como media  $\pm$  EEM (error estándar de la media), normalizados a los valores de la media de la respuesta de un grupo control no entrenado. Los datos se analizaron usando el programa Statistica '99 (Windows 6.1 software package; StatSoft Inc., Tulsa, OK).

### II.2 *Mus musculus*

#### II.2.1 *Sujetos experimentales*

Se utilizaron ratones *de la cepa* Balb C (Figura II.3.A), machos, de 60–70 días de edad, con pesos entre 25–30 g, obtenidos del bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de La Plata y del bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Dentro del laboratorio los animales fueron colocados de a grupos (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 las cajas de alojamiento de forma individual para evitar que se sacaran las cánulas mutuamente. Los ratones permanecieron en un cuarto en condiciones controladas de luz-oscuridad de 12 hs (luces encendidas de 8 a 20hs) y a una temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Los animales fueron retirados del 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. Committee on Care and Use of Laboratory Animals, EEUU). 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.2.2 Condicionamiento de miedo*

El modelo de memoria utilizado en esta Tesis es el de condicionamiento de miedo (ej., Wehner y Radcliffe, 2004). Básicamente consiste en que el animal, durante la sesión de entrenamiento, recibe una experiencia aversiva, un choque eléctrico suave en las patas, que puede ser asociada con ciertas características del ambiente en el que recibe dicha experiencia (características del lugar en el que se encuentra). También pueden agregarse un estímulo clave, como la presentación 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 memoria y utilizamos la memoria de clave sólo como control de especificidad de la acción de la droga sobre la memoria dependiente de hipocampo (memoria contextual). Sin embargo, los resultados referidos a la memoria de clave no se muestran en esta Tesis.

A



B



C

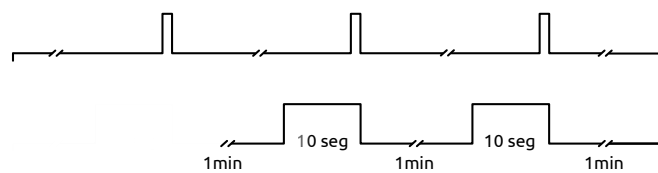
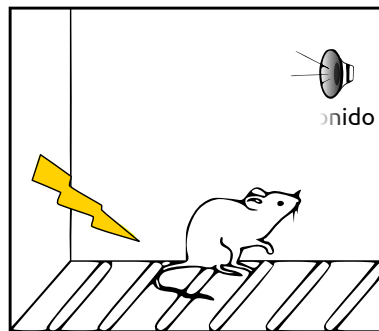


Figura II.3. A) Fotografía de un ratón de la cepa Balb c. B) Fotografía de la caja de entrenamiento y evaluación de la memoria contextual. C) Esquema de entrenamiento estándar. Arriba un esquema del ratón en el dispositivo experimental y abajo el esquema del protocolo realizado durante un entrenamiento estándar.

El dispositivo experimental donde se realizaron los experimentos conductuales consistió en una caja de acrílico transparente de medidas 24.5 cm x 24.5 cm x 42 cm. La caja se encontraba a su vez dentro de otra caja de mayor tamaño, de madera blanca, con puerta lateral, por donde los animales eran colocados de a uno para realizar la tarea. El piso de la caja acrílica consistía 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 estaba conectada a un dispositivo eléctrico de comando de modo de establecer los parámetros básicos característicos de los estímulos utilizados, tales como intensidad de choque eléctrico, duración, etcétera (realizada por el técnico Ángel Vidal) (Figura II.3.B).

Todos los animales recibieron durante dos días previos al entrenamiento, una sesión de manipulación de aproximadamente 3 min. Esta sesión tiene como objetivo que los animales se habitúen tanto al experimentador como a la sala donde se realizan los experimentos. En el caso de experimentos farmacológicos, en esta sesión de *manipulación* los animales fueron sujetos de la misma manera que lo serían al ser inyectados.

Las sesiones de entrenamiento estándar consistieron en colocar a cada animal en la caja de condicionamiento (Figura II.3.B y C). Luego de dos minutos de adaptación, los ratones recibieron tres ensayos, con un intervalo entre ensayos de 1 minuto. Cada ensayo contaba con una presentación de un tono (10 segundos, 80 dB), que co-terminaba con la presentación de una descarga eléctrica (*choque eléctrico*; 1 segundo, 0,5 mA). Los ratones permanecieron un minuto más en la caja y posteriormente fueron retirados para ser devueltos a sus cajas de alojamiento.

El entrenamiento débil, fue similar al estándar excepto en que los animales reciben una sola presentación tono-choque eléctrico, luego del cual permanecen en la caja de entrenamiento un minuto y son retirados y

colocados en sus cajas de alojamiento.

La sesión de evaluación de memoria contextual consistió en colocar a los animales en la misma caja en que fueron entrenados, por un tiempo de cinco minutos, en ausencia de tono y de choque eléctrico.

El protocolo de reconsolidación de la memoria contextual consistió en reexponer a los ratones al contexto de entrenamiento durante 5min. Esta sesión de “reactivación” es equivalente a una evaluación de la memoria de miedo al contexto.

Todas las sesiones fueron grabadas con una videocámara digital, para luego ser analizados *a posteriori*.

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.2.3. Análisis estadístico*

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).

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).

Se utilizaron entre 9 y 10 animales por grupo para cada experimento (detallado en el epígrafe de cada figura).

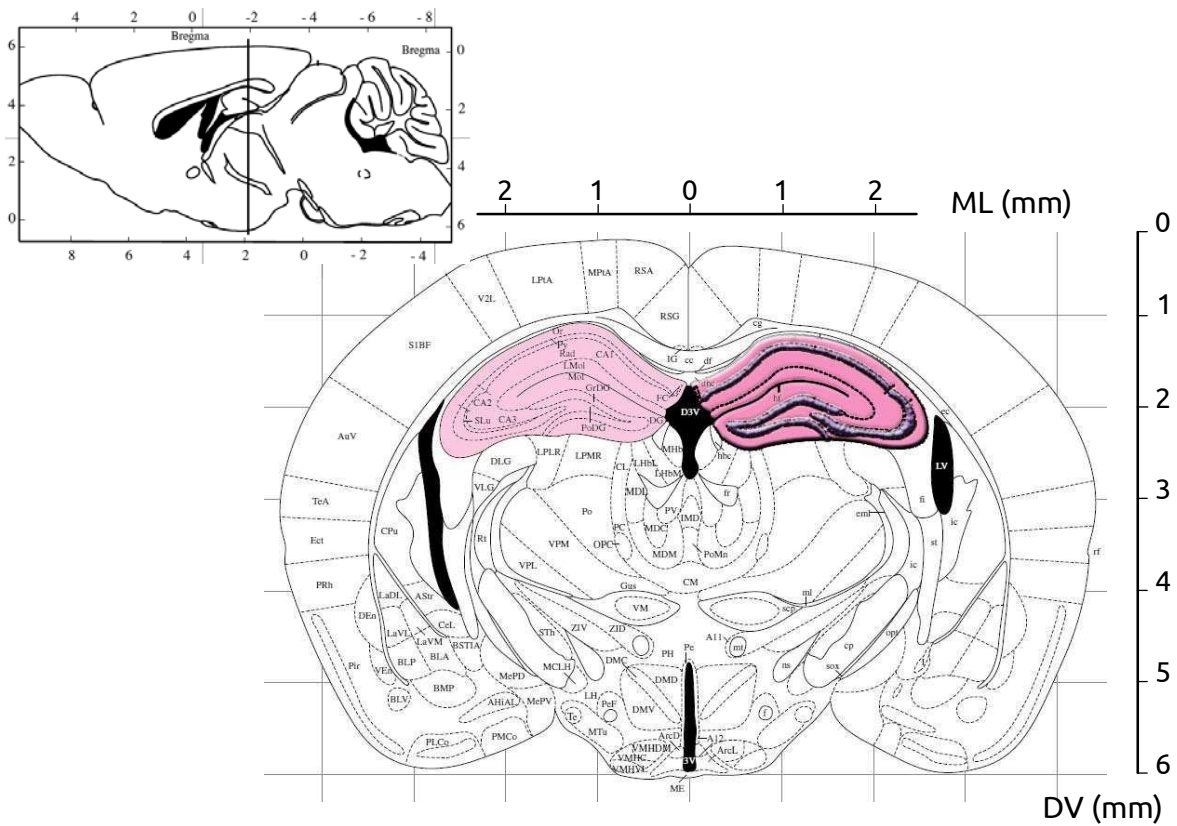
Los datos comportamentales se presentan como media del porcentaje de *freezing*  $\pm$  EEM (error estándar de la media). Los experimentos se analizaron utilizando un ANOVA de una vía, seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls para comparaciones múltiples, por cada sesión del experimento.

### *II.2.4 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

## Figura II.4

A



B

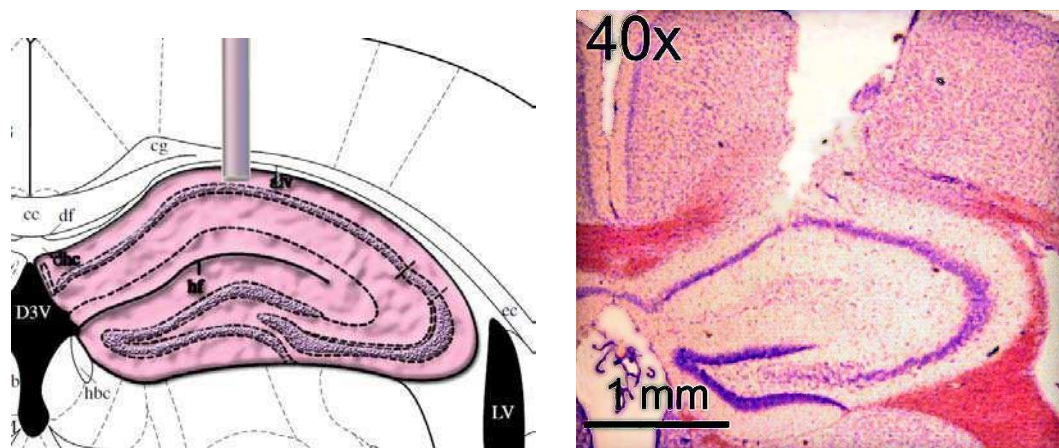


Figura II.4. (A) Esquema representativo de un corte coronal de cerebro de ratón a 1,94mm posterior al Bregma. La región coloreada en rosado es la formación hipocámpal. Ambos laterales del mismo fueron las áreas elegidas para colocar las cánulas utilizadas para la administración intrahipocámpal de la droga. ML y DV indican los ejes medial-lateral y dorsal-ventral, respectivamente. Arriba a la izquierda: vista sagital donde se muestra la altura a la que se realizó el corte coronal (esquemas modificados del Atlas de cerebro de ratón de Paxinos y Franklin 2001). (B) Panel izquierdo: detalle de la figura vista en (A) mostrando la zona donde fue colocada la cánula (cilindro lila). Panel de la derecha: imagen obtenida con microscopio óptico (40X) en la que se observa la posición de la cánula guía en uno de los hipocampos (coloración con Violeta de Cresilo).

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) (Figura II.4). 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 (VHC). 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 2,5min y las inyecciones se realizaron manualmente. La aguja se retiró 60seg después de finalizada la inyección, para evitar reflujo y asegurar la difusión de la droga. El volumen inyectado en cada hemi-hipocampo fue de 0,5µl. Se utilizaron distintos dispositivos para la administración de la droga y el VHC.

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. Para verificar la posición de las cánulas, los cerebros se cortaron con hoja de afeitar (Gillette®) 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.3 DROGAS

En ambos modelos animales las drogas fueron disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado como vehículo. En el caso de los cangrejos, la inyección fue realizada por el lado derecho de la membrana cefalotorásica dorsal. Se utilizó una aguja de 4mm de largo para asegurar que la inyección fuera realizada en el saco pericárdico. Las inyecciones en ratones fueron en el hipocampo como se explicó en la sección //2.3.

Se utilizó la droga Sulfasalazina [2,4-hydroxy ((4-((2-pyridinylamino) sulfonyl) phenyl) azo) benzoic acid] (SSZ; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.; S0833) para inhibir NF- $\kappa$ B, en una dosis de 1,2 $\mu$ g/gr de animal (5mM) en cangrejo (Merlo et al., 2002) y 1 $\mu$ g por hipocampo (2,5 mM) en ratón (Boccia et al., 2007). Utilizamos MG132 (N-CBZ-LEU-LEU-LEU-AL) (Sigma-Aldrich). En cangrejo la dosis utilizada fue de 750  $\mu$ M (2,38  $\mu$ g/animal) y en ratón 0,05 $\mu$ g/hipocampo y 0,15 $\mu$ g/hipocampo. En el cangrejo se utilizó (+)-Bicucullina (BIC) (Fluka analytical), un antagonista competitivo del receptor GABA<sub>A</sub>, administrado a una dosis final de 2,69 $\mu$ g/gr de animal (Carbó Tano et al., 2009). También utilizamos sólo en el cangrejo MK801 [(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-ibenzo[a,d] cyclohepten-5,10-imine] (Sigma Co) en una dosis de 0,6 $\mu$ g/gr de animal. En el ratón además se utilizó la droga FK506

(Sigma-Aldrich; F4679, en esta Tesis será denominada como “FK”) que inhibe a la fosfatasa calcineurina (CaN), administrada a una concentración de 10µg por hipocampo (de la Fuente 2013 en preparación), disuelta en dimetilsulfóxido (Lin et al., 2003c).

# Capítulo III

## **Desarrollo de una tarea de condicionamiento contextual en *Neohelice granulata***

## Desarrollo de una tarea de condicionamiento contextual en *Neohelice granulata*

### III.1 INTRODUCCIÓN

En el primer capítulo discutimos sobre los conceptos de aprendizaje y memoria, y cómo la asociación entre un contexto determinado y un estímulo apetitivo o aversivo, tiene un alto valor adaptativo para el animal en cuanto a su capacidad de realizar predicciones que desencadenen respuestas adecuadas a cada episodio.

El reconocimiento de un contexto particular implica un complejo procesamiento de la información desde diferentes modalidades sensoriales que son almacenadas todas juntas en una representación completa. Esta habilidad ha sido muy bien caracterizada en mamíferos (Anagnostaras et al., 2001), en los cuales las áreas integrativas y asociativas como el lóbulo temporal, el cual incluye la formación hipocampal, están en parte dedicadas al reconocimiento y la representación contextual. En insectos, se ha postulado que los *corpora pedunculata* juegan un papel similar en la integración multimodal de la información y contextualización sensorial (Liu et al., 1999; Strausfeld et al., 1998). En los crustáceos, como el cangrejo *Neohelice granulata*, el procesamiento de la información contextual es necesario para la formación de memorias contextuales asociativas. En este modelo de aprendizaje contextual, la presentación reiterada de un estímulo visual de peligro (EVP), provoca un decaimiento en la respuesta de escape que había sido desencadenada en el inicio de la presentación de dicho estímulo (Lozada et al., 1990). La memoria de largo término se manifiesta en la sesión de evaluación por una respuesta significativamente más baja debida, principalmente, a un cambio comportamental de la estrategia de escape a una respuesta de congelamiento (en inglés *freezing*) (Pereyra et al., 2000). En este paradigma se ha descrito que un entrenamiento masivo (por ejemplo, 300

ensayos con 4seg de intervalo entre ensayos, IEE) induce una habituación no asociativa que no aparece en el primer ensayo de evaluación pero sí en los ensayos subsiguientes, llamados fase de reentrenamiento de la sesión de evaluación. Por el contrario, un protocolo de entrenamiento espaciado (por ejemplo, 15 ensayos con 171seg de IEE), induce la formación de una memoria dependiente del contexto que es en su naturaleza asociativa, llamada memoria contexto señal (MCS), que aparece en el primer ensayo de evaluación y se mantiene en la fase de reentrenamiento. Una característica universal de la formación de la MLT es su dependencia de la síntesis de macromoléculas (Alberini, 2008). Se ha encontrado que la memoria de largo término en *Neohelice* es sensible a los inhibidores de síntesis de proteínas como la cicloheximida aplicada durante las primeras horas luego del entrenamiento, así como también a inhibidores de la síntesis de ARNm como la actinomicina D (Pedreira et al., 1996, 1995a). Otra característica general de la MLT es que pueden ser facilitadas durante su consolidación por la administración de drogas que aumentan la actividad neuronal excitatoria. La administración de un antagonista de los receptores GABAérgicos del tipo A (bicuculina) luego de un protocolo de entrenamiento débil es capaz de inducir la facilitación de una MLT en el cangrejo *Neohelice* (Carbo Tano et al., 2009).

Independientemente de que los mecanismos que subyacen a la MCS en el cangrejo han sido muy bien caracterizados, existen dudas sobre su naturaleza asociativa. Como mencionamos anteriormente, la asociación en el paradigma de MCS de la presentación del EVP y el contexto es expresada no sólo en el primer ensayo de la evaluación, sino también en la fase de reentrenamiento (Pedreira et al., 1998). Dicha retención de la memoria expresada en el primer ensayo sugiere que el animal reconoce las características del contexto y ejecuta la respuesta de *freezing* aún durante la primera presentación del estímulo. Este hecho es indicativo de que el aprendizaje depende del contexto de entrenamiento y existen evidencias que apoyan la naturaleza asociativa de este aprendizaje. Efectivamente, en la memoria contexto-señal se cumplen algunas características de la asociación, como inhibición latente y extinción

(Hepp et al., 2009; Hermitte et al., 1999; Pedreira et al., 1995b; Perez-Cuesta et al., 2007; Tomsic et al., 1998). Sin embargo, las características contextuales son presentadas de una manera invariable que resulta en un estímulo con bajo carácter predictor. En consecuencia, no es posible encontrar una respuesta de *freezing* que se anticipe a la llegada del EVP, es decir en respuesta a la reexposición al contexto. Por tanto, las diferencias encontradas entre los grupos control y entrenado, aparecen sólo en la primera presentación de los animales al estímulo aversivo. Está claro que en un condicionamiento pavloviano la respuesta anticipatoria es esperada en la sesión de evaluación cuando se presenta el EC sin la presentación del EI. En el condicionamiento pavloviano contextual (CPC), la respuesta condicionada (RC) ocurre cuando el animal es reexpuesto al contexto de entrenamiento. Por esta razón, el aprendizaje contextual asociativo en el cangrejo podría ser interpretado tanto como una habituación asociativa, en los términos de la teoría de Wagner (Wagner, A. R., 1984), como un condicionamiento atípico en el cual el aprendizaje sólo es expresado cuando se presenta el EI.

Durante el transcurso de esta Tesis y junto con el Licenciado Martín Carbó Tano, desarrollamos un protocolo del tipo CPC en el cual las características del contexto fueron cambiadas de tal manera que fueran contingentes con el EI y le otorguen un mayor valor predictivo al EC. Entonces, para cada ensayo de entrenamiento, características particulares del contexto fueron presentadas de forma discreta mediante un cambio de iluminación y su presentación terminó simultáneamente con el EI. Usando este protocolo, describimos la consolidación, la reconsolidación (ver capítulo IV) y la extinción de esta memoria y evaluamos la presencia de una respuesta anticipatoria consistente. Este nuevo paradigma resulta funcional a la hora de buscar sustratos neuronales de la representación del contexto porque permite una presentación fásica del mismo (Sztarker y Tomsic, 2011). Más aún, el acercamiento del nuevo paradigma a un condicionamiento pavloviano permite realizar estudios comparativos con paradigmas que utilizan mamíferos como modelo y revelar si los componentes a nivel molecular son compartidos.

Figura III.1

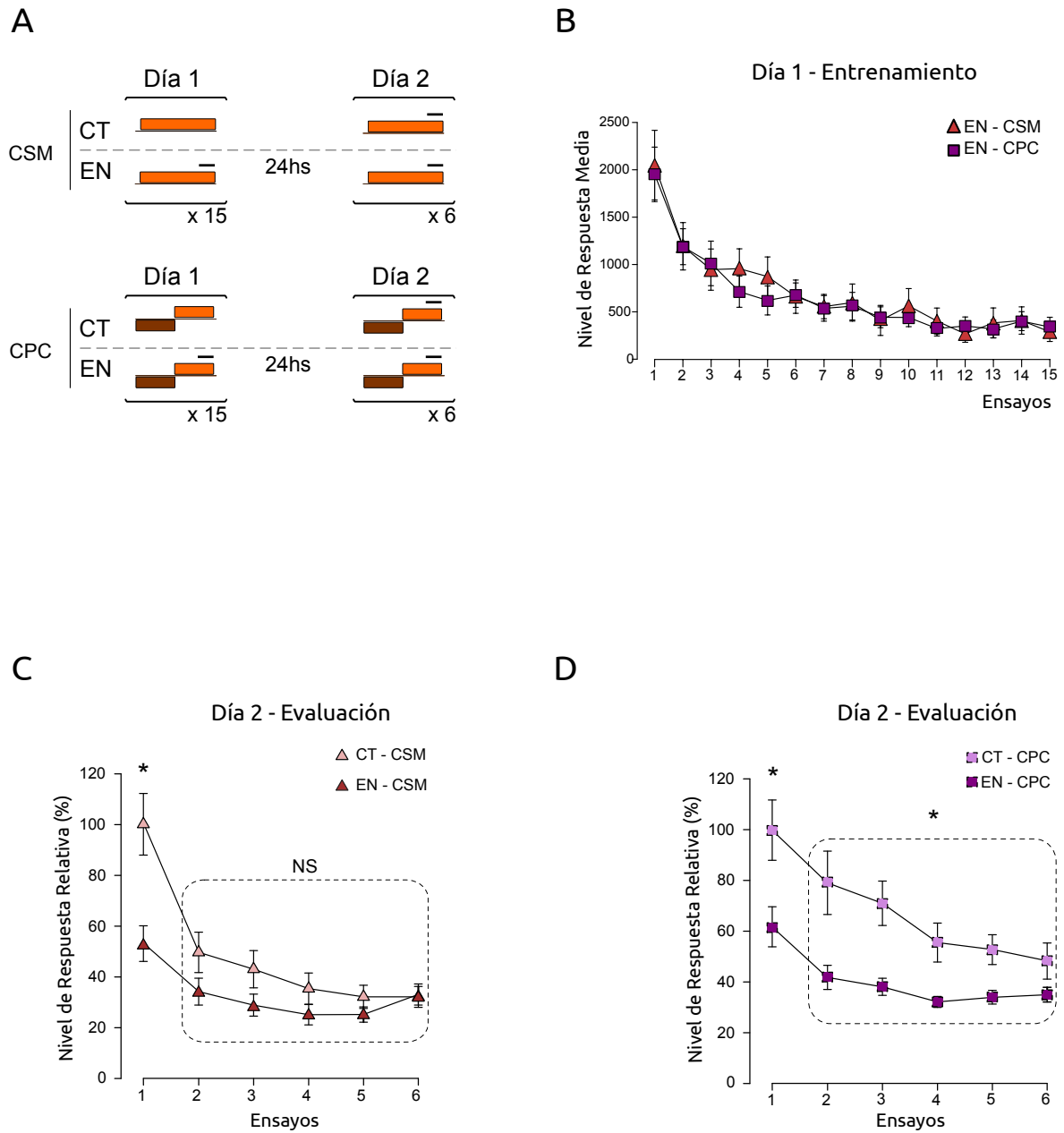


Figura III.1. (A) Diseño experimental. El protocolo para MCS es presentado en el panel de arriba. El protocolo para CPC es presentado en el panel de abajo. El guión negro sobre el final de cada caja representa un EI. (B) Curvas de entrenamiento para cada ensayo para ambos grupos entrenados. (C) Curvas de evaluación para los grupos CT-MCS/EN-MCS durante los 6 ensayos de evaluación. (D) Curvas de evaluación para los grupos CT-MCS/EN-MCS durante los 6 ensayos de evaluación.

\*:  $p < 0.05$ .  $n=40$

## III.2 RESULTADOS

### *III.2.1 El entrenamiento de condicionamiento pavloviano induce una robusta retención de la memoria*

Como discutimos en el Capítulo I, un aprendizaje asociativo consiste en la presentación contingente de un EC con un EI. Por lo tanto, desarrollamos un protocolo de estas características en el cangrejo *Neohelice granulata*. Un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio demostró que el cambio de iluminación del dispositivo experimental era interpretado por el animal como un cambio en el contexto (Pérez-Cuesta y Maldonado, 2009). Teniendo en cuenta este antecedente, introdujimos este cambio de iluminación en cada ensayo de entrenamiento. El mismo consistió en iluminar al dispositivo experimental desde abajo durante los primeros 10min y en cada IEE y 18seg antes de cada presentación del EVP, realizar un cambio a una iluminación desde arriba que se mantenía durante los 9seg que duraba el mismo. De esta manera el EC termina al mismo tiempo que el EI, en contraposición con el protocolo anterior en el cual la iluminación superior estaba presente durante toda la sesión de entrenamiento. Así, el primer experimento consistió en comparar ambos protocolos.

En la figura III.1.A se muestra el diseño experimental. En el día 1 un grupo de animales fue entrenado con 15 ensayos con iluminación superior (EN-MCS). Un grupo control permaneció el mismo tiempo en el dispositivo experimental con iluminación superior sin la presentación del estímulo visual de peligro (CT-MCS). Otro grupo entrenado con 15 ensayos al cual se le cambió desde iluminación inferior a superior 18seg antes de la presentación del EVP (EN-CPC) y otro grupo control al cual se le realizó el cambio de iluminación pero no se le presentó el EVP (CT-CPC). Luego de 24hs (día 2) los cuatro grupos fueron evaluados con 6 ensayos iguales a los que recibieron durante la sesión de



entrenamiento.

Es importante aclarar que a lo largo de esta tesis todos los grupos control recibieron una presentación del estímulo visual de peligro al mismo tiempo que el primer ensayo de entrenamiento de los grupos control. De esta manera pudimos determinar aquéllos animales que no respondían y utilizarlo como criterio de eliminación. El criterio implica que todos los animales deben responder a la primera presentación del estímulo visual de peligro.

Todos los resultados de este capítulo se presentan como respuestas medias +/- el desvío estándar normalizado con respecto al grupo control.

El ANOVA de medidas repetidas no mostró diferencias significativas entre los grupos entrenados durante la sesión de entrenamiento (Figura III.1B,  $F_{1,78}=0.05$ ;  $p$ : NS) ni interacción entre grupo y entrenamiento ( $F_{14,109}=0.4$ ;  $p$ : NS) Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas entre el primero y el último ensayo ( $F_{14,109}=31.43$ ;  $p<0,05$ ; E1-CSM vs. E15-CSM:  $p<0,05$  y E1-CPC vs. E15-CPC:  $p<0,05$ ), indicativo de que los animales entrenados realizaron un cambio del comportamiento desde una respuesta de escape a una de *freezing* durante el entrenamiento. Durante el primer ensayo de la sesión de evaluación, tanto en el protocolo MCS como en el CPC, los grupos entrenados mostraron niveles de respuesta significativamente menores que sus respectivos controles (Figuras III.1C y D) ( $F_{3,116}=17.9$ ;  $p<0,05$ ; CT-CSM vs. EN-CSM:  $p<0,05$  y CT-CPC vs. EN-CPC:  $p<0,05$ ). Esto indica que ambos protocolos son capaces de inducir una MLT significativa. Sin embargo, encontramos diferencias entre ambos protocolos en la fase de reentrenamiento (entre los ensayos 2 y 6 de la evaluación). El protocolo CPC resulta en diferencias significativas entre el grupo control y entrenado en la media de valor del bloque acumulado del ensayo 2 al 6 (Figuras III.1D). Contrariamente, no encontramos diferencias en ese bloque entre el grupo control y el grupo entrenado, cuando se utilizó el protocolo de MCS. (Figura III.1 C,  $F_{3,116}=7.7$ ;  $p<0,05$ ; CT-CSM vs. EN-CSM:  $p$ :NS y CT-CPC vs. EN-CPC:  $p<0,05$ ).

Los resultados de esta sección indican que el protocolo CPC induce una fuerte MLT, la cual le permite al animal mostrar una mayor retención de la

Figura III.2

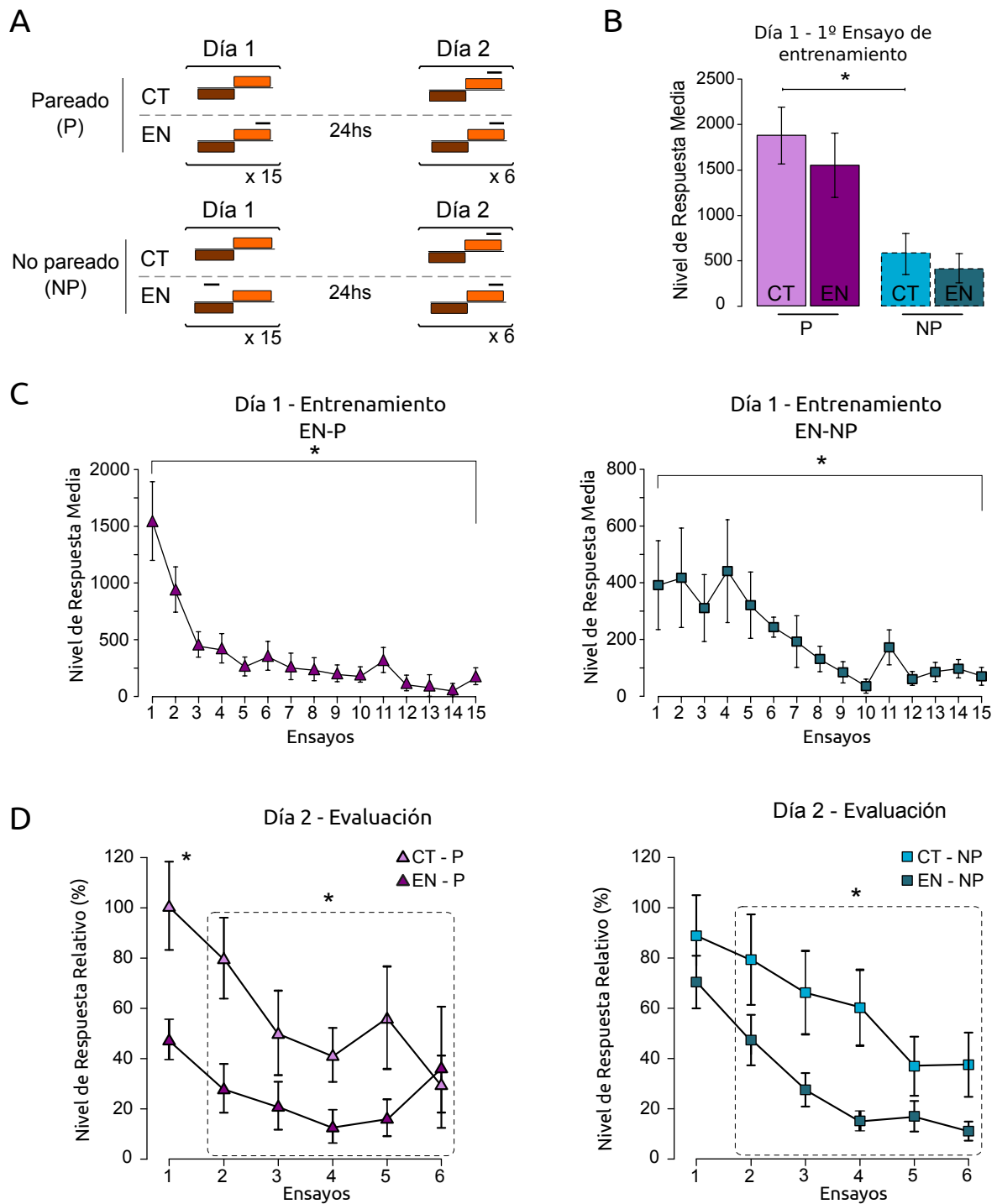


Figura III.2. (A) Diseño experimental. El protocolo para P es presentado en el panel de arriba. El protocolo para NP es presentado en el panel de abajo. El guión negro sobre el final de cada caja representa un EI. (B) Nivel de respuesta media al primer ensayo de entrenamiento. (C) A la izquierda se muestran las curvas de entrenamiento para cada ensayo para el grupo EN-P. A la derecha las curvas de entrenamiento para cada ensayo para el grupo EN-NP. (D) A izquierda se muestran las curvas de evaluación para los grupos CT-P/EN-P durante los 6 ensayos de evaluación. A la derecha las curvas de evaluación Para los grupos CT-NP/EN-NP durante los 6 ensayos de evaluación.

\*:  $p < 0.05$ .  $n=30$

memoria durante toda la sesión de testeo con respecto al protocolo de MCS en el cual no se cambia el contexto.

*III.2.2 El entrenamiento de condicionamiento pavloviano induce una asociación específica entre el contexto y el estímulo visual de peligro*

El siguiente experimento fue realizado con el objetivo de establecer si el protocolo de entrenamiento CPC implica una asociación entre las claves contextuales presentes en el entrenamiento y el estímulo visual de peligro.

El experimento consistió en 2 pares de grupos: un grupo fue entrenado usando el protocolo CPC (grupo P, pareado), mientras que el otro fue entrenado con el mismo patrón de cambio de luces, pero el estímulo aversivo fue presentado durante la mitad de la iluminación inferior (grupo NP, no pareado). Cada par contenía su respectivo control al cual se le realizaron los cambios de iluminación sin la presentación del estímulo visual de peligro. De esta manera, el segundo par de grupos representa la condición estrictamente no pareada. 24 hs luego del entrenamiento, la memoria de todos los grupos fue evaluada con 6 ensayos del protocolo CPC (Figura III.2.A).

Los resultados del entrenamiento muestran que hay diferencias significativas durante el primer ensayo entre los pares pareado y no pareado, con un nivel significativamente menor en el no pareado (Figura III.2.B,  $F_{3,116}=3.36$ ;  $p<0,05$ ; CT-P vs. CT-NP:  $p<0,05$  y EN-P vs. EN-NP:  $p:NS$ ). Estas diferencias son atribuidas a que en la condición de iluminación inferior el estímulo visual de peligro fue menos saliente para el grupo no pareado. Sin embargo, independientemente del bajo nivel de respuesta, pudo detectarse una curva de adquisición del aprendizaje (Figura III.2.C,  $F_{14,109}=11.92$ ;  $p<0,05$ ; E1-P vs. E15-P:  $p<0,05$  y E1-NP vs. E15-P:  $p:NS$ ). Más aún, en trabajos anteriores de nuestro laboratorio, Tomsic y colaboradores (Tomsic et al., 1991) demostraron que este animal es capaz de formar una MLT aún sin mostrar ningún tipo de respuesta medible durante el entrenamiento. Esto fue logrado

bajo el efecto del GABA, administrado previo a un entrenamiento de 15 ensayos. La conclusión principal de este trabajo fue que la ejecución de la respuesta no es una condición necesaria para la adquisición de esta memoria.

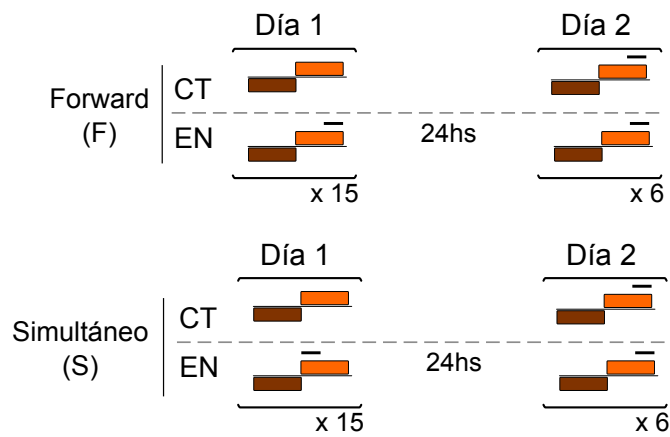
Volviendo a nuestro experimento, el par P mostró diferencias significativas entre el grupo control y el entrenado en el primer ensayo de la sesión de evaluación, mientras que no se encontraron diferencias en el par NP ( $F_{3,116}=3.36$ ;  $p<0,05$ ; CT-P vs. EN-P:  $p<0,05$  y CT-NP vs. EN-NP:  $p:NS$ ). Sin embargo, en la fase de reentrenamiento, ambos pares de grupos mostraron diferencias significativas entre los grupos entrenados y controles (Figura III.2.D,  $F_{3,116}=3.46$ ;  $p<0,05$ ; CT-P vs. EN-P:  $p<0,05$  y CT-NP vs. EN-NP:  $p<0,05$ ). Estos resultados indican que, aunque ambos protocolos inducen una retención de la memoria durante la fase de reentrenamiento, sólo la condición pareada fue capaz de inducir retención en el primer ensayo de evaluación. Una posible interpretación para este resultado es que la asociación entre el contexto dado por la iluminación superior y el EI puede ser establecida para este par de grupos y la presencia del EC predispone al animal a una baja respuesta al EI en el primer ensayo. Contrariamente, en el grupo no pareado, el contexto de iluminación superior no predice la llegada del EI. Sin embargo, la retención en este último grupo pudo ser manifestada durante los ensayos 2 al 6, lo cual sugiere un componente no asociativo de esta memoria (habitución), expresada como una rápida reducción en la respuesta de escape por los sucesivos ensayos, indicativo de reaprendizaje (saving, en la literatura inglesa; Pedreira et al., 1998).

### *III.2.3 Importancia de la relación temporal entre estímulos en el condicionamiento contextual*

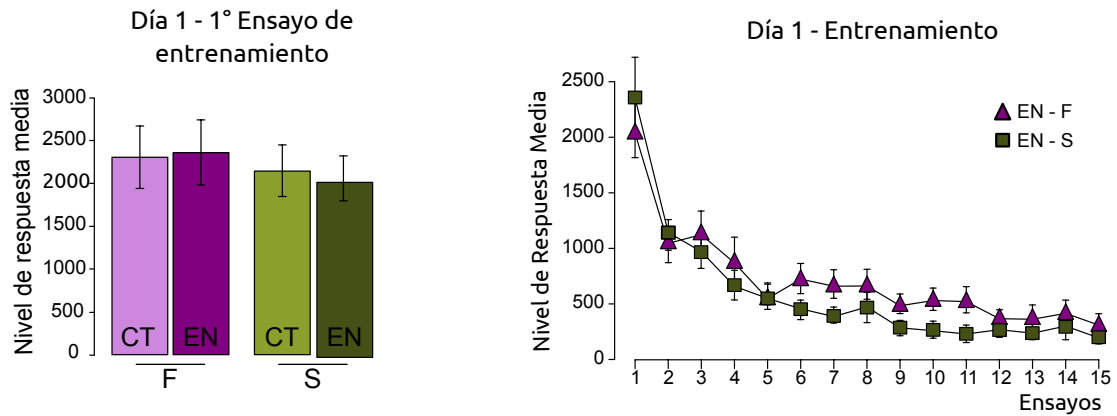
El diseño experimental utilizado para los experimentos anteriores fue del tipo *forward* (del inglés, hacia adelante), en el cual el EC fue presentado antes del EI y permaneció hasta que la presentación del EI finalizó. Generalmente

Figura III.3

A



B



C

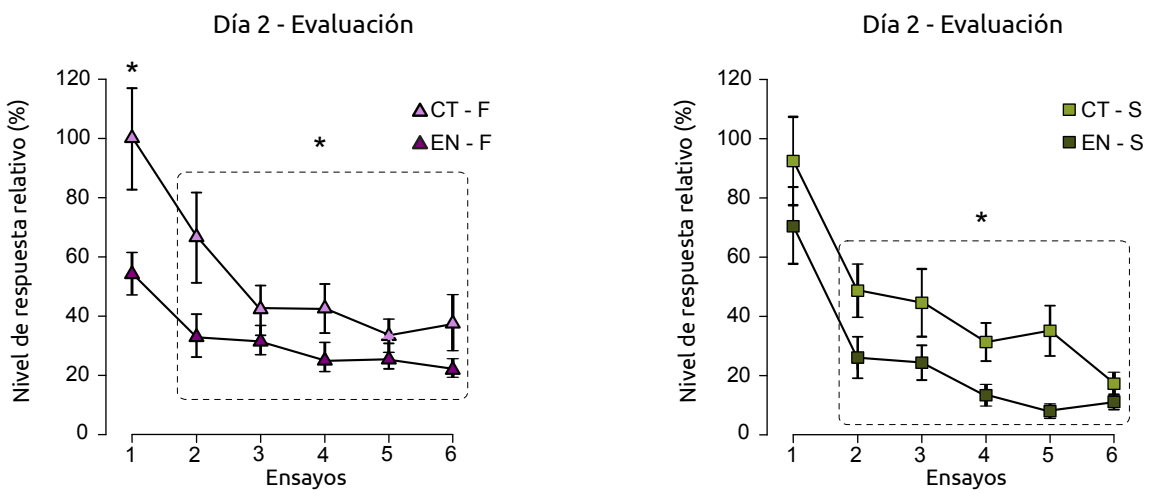


Figura III.3. (A) Diseño experimental. A la izquierda el protocolo para F y a la derecha el protocolo para S. El guión negro sobre el final de cada caja representa un EI. (B) A la izquierda el nivel de respuesta medio al primer ensayo de entrenamiento. A la derecha las curvas de entrenamiento para cada ensayo para ambos grupos entrenados. (C) A la izquierda las curvas de evaluación para los grupos CT-F/EN-F durante los 6 ensayos de evaluación. A la derecha las curvas de evaluación para los grupos CT-S/EN-S durante los 6 ensayos de evaluación.\*:  $p < 0.05$ .  $n=30$

este diseño es utilizado para generar la mayor asociación entre estímulos (Hall, G, 1994). Un protocolo no efectivo o menos efectivo implica un inicio sincrónico de ambos estímulos, de esta manera el EI permanece solo por un cierto tiempo mientras el EC aún continúa (Hawkins et al., 1986). Para comparar la efectividad entre ambos protocolos y de esta manera seguir evaluando las características asociativas del nuevo protocolo, realizamos el experimento que se describe a continuación.

Se incluyeron dos pares de grupos. En uno de los pares, un grupo fue entrenado con el protocolo CPC que implica la presentación *forward* (EN-F), y el otro par, un grupo fue entrenado usando el mismo cambio de iluminación pero con diferente esquema de presentación del estímulo aversivo. Para este grupo, el EI fue presentado durante los primeros 9seg del contexto de iluminación superior (EN-S; presentación simultánea) y durante los últimos 18seg el EC permaneció solo. Ambos pares de grupos contaron con su respectivo control el cual sólo fue sometido al cambio de iluminación con una única presentación del estímulo visual de peligro. Luego de 24hs todos los grupos fueron evaluados con 6 ensayos en la configuración del tipo CPC (Figura III.3.A).

Respecto al entrenamiento, no se encontraron diferencias entre los grupos entrenados con los distintos protocolos (Figura III.3.B,  $F_{3,116}=3,41$ ;  $P<0.05$ ), pero hubo diferencias entre el primer y el último ensayo para cada par de grupos ( $F_{14,109}=38,08$ ;  $P<0.001$ , E1-F vs. E15-F:  $P<0.001$  y E1-S vs. E15-S:  $P<0.001$ ). La ausencia de diferencia entre ambos tipos de entrenamiento puede ser explicada teniendo en cuenta que durante la adquisición la disminución de los niveles de respuesta está determinada fundamentalmente por un proceso no asociativo independiente del contexto y exclusivamente dependiente del estímulo aversivo (Romano et al., 1991; Suárez et al., 2010). Durante la sesión de evaluación (Figura III.3.C), se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el entrenado en el primer ensayo para el par F, pero no para el par S ( $F_{3,116}=3,41$ ;  $p<0,05$ ; CT-F vs. EN-F:  $p<0,05$  y CT-S vs. EN-S:  $p:NS$ ). Sin embargo, en la fase de reentrenamiento, ambos pares de

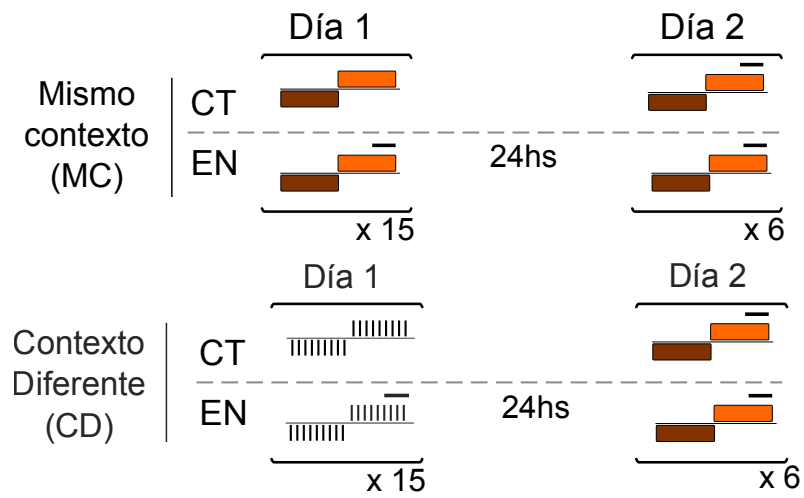
grupos mostraron diferencias significativas ( $F_{3,116}=3,69$ ;  $p<0,05$ ; CT-F vs. EN-F:  $p<0,05$  y CT-S vs. EN-S:  $p<0,05$ ). La retención encontrada durante el reentrenamiento puede ser atribuida al componente no asociativo del proceso de aprendizaje (Maldonado et al., 1997). Más aún, sólo la condición *forward* fue capaz de inducir retención al primer ensayo de evaluación, en el cual el componente asociativo de la memoria es expresado únicamente, sin la interferencia del proceso de reentrenamiento que se desencadena en los siguientes ensayos. El protocolo CPC fue más efectivo que el simultáneo en el establecimiento de la asociación entre el contexto de iluminación superior y el estímulo visual de peligro. De esta manera, la presencia del contexto antes de la presentación del EI, le permite al animal realizar la respuesta de congelamiento en el primer ensayo de evaluación. Contrariamente, el mismo contexto de iluminación superior no es capaz de predecir la llegada del estímulo visual de peligro si el comienzo de ambos estímulos ocurre de manera simultánea. Por lo tanto, los animales escapan en el primer ensayo de la evaluación. En resumen, el paradigma CPC comparte la propiedad de la relación temporal entre los estímulos con la mayoría de las tareas de condicionamiento.

#### *III.2.4 La tarea de condicionamiento desarrollada es una asociación contextual y no una asociación de clave*

En los experimentos mostrados en las secciones anteriores demostramos que la condición pareada, y no la estrictamente no-pareada, y que la condición *forward*, y no la presentación simultánea de los estímulos, induce una retención de largo término. Estos resultados sugieren el establecimiento de una asociación entre el contexto de iluminación superior y el estímulo visual de peligro. La luz desde arriba se presenta en cada ensayo durante el entrenamiento y posee un alto valor predictivo ya que antecede la llegada del EI. En estas circunstancias, la iluminación superior podría ser interpretada como clave y no como contexto. Sin embargo, como mencionamos

Figura III.4

**A**



**B**

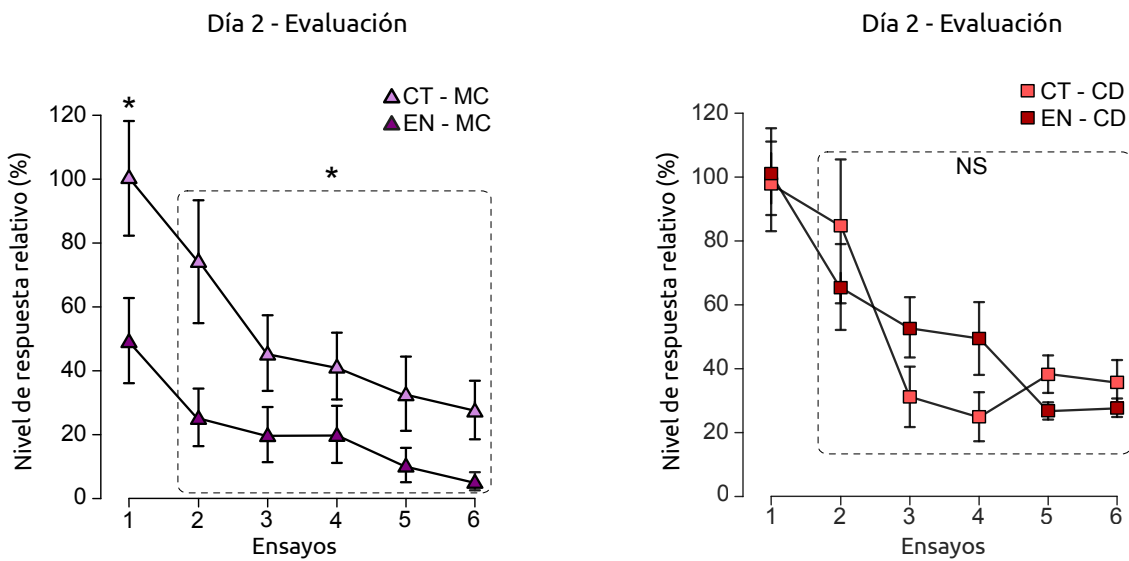


Figura III.4. (A) Diseño experimental. Arriba el protocolo para MC y abajo el protocolo para CD; las rayas en las cajas representan el contexto diferente. El guión negro sobre el final de cada caja representa un EI. (B) A la izquierda las curvas de evaluación para los grupos CT-MC/EN-MC durante los 6 ensayos de evaluación. A la derecha las curvas de evaluación para los grupos CT-CD/EN-CD durante los 6 ensayos de evaluación.\*:  $p < 0.05$ .  $n=30$



anteriormente, el animal es capaz de establecer una asociación multimodal entre el contexto y el estímulo visual de peligro. Por lo tanto sería posible que en el protocolo CPC la conjunción de las claves contextuales con la luz desde arriba represente el EC. Entonces, para caracterizar el proceso de aprendizaje generado por el protocolo de entrenamiento CPC, examinamos si la MLT se expresaba sólo cuando la iluminación superior ocurría en el mismo contexto o era capaz de generalizarse a otros contextos con el mismo tipo de iluminación. A continuación describimos el experimento realizado.

Nuevamente utilizamos dos pares de grupos control y entrenado. En este caso un grupo fue entrenado con el protocolo CPC en el dispositivo experimental usual, contenedor naranja (mismo contexto, MC) y el otro grupo fue entrenado con el mismo protocolo pero en un contexto diferente, contenedor con rayas blancas y negras (contexto diferente, CD). Ambos pares contaron con un grupo control, al cual no se le presentó el estímulo visual de peligro pero con la misma exposición a los contextos de luz. Previamente, se ha establecido que esta diferencia visual es suficientemente saliente para el cangrejo en las condiciones de entrenamiento habituales como para diferencias ambos contextos (Tomsic et al., 1998; Pedreira et al., 2002). A 24hs del entrenamiento la memoria de todos los grupos fue evaluada con 6 ensayos en el contexto habitual de paredes naranja y sin bandas (Figura III.4.A).

Los resultados de la sesión de evaluación se encuentran en la figura III.4.B. El par CT-MC /EN-MC mostró diferencias significativas en el primer ensayo. Estas diferencias se debieron al bajo nivel de respuesta del grupo entrenado comparado con el grupo control. Por el contrario, el par CT-CD / EN-CD no mostró diferencias entre los grupos debido a que el grupo entrenado presentó el mismo nivel de respuesta que el grupo control ( $F_{3,116}=3,89$ ;  $p<0,05$ ; CT-SC vs. EN-SC:  $p<0,05$  y CT-DC vs. EN-DC:  $p$ : NS). Más aún, en la fase de reentrenamiento el par CT-MC/EN-MC mostró las diferencias esperadas para el bloque de los ensayo 2 al 6, mientras que estas diferencias no estuvieron presentes en el par CT-CD/EN-CD ( $F_{3,116}=3,69$ ;  $p<0,05$ ; CT-SC vs. EN-SC:  $p<0,05$

y CT-DC vs. EN-DC: p: NS).

Los resultados de este experimento indican que la memoria CPC es contexto específica, independientemente de que la iluminación presentada en ambos contextos haya sido la misma. Esto indica que el contexto de iluminación superior actúa como parte del EC y no como una clave por en sí misma. En este caso, la luz de arriba podría funcionar como un indicador de ocasión (*occasion setter*, en la literatura inglesa) (Brembs y Wiener, 2006; Holland, P. C., 1983).

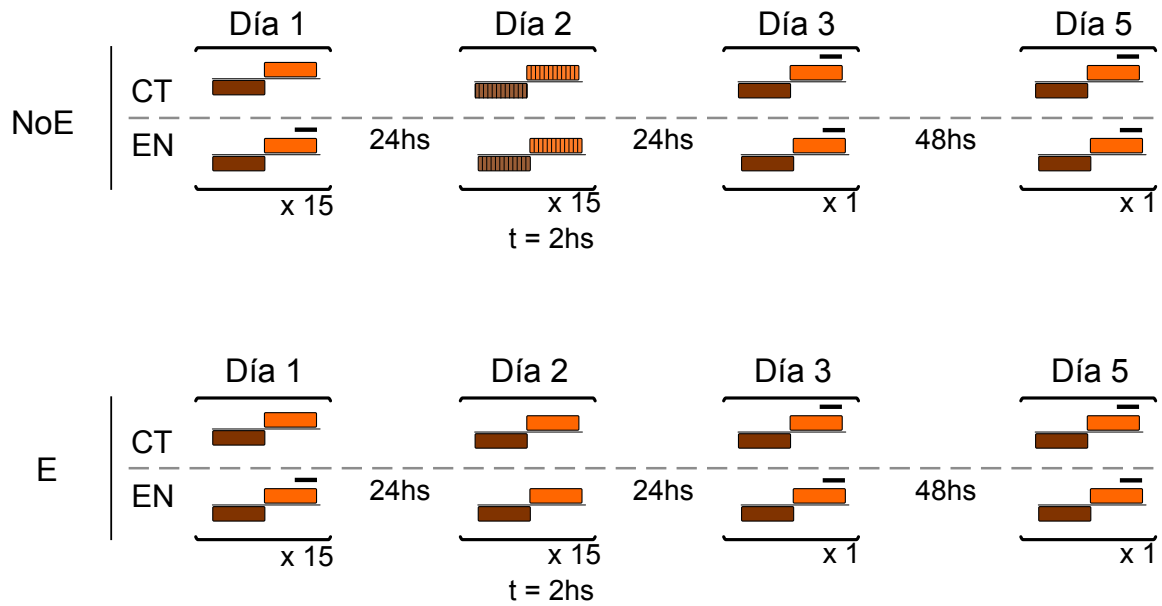
### *III.2.5 El proceso de extinción en la memoria de condicionamiento pavloviano*

El proceso de extinción es una característica universal de los aprendizajes asociativos. En la MCS del cangrejo *Neohelice* se encontró que la extinción ocurre cuando los animales son reexpuestos en forma prolongada al contexto de entrenamiento. La memoria de extinción fue inducida utilizando exposiciones continuas o discretas al contexto de entrenamiento. Para que la extinción tenga lugar, las exposiciones debían alcanzar un mínimo de entre 1 y 2 hs de duración (Hepp et al., 2009; Pedreira y Maldonado, 2003). Esta nueva memoria era de carácter temporal. A medida que pasaba el tiempo, ocurría una recuperación espontánea de la memoria original (Merlo y Romano, 2008; Hepp et al., 2009). Teniendo en cuenta la estructura del EC en el nuevo paradigma, optamos por utilizar para el protocolo de extinción ensayos que consistían en el cambio de iluminación por un tiempo total de reexposición de 2hs.

En el día 1, dos pares de grupos CT y EN recibieron un protocolo de entrenamiento CPC. Al día siguiente, un par de grupos recibió una sesión de extinción (Extinguido, E). Esta sesión consistió en la presentación de 15 ensayos de cambio de iluminación en la cual cada ensayo duraba más que el tradicional, de modo tal de asegurarse una reexposición de 2hs en la iluminación superior. El otro par de grupos fue sometido al mismo esquema

Figura III.5

A



B

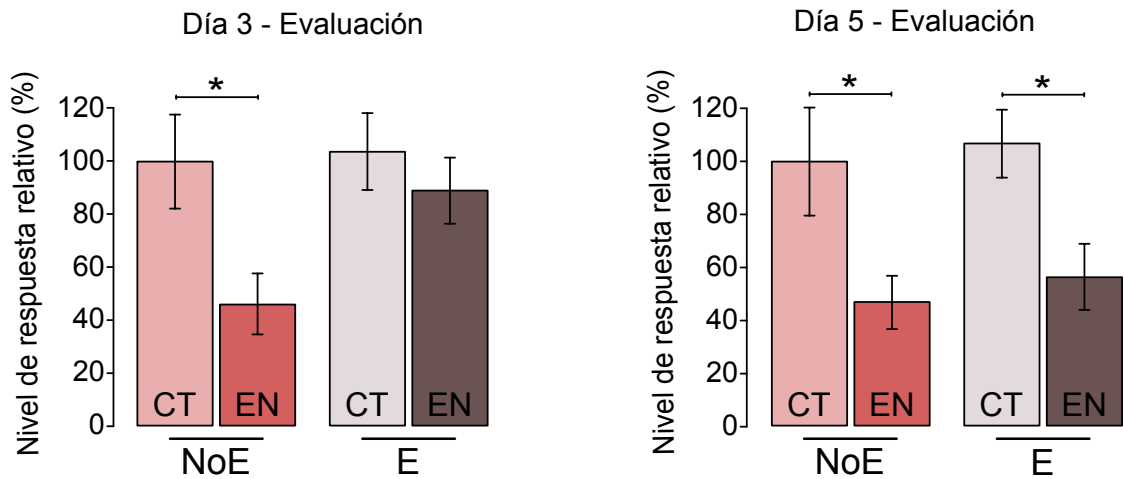


Figura III.5. (A) Diseño experimental. Arriba el protocolo para NoE y abajo el protocolo para E; las rayas en las cajas representan el contexto diferente. El guión negro sobre el final de cada caja representa un EI. (B) A la izquierda los niveles de respuesta relativos para el ensayo de evaluación en el día 3 para los grupos CT-NoE/EN-NoE y CT-E/EN-E. A la derecha, los niveles de respuesta relativos para el ensayo de evaluación en el día 5 para los grupos CT-NoE/EN-NoE y CT-E/EN-E. \*:  $p < 0.05$ .  $n=30$

de iluminación, pero en un contexto diferente (No extinguido, NoE) (Figura III.5.A).

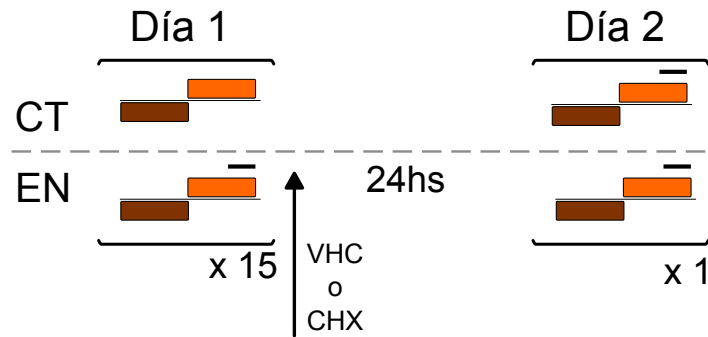
La memoria fue evaluada con una única presentación del estímulo visual de peligro. Como puede verse en el gráfico de la izquierda de la figura III.5.B, sólo el par NoE muestra retención de la memoria dada la diferencia en el nivel de respuesta entre el grupo CT y EN, mientras que en el par E no hay diferencias entre los grupos, indicando que la sesión de 2hs fue efectiva para inducir la extinción ( $F_{3,116}=3,18$ ;  $p<0,05$ ; CT-NoE vs. EN-NoE:  $p<0,05$  and CT-E vs. EN-E2:  $p$ : NS). Para confirmar que la falta de retención de la memoria se debía a un proceso de extinción, evaluamos la existencia de recuperación espontánea de la memoria original evaluando a los cangrejos con 6 ensayos luego de 48hs desde la primera sesión de evaluación. La recuperación espontánea fue descrita previamente en el protocolo de entrenamiento MCS (Merlo y Romano, 2008; Hepp et al., 2009). En este experimento encontramos retención de la memoria para ambos pares de grupos (Figura III.5.B derecha), indicando que la memoria de extinción decayó durante esos dos días y la memoria original pudo volver a expresarse ( $F_{3,116}=3,36$ ;  $p<0,05$ ; CT-NoE vs. EN-NoE:  $p<0,05$  y CT-E2 vs. EN-E2:  $p<0,05$ ).

### *III.2.6 Dependencia de la síntesis de proteínas en la consolidación de la memoria de condicionamiento pavloviano*

Una característica universal de las memorias que perduran por al menos un día es su dependencia de la síntesis de proteínas durante la consolidación. Para evaluar si la memoria CPC es dependiente de la síntesis de proteínas, realizamos un experimento utilizando los mismos dos pares de grupos que en las secciones anteriores. Inmediatamente luego del entrenamiento, un par de grupos fue inyectado con solución vehículo (VHC) y el otro par fue inyectado con  $40\mu\text{g}/\text{animal}$  del inhibidor de la traducción, cicloheximida (CHX). Esta dosis es comúnmente usada en nuestro laboratorio para inducir efectos amnésicos

Figura III.6

A



B

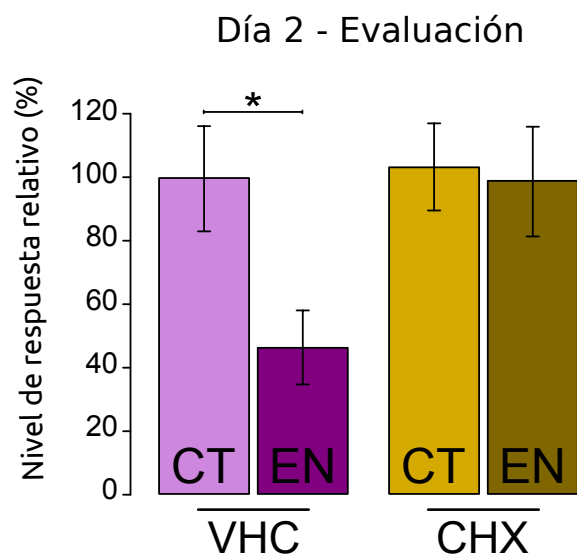


Figura III.6. (A) Diseño experimental. Las inyecciones se realizaron inmediatamente luego del entrenamiento. El guión negro sobre el final de cada caja representa un EI. (B) Niveles de respuesta relativos para el ensayo de evaluación en el para los grupos CT-VHC/EN-VHC y CT-CHX/EN-CHX. \*:  $p < 0.05$ .  $n=30$

(ej: Pérez-Cuesta y Maldonado, 2009). Un día luego del entrenamiento, los animales fueron evaluados con un ensayo, como se realiza usualmente en los experimentos farmacológicos (Figura III.6.A).

En la figura III.6.B se muestran los resultados para el ensayo de evaluación de la memoria. Como era de esperar, la comparación entre los grupos CT y EN inyectados con VHC presentó diferencias significativas, lo cual indica retención de la memoria. Contrariamente, el par inyectado con CHX no mostró diferencias significativas, indicando un efecto amnésico de la droga ( $F_{3,116}=3,93$ ;  $p<0,05$ ; CT-VHC vs. EN-VHC:  $p<0,05$  y CT-CHX vs. EN-CHX:  $p$ : NS). Estos resultados indican que la memoria CPC es dependiente de la síntesis proteica.

### *III.2.7 Un antagonista del receptor GABA<sub>A</sub> facilita la consolidación de la memoria de condicionamiento pavloviano*

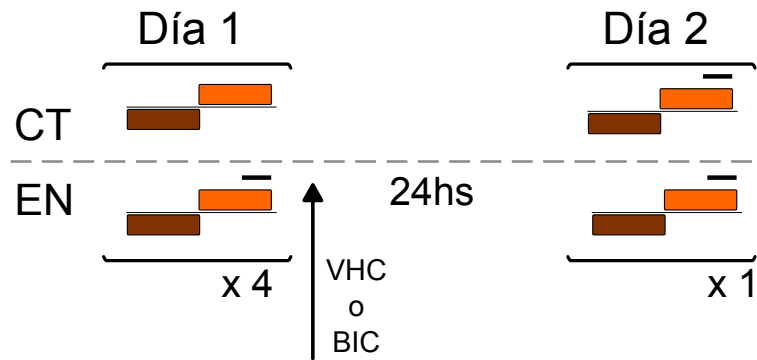
Otra característica general de la MLT es que puede ser facilitada por la administración de drogas que incrementan la actividad excitatoria neuronal. Trabajos previos de nuestro laboratorio encontraron que la bicuculina, un antagonista de los receptores del tipo GABA<sub>A</sub>, induce una facilitación de la MLT en el cangrejo *Neohelice* (Carbo Tano et al., 2009). Con el objetivo de analizar si también era posible de facilitar la memoria CPC con este antagonista, realizamos el experimento que se describe a continuación.

Entrenamos dos pares de grupos CT-EN de animales con un protocolo de entrenamiento débil que consistió en 4 ensayos. Luego administramos 2,69 $\mu$ g/g de bicuculina (BIC) a un par CT-EN mientras el otro par recibió una inyección de vehículo (VHC). Un día después del entrenamiento los animales fueron evaluados con un ensayo (Figura III.7.A).

Los resultados de la sesión de evaluación se muestran en la Figura III.7.B. No hubieron diferencias entre los grupos CT y EN inyectados con VHC, como se esperaba luego de un protocolo de entrenamiento débil. Sin embargo,

Figura III.7

A



B

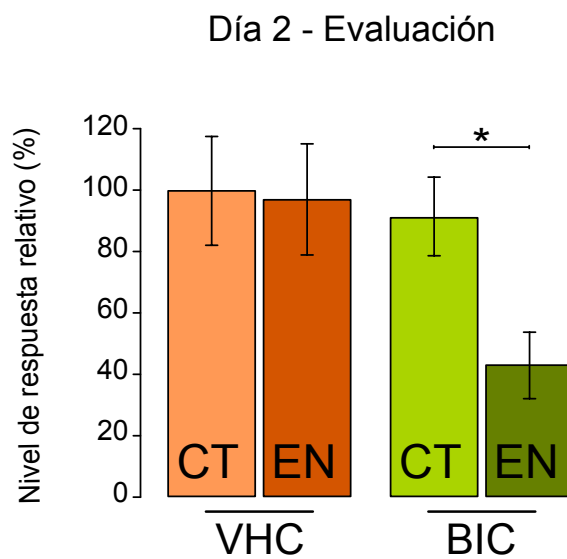


Figura III.7. (A) Diseño experimental. Las inyecciones se realizaron inmediatamente luego del entrenamiento. El gui3n negro sobre el final de cada caja representa un EI. (B) Niveles de respuesta relativos para el ensayo de evaluaci3n en el para los grupos CT-VHC/EN-VHC y CT-BIC/EN-BIC.

\*:  $p < 0.05$ .  $n=30$

encontramos diferencias significativas entre los grupos CT y EN inyectados con bicuculina, indicando que la consolidación de la memoria pudo ser facilitada ( $F_{3,116}=2,96$ ;  $p<0,05$ ; CT-VHC vs. EN-VHC:  $p$ :NS y CT-BIC vs. EN-BIC:  $p<0,05$ ).

### *III.2.8 El condicionamiento pavloviano induce una respuesta anticipatoria*

Una vez que el condicionamiento pavloviano se ha establecido, la presentación del EC predice la ocurrencia del EI e induce una respuesta condicionada (respuesta anticipatoria). La RC es esperada cuando el animal es reexpuesto al contexto de entrenamiento. Sin embargo, utilizando el entrenamiento de MCS nunca se pudo establecer una respuesta anticipatoria durante la re-exposición al contexto. Basados en la contingencia aparentemente más fuerte establecida por el paradigma CPC en comparación con el tradicional, esta serie de experimentos tiene como objetivo analizar si la respuesta anticipatoria es expresada en este nuevo aprendizaje cuando el animal es expuesto al contexto de entrenamiento. En el siguiente experimento exploramos la posible presencia de una respuesta de *freezing* cuando aparece el contexto de iluminación superior. Un par CT-EN recibió un entrenamiento de 15 ensayos y al día siguiente evaluamos la memoria con dos ensayos de cambio de iluminación. El primer ensayo consistió en presentar el cambio de iluminación sin el estímulo visual de peligro mientras que en el segundo ensayo se presentó el estímulo aversivo (Figura III.8.A, diagrama de la izquierda). El primer ensayo fue dividido en 5 bloques (b1-b5) de 9seg cada uno. El primer bloque corresponde a los últimos 9seg de la actividad básica iluminado desde abajo. Los bloques 2 al 4 corresponden a los 27seg totales de iluminación desde arriba y el último bloque corresponde a los primeros 9seg del intervalo entre ensayos iluminado desde abajo. En el segundo ensayo se analizaron los 9seg durante la presentación del estímulo visual de peligro (Figura III.8.A, diagrama de la derecha).



Figura III.8

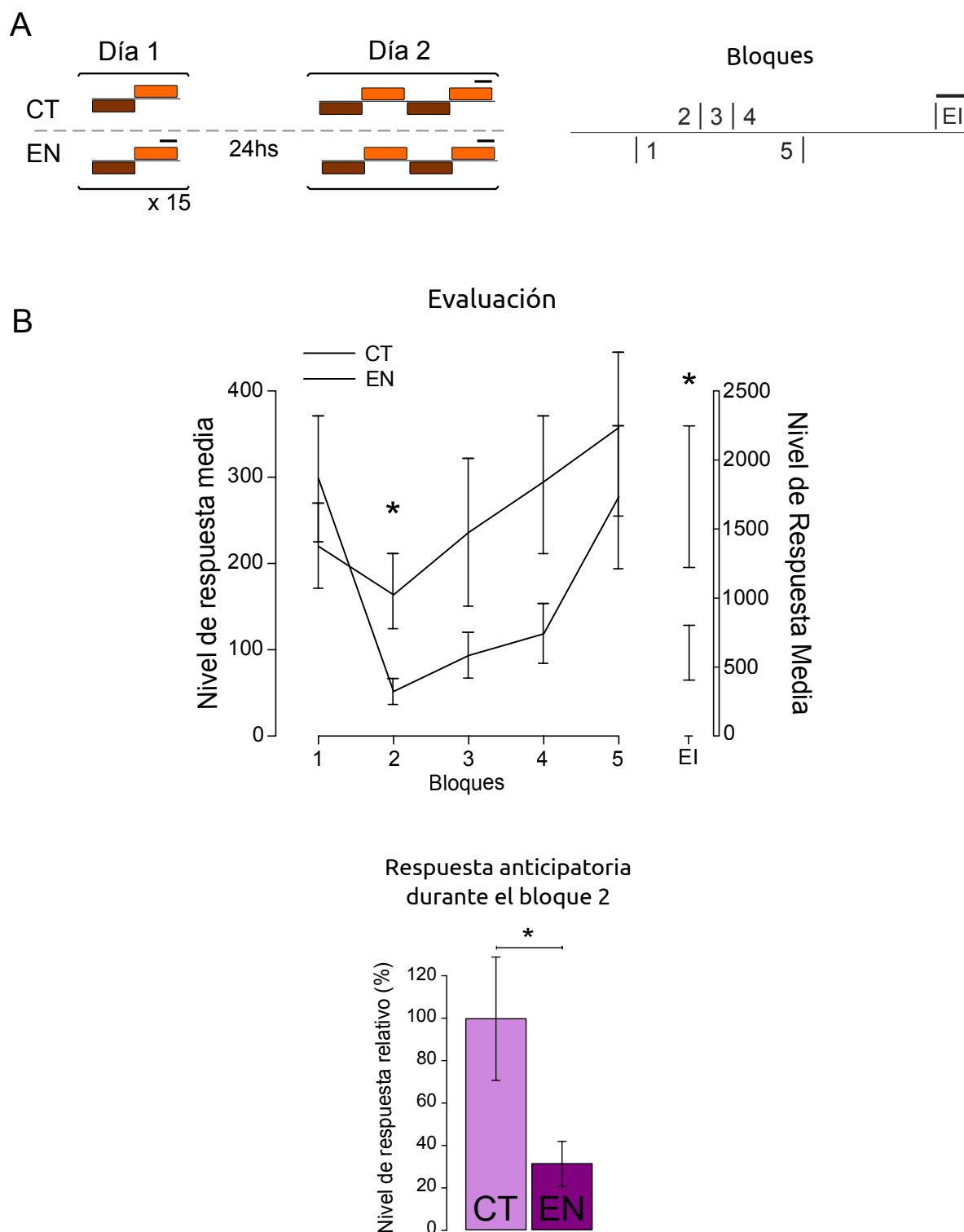


Figura III.8. (A) Panel izquierdo: diseño experimental. Panel derecho: detalle de los bloques de datos tomados durante la sesión de evaluación en el Día 2 (b1-b5 y el ensayo con la presentación del EI). (B) Panel de arriba: Niveles de respuesta relativos para sesión de evaluación para ambos grupos. Se muestran los niveles de respuesta durante los 5 bloques así como también la respuesta para la presentación del EI. Respuestas medias  $\pm$  S.E.M. Panel de abajo: Respuestas medias  $\pm$  S.E.M. durante el b2, normalizado con respecto a la respuesta media del CT. \*:  $p < 0.05$ .  $n = 30$

Los resultados se muestran en la figura III.8.B. Durante el primer bloque (b1) de exposición a iluminación inferior no hubo diferencias entre los grupos CT y EN ( $F_{1,58}=0,4$ ;  $p=0,5$ ). Sin embargo, luego del cambio de iluminación, la actividad del grupo entrenado cayó marcadamente a niveles más bajos, indicando que la mayoría de los animales realizó una respuesta de *freezing* (b2) ( $F_{1,58}=5,54$ ;  $p<0,05$ ). Esta diferencia en la actividad sugiere una respuesta anticipatoria al EC (contexto de iluminación superior). Durante los primeros 9seg del intervalo entre ensayos con la iluminación inferior (b5), nuevamente los animales muestran el mismo nivel de actividad para ambos grupos ( $F_{1,58}=1,72$ ;  $p:NS$ ). Finalmente, en el segundo ensayo se midió la respuesta de escape al estímulo visual de peligro y se encontraron las diferencias esperadas entre ambos grupos ( $F_{1,58}=8,34$ ;  $p<0,05$ ). Considerando que el b2 incluye el cambio de iluminación, parecería ser el mejor indicador de la respuesta anticipatoria (Figura III.8.B panel derecho)

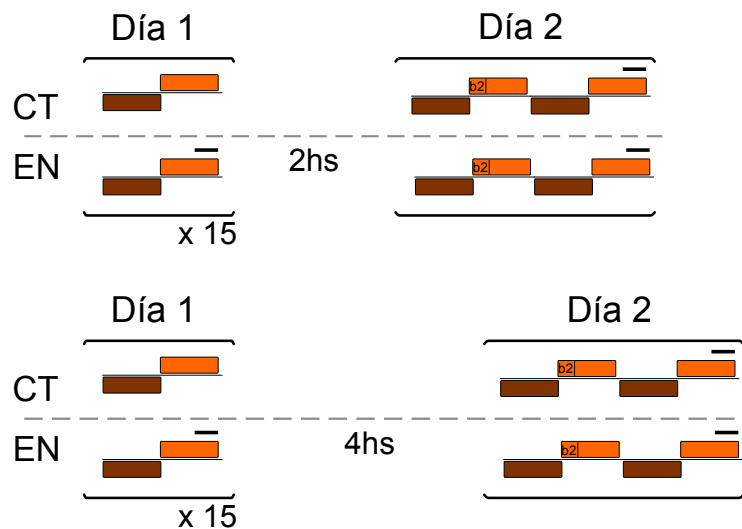
### *III.2.9 La respuesta anticipatoria de la memoria de corto término es expresada en períodos mayores a 2hs.*

En estudios previos que utilizaban el protocolo tradicional de MCS, la retención de corto término de la respuesta al estímulo visual de peligro fue atribuida al componente no asociativo de la memoria. Tal proceso induce una reducción general en la respuesta que no es específica del estímulo o de las características del contexto (Romano et al., 1991). El siguiente experimento tuvo como objetivo evaluar la presencia de una memoria de corto término (MCT) inducida por el protocolo de entrenamiento CPC. A su vez, nos interesaba abordar la posible diferencia entre un *freezing* anticipatorio como expresión de una memoria asociativa y de un *freezing* en respuesta al El como expresión de una memoria no asociativa.

En este caso, nuevamente utilizamos los dos pares CT-EN entrenados con 15 ensayos y evaluados con 2 ensayos a las 2hs o a las 4hs. La evaluación

Figura III.9

A



B

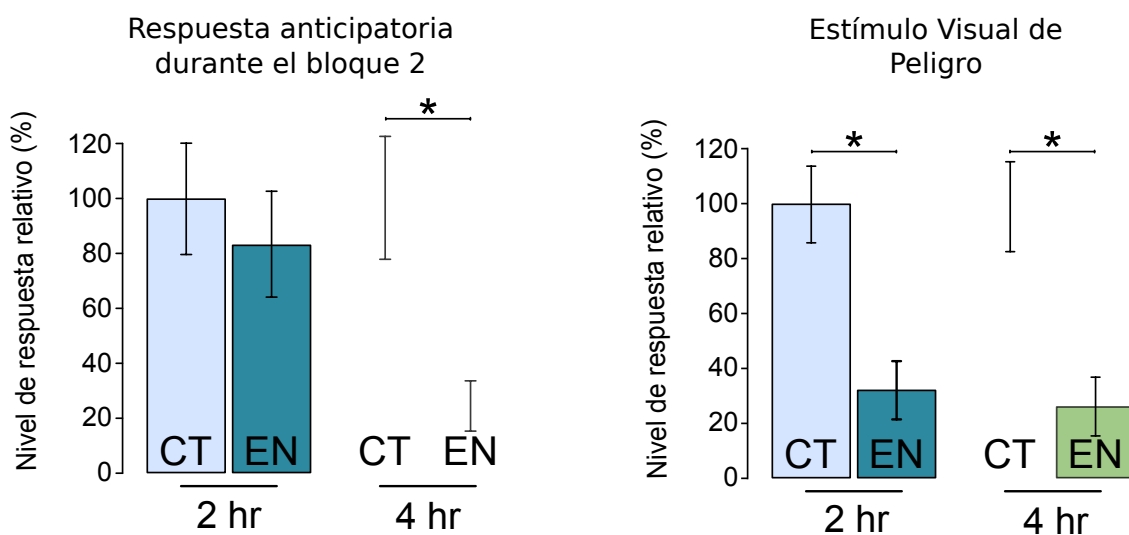


Figura III.9. (A) Diseño experimental. (B) Panel izquierdo: respuestas medias  $\pm$  S.E.M. durante el b2, normalizado con respecto a la respuesta media del CT-2hs. Panel derecho: respuestas medias  $\pm$  S.E.M. durante el b2, normalizado con respecto a la respuesta media del CT-4hs. \*:  $p < 0.05$ .  $n=30$

consistió en los mismos 2 ensayos explicados en la sección anterior, uno sin la presentación del estímulo visual de peligro y el otro con el estímulo aversivo (Figura III.9.A).

Los resultados se muestran en la Figura III.9.B. Cuando analizamos la respuesta al cambio de iluminación durante el b2 del primer ensayo, encontramos diferencias a las 4hs pero no a las 2hs ( $F_{3,116}=3,24$ ;  $p<0,05$ ; 2hs  $p$ :NS y 4hs  $p<0,05$ ). El segundo ensayo mostró diferencias significativas entre los grupos CT y EN tanto a las 2hs como a las 4hs ( $F_{3,116}=5,65$ ;  $p<0,05$ ; 2hs  $p<0,05$  y 4hs  $p<0,05$ ). Como conclusión de este experimento podemos decir que a las 2hs la memoria asociativa no está completamente consolidada y por lo tanto, no puede ser expresada. La respuesta de *freezing* al EI que se observó a las 2hs podría ser atribuida al componente no asociativo. Por el contrario, 4hs luego del entrenamiento, ambos componentes de la memoria están presentes y son expresados.

### III.3 DISCUSIÓN

En este capítulo nos propusimos desarrollar una tarea de condicionamiento contextual en el cangrejo *Neohelice*. Esta tarea nos permitió realizar estudios comparativos sobre los mecanismos de reconsolidación de la memoria asociativa contextual con otros grupos de organismos. De esta manera, obtuvimos evidencias que indican que el cangrejo *Neohelice* establece una asociación entre un contexto particular y un estímulo aversivo, llamado estímulo visual de peligro (EI). Inicialmente encontramos que dicha asociación ocurre sólo si los estímulos son presentados de manera pareada (Figura III.2). Un diseño estrictamente no pareado no desencadena una respuesta de *freezing* (respuesta condicionada) cuando se presenta el EI, indicando que el estímulo aversivo no está asociado con las características generales del dispositivo experimental, sino con los rasgos particulares del contexto de iluminación superior. Este resultado nos permite descartar la interpretación

de una habituación en lugar de una asociación dado que el diseño no pareado no mostró retención de la memoria, aunque recibieron un entrenamiento fuerte de presentación reiterada del estímulo de peligro.

Como es característico en el condicionamiento pavloviano, el diseño de inicio de la presentación del estímulo aversivo de manera simultánea con el contexto de iluminación superior (Figura III.3) no mostró retención de la memoria en el primer ensayo de evaluación. Sin embargo, encontramos una disminución significativa en la respuesta de los animales entrenados entre los ensayos 2 y 6. Esto es indicativo de que bajo la condición simultánea no se establece una asociación entre el contexto y el EI, pero que la presentación repetida del EI induce una habituación que puede ser expresada durante la fase de reentrenamiento. Más aún, encontramos que la respuesta de *freezing* adquirida durante el entrenamiento no es expresada cuando se cambian las características relevantes del contexto (Contenedor rayado vs. contenedor liso) durante la evaluación (Figura III.4). En tales condiciones, no hubo retención de la memoria a pesar de una iluminación idéntica en ambos contextos. Estos resultados están a favor de estudios previos que demostraron que los cangrejos perciben al mismo contexto bajo distintas condiciones de iluminación como ambientes diferentes (Hepp et al., 2009; Pérez-Cuesta y Maldonado, 2009). Esta diferencia en la percepción indica que la iluminación superior no está actuando como una clave asociada al EI por sí misma, sino que la combinación de la iluminación con determinadas características del contexto es lo que define el EC en este nuevo paradigma. A su vez, trabajos previos indican que una luz puntual puede ser capaz de funcionar en el cangrejo como un EC para inducir un condicionamiento de la respuesta cardíaca (Burnovicz y Hermitte, 2010). A diferencia del trabajo mencionado, en el caso del CPC no hay una luz focal sino una iluminación general difusa.

Como dijimos anteriormente, en el protocolo tradicional la iluminación superior estaba presente durante toda la sesión de entrenamiento lo cual le otorgaba un bajo valor predictor al EC y no era posible encontrar una

respuesta anticipatoria. Contrariamente, con el nuevo paradigma encontramos una clara respuesta anticipatoria luego del cambio de iluminación inferior a superior durante el primer ensayo de evaluación (Figura III.8). De esta manera, en el nuevo protocolo encontramos una fuerte relación entre estímulos (EC-EI) que se reflejó tanto en establecer la contingencia (Figura III.3) como en la relación temporal requerida por los estímulos para desarrollar el condicionamiento (Figura III.4).

Durante el entrenamiento, los cangrejos fueron expuestos a dos condiciones contextuales, pero sólo una fue presentada de manera pareada con el EI. Nosotros interpretamos esas diferencias en el diseño como condicionamientos diferenciales. El contexto de iluminación superior puede ser considerado como EC+ (reforzado) y el contexto de iluminación inferior como EC (no reforzado). La falta de respuesta anticipatoria durante la presentación de la iluminación inferior (bloque 1 en la Figura III.8.B) es un dato a favor de dicha interpretación.

Encontramos características de la memoria en el protocolo de CPC que son comunes a otras memorias de aprendizajes asociativos tanto a nivel comportamental como de mecanismos. Inicialmente encontramos MCT que se expresa 2hs luego del entrenamiento (Figura III.9). Notablemente, esta memoria no se expresa con la presentación del EC, pero sí con la presentación de EI. Contrariamente, 4hs luego del entrenamiento pudo observarse una respuesta de *freezing* tanto con la presentación del EC como con la del EI. Nosotros postulamos que inicialmente se expresa una MCT no asociativa y luego, una vez que la consolidación de esta memoria está completa, la MCT es reemplazada por una MLT asociativa. Son necesarios otros experimentos para evaluar si la memoria expresada a las 4hs posee distintas características que la memoria expresada 24hs luego del entrenamiento. En este sentido, trabajos previos con este modelo indicaron que la retención de corto término (a menos de 2 hs) puede ser expresada por un mecanismo inespecífico dependiente de opioides (Romano et al., 1991).

Una característica universal de las MLT es su dependencia de la síntesis

proteica durante las primeras horas luego del entrenamiento. Como era de esperar, la consolidación de la memoria de CPC fue sensible a la cicloheximida cuando se administró inmediatamente después del entrenamiento (Figura III.6). Más aún, fue posible facilitar la memoria de CPC durante la consolidación con la administración del antagonista GABAérgico bicuculina (Figura III.7). Trabajos anteriores con este antagonista demostraron efectos facilitadores de la memoria en diferentes especies, incluyendo al cangrejo *Neohelice* (Carbo Tano et al., 2009).

Como otras memorias asociativas, encontramos que la memoria de CPC experimentó un proceso de extinción cuando los cangrejos fueron expuestos al contexto de iluminación superior un día luego del entrenamiento (Figura III.5). La extinción fue alcanzada sólo cuando la exposición al contexto fue por 2hs, similar a lo observado en el protocolo tradicional (Hepp et al., 2009; Pedreira et al., 2004).

El desarrollo de este nuevo paradigma es una herramienta importante a la hora de buscar sustratos neuronales que codifiquen para la representación del contexto debido a la posibilidad de una presentación discreta del mismo (Sztarker y Tomsic, 2011). Más aún, como veremos en los próximos capítulos de esta Tesis, el ajuste de este nuevo paradigma a la definición de condicionamiento pavloviano, permite estudios comparativos con otros paradigmas que pueden compartir componentes a nivel molecular y celular.

# Capítulo IV

**El papel de NF-kB en la memoria de  
condicionamiento pavloviano contextual en  
*Neohelice***



## **El papel de NF-κB en la memoria de condicionamiento pavloviano contextual en *Neohelice granulata***

### IV.1 INTRODUCCIÓN

Originalmente descubierto en linfocitos, el factor de transcripción NF-κB es conocido desde hace tiempo por estar presente también en el sistema nervioso central de mamíferos. 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 son producto del clivaje proteolítico de precursores más grandes, p105 y p100, respectivamente. Todos los miembros pueden formar tanto homodímeros como heterodímeros, salvo Rel B que sólo puede formar heterodímeros. El término NF-κB 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).

El factor de transcripción NF-κB está involucrado en la respuesta inmune de vertebrados (Korner et al., 1989), en isquemia y estrés oxidativo (O'Neill y Kaltschmidt, 1997) y unos pocos reportes lo asociaban con la plasticidad neuronal (Meberg et al., 1996; Unlap y Jope, 1995). En nuestro laboratorio se realizaron los primeros estudios que determinaron que el factor de transcripción NF-κB tiene un rol importante en la formación de la memoria. Estos estudios permitieron determinar la existencia de NF-κB en el cangrejo *Neohelice granulata* y la importancia de su actividad durante la formación de la memoria (Freudenthal et al., 1998; Freudenthal y Romano, 2000)

El factor de transcripción NF-κB se encuentra inactivo fuera del núcleo por la presencia de un inhibidor específico llamado IκB que, cuando se encuentra unido a NF-κB, ocluye su secuencia señal de localización nuclear. Señales

Figura IV.1

Rel/NF- $\kappa$ B en el sistema nervioso central

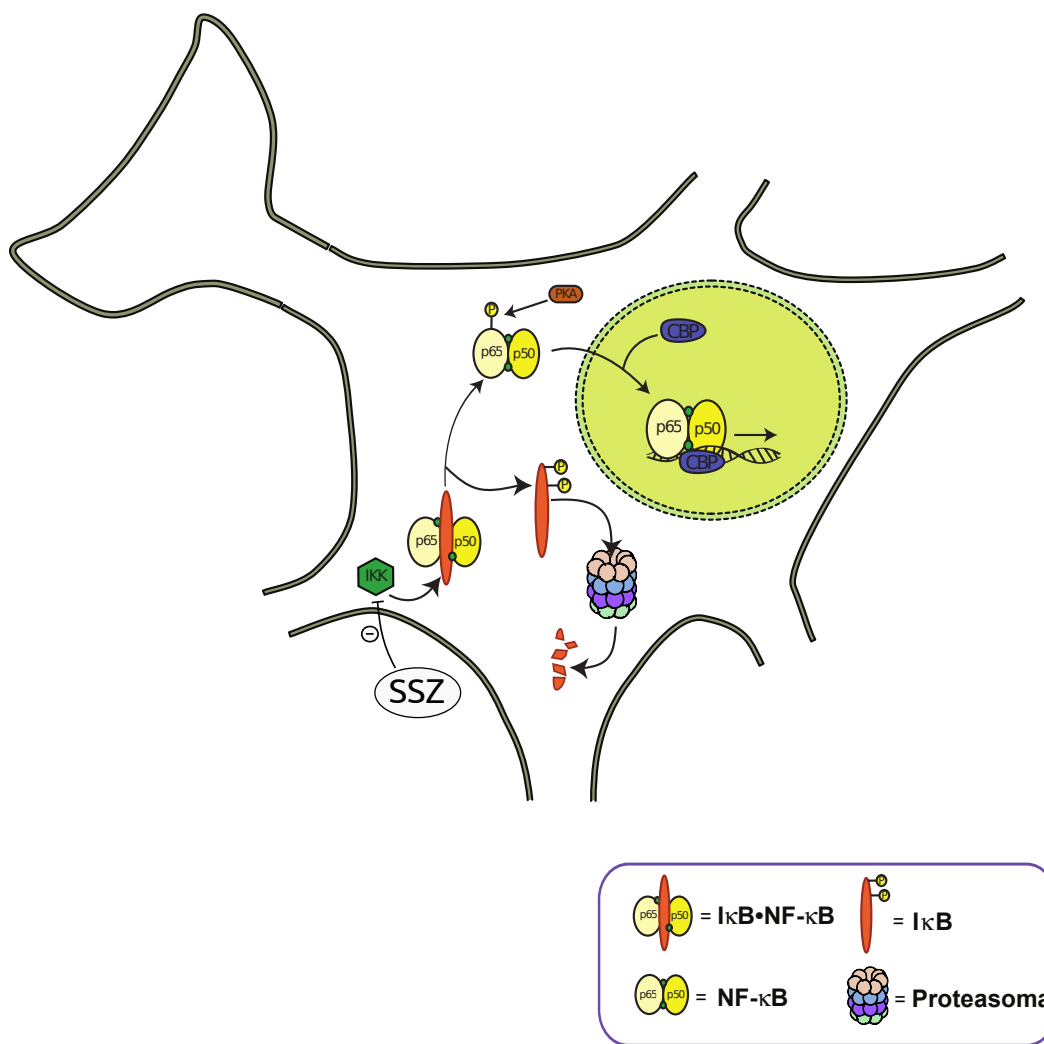


Figura IV.1 Esquema de la vía canónica de activación somática de NF- $\kappa$ B. Se encuentra indicado el blanco de acción de la Sulfasalazina (SSZ). Adaptado de (Romano, 2012).

específicas permiten que I $\kappa$ B sea fosforilado en dos de sus serinas por una quinasa denominada IKK que lleva a la proteólisis del inhibidor por el proteasoma (DiDonato et al., 1996).

La sulfasalazina (SSZ) es utilizada comúnmente como anti inflamatorio y su acción fue originalmente atribuida a la inhibición de la ciclooxigenasa. Posteriormente, se describió que la SSZ inhibe a la quinasa IKK y por lo tanto impide la activación de NF- $\kappa$ B con su consecuente translocación a núcleo (Figura IV.1) (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).

Los estudios realizados en nuestro laboratorio sobre la consolidación de la memoria en el cangrejo *Neohelice granulata* determinaron una doble activación de NF- $\kappa$ B a 0 y 6hs luego del entrenamiento (Freudenthal y Romano, 2000). La administración de sulfasalazina en animales naïve disminuye los niveles de activación de NF- $\kappa$ B a 30 y 45min y luego de 1hr se restablecen a los niveles basales de actividad. La administración de la droga 10min antes de la sesión de entrenamiento o 5hs luego del mismo, impide la consolidación de la memoria (Merlo et al., 2002).

Con respecto al rol de NF- $\kappa$ B en el proceso de reconsolidación de la memoria, en nuestro laboratorio se pudo determinar por la técnica de EMSA que la actividad de NF- $\kappa$ B aumenta inmediatamente luego de la reexposición al contexto de entrenamiento pero no se observa un aumento si el entrenamiento utilizado es débil o la reexposición es a un contexto diferente. Asimismo, la administración del inhibidor sulfasalazina 20min antes de la reexposición al contexto disminuye la actividad de NF- $\kappa$ B e impide la reconsolidación de la memoria (Merlo et al., 2005).

Los estudios realizados en la tarea de evitación inhibitoria en ratón, mostraron una diferencia en la cinética de activación del factor de transcripción durante la consolidación con respecto a la del cangrejo, ya que la

actividad aumenta a los 45min luego del entrenamiento y a las 2hs ya se encuentra en los niveles basales (Freudenthal et al., 2005). En relación a los estudios realizados durante la reconsolidación en ratón, se encontró que la activación de NF- $\kappa$ B en el hipocampo ocurre 15min luego de la reactivación de la memoria y que dicha activación es necesaria para reconsolidar la memoria de evitación inhibitoria y de condicionamiento de miedo (Bocchia et al., 2007; de la Fuente et al., 2011). Además, en este último modelo se encontró que la inhibición de IKK $\alpha$  luego de la reactivación impide la reconsolidación de la memoria (Lubin y Sweatt, 2007).

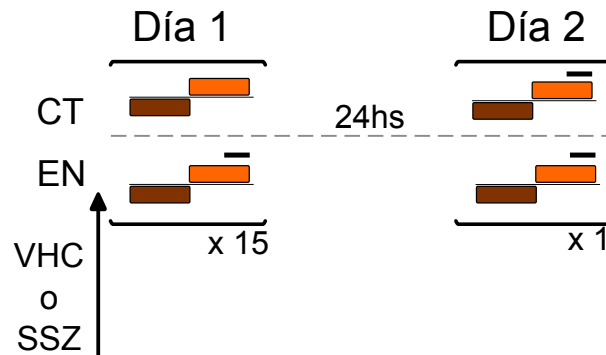
Los objetivos de este capítulo están orientados, por un lado, a seguir caracterizando la memoria de condicionamiento contextual. Por el otro, dado que en esta Tesis nos centramos en el proceso de reconsolidación, utilizamos la activación de la vía IKK-NF- $\kappa$ B como un mecanismo necesario para la reconsolidación e indicativo de que dicho proceso está teniendo lugar.

Por lo tanto, el primer objetivo de este capítulo fue evaluar si este factor de transcripción está involucrado en la consolidación y reconsolidación de la memoria de condicionamiento contextual pavloviano.

En un segundo objetivo, quisimos caracterizar el proceso de reconsolidación en el nuevo paradigma. De esta manera, una vez establecida la participación de este factor de transcripción durante la reconsolidación de la memoria, utilizaremos el inhibidor para determinar las características del recordatorio que son capaces de desencadenar el proceso de labilización y reconsolidación.

Figura IV.2

A



B

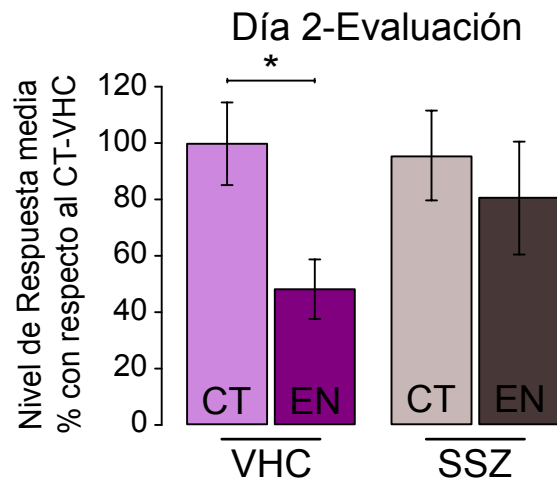


Figura IV.2: La inhibición de NF- $\kappa$ B impide la consolidación de la memoria de CPC. (A) Protocolo Experimental. En el Día 1 dos pares de grupos controles (CT) y entrenados (TR) recibieron 15 presentaciones del cambio de iluminación. A los grupos entrenados además se les presentó el estímulo visual de peligro. Un par de grupos control y entrenado fue inyectado con vehículo (VHC) y el otro par de grupos fue inyectado con sulfasalazina (SSZ). Las inyecciones fueron administradas inmediatamente antes del entrenamiento. En el Día 2 los animales fueron colocados en los actómetros y se les presentó el cambio de iluminación con el estímulo visual de peligro a todos los grupos. (B) Sesión de evaluación. Respuesta media  $\pm$  E.E.M en el día 2, normalizado con respecto al grupo control inyectado con vehículo. \*:  $p < 0,05$ .  $n = 30$

## IV.2 RESULTADOS

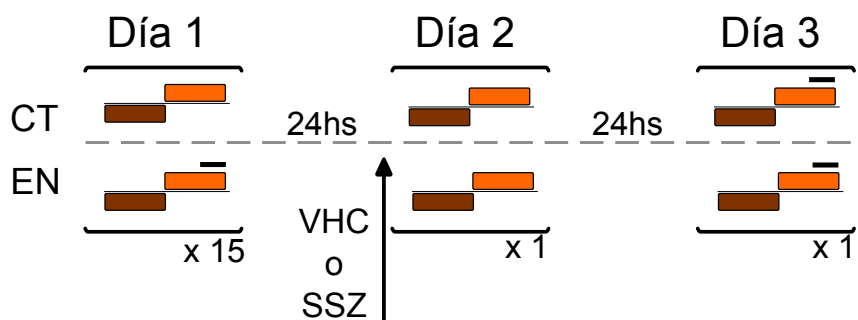
### *IV.2.1 Efecto de la inhibición de NF-κB durante la consolidación de la memoria de condicionamiento contextual en Neohelice*

En primer lugar nos propusimos evaluar el efecto de la inhibición del factor de transcripción NF-κB durante la consolidación de la memoria de CPC. El experimento constó de cuatro grupos. Un grupo entrenado con 15 ensayos e inyectado con vehículo (TR-VHC), un grupo control, al cual se le presentó el cambio de iluminación sin la presentación del estímulo visual de peligro y fue inyectado con vehículo (CT-VHC), otro grupo entrenado con 15 ensayos e inyectado con el inhibidor de NF-κB SSZ (TR-SSZ) y otro grupo control inyectado con SSZ (CT-SSZ). Las inyecciones se realizaron inmediatamente antes del entrenamiento. Luego del entrenamiento los animales permanecieron en contenedores aislados en cajoneras hasta el día siguiente, cuando se realizó la sesión de evaluación de la memoria (Figura IV.2.A). Durante la sesión de evaluación, todos los animales recibieron la presentación del estímulo visual de peligro.

En la Figura IV.2.B se muestran los resultados obtenidos el día de la evaluación de la memoria. Como puede observarse, los animales del grupo entrenado e inyectado con vehículo, mostraron diferencias significativas con respecto a su grupo control, indicando retención de la memoria de CPC. Sin embargo, los animales entrenados e inyectados con SSZ, no mostraron diferencias con su respectivo control, evidenciando ausencia de memoria ( $F_{3,116}=3,25$ ;  $p<0,05$ ; CT-VHC vs. EN-VHC:  $p<0,05$  y CT-SSZ vs. EN-SSZ:  $p:NS$ ). Por lo tanto, la inhibición del factor de transcripción NF-κB previa al entrenamiento impide la consolidación de esta memoria de una manera similar a la MCS.

Figura IV.3

A



B

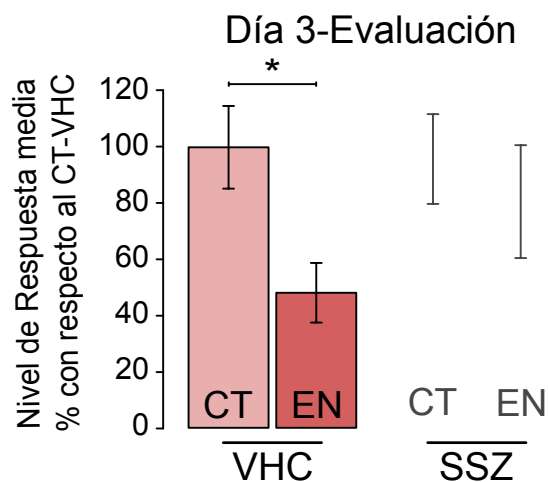


Figura IV.3: La inhibición de NF- $\kappa$ B impide la reconsolidación de la memoria. (A) Protocolo Experimental. En el Día 1 dos pares de grupos controles (CT) y entrenados (TR) recibieron 15 presentaciones del cambio de iluminación. A los grupos entrenados además se les presentó el estímulo visual de peligro. En el Día 2, un par de grupos control y entrenado fue inyectado con vehículo (VHC) y el otro par de grupos fue inyectado con sulfasalazina (SSZ) y 20 minutos luego fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento. En el Día 3 los animales fueron colocados en los actómetros y se les presentó el cambio de iluminación con el estímulo visual de peligro a todos los grupos. (B) Sesión de evaluación. Respuesta media  $\pm$  E.E.M en el día 3, normalizado con respecto al grupo control inyectado con vehículo. \*:  $p < 0,05$ .  $n = 30$

#### *IV.2.2 Efecto de la inhibición de NF- $\kappa$ B durante la reconsolidación de la memoria en el paradigma de CPC*

En segundo lugar, tuvimos como objetivo evaluar el efecto de la inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa$ B durante la reconsolidación de la memoria. En el paradigma clásico de MCS, la forma normalmente utilizada de desencadenar el proceso de reconsolidación consiste en la re-exposición al contexto de entrenamiento durante 5min. Esto permite que los animales evoquen la memoria adquirida el día anterior y se induzca la labilización de la memoria. De esta manera, la memoria se vuelve susceptible a agentes amnésicos. En el nuevo paradigma de condicionamiento contextual, los animales permanecen 5min en el contexto con la iluminación inferior y sólo se le presenta la iluminación superior durante 27seg, el mismo tiempo que dura un ensayo de entrenamiento. En ambos paradigmas, la reactivación carece de la presentación del estímulo visual de peligro.

El experimento consistió en cuatro grupos de animales, dos grupos entrenados y dos grupos controles. En el día 1, a los animales entrenados se les presentó conjuntamente con el estímulo visual de peligro y los animales control permanecieron en los actómetros y se les presentó el cambio de iluminación. En el día 2, un par de grupos control/entrenado fue inyectado con vehículo (CT-VHC/TR-VHC), mientras que el otro par de grupos fue inyectado con sulfasalazina (CT-SSZ/TR-SSZ). Luego de 20 minutos de la inyección, todos los animales fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento y se les presentó un sólo cambio de luz durante 27 seg. En el día 3 se realizó la evaluación de la memoria (Figura IV.3.A). La Figura IV.3.B corresponde a los resultados obtenidos durante la sesión de evaluación. Como puede observarse, el grupo entrenado e inyectado con vehículo muestra retención de la memoria, dado que existen diferencias significativas con respecto al control, mientras que el grupo inyectado con SSZ no muestra diferencias significativas con respecto al control, indicando ausencia de retención ( $F_{3,116}=2,73$ ;  $p<0,05$ ; CT-VHC vs. EN-VHC:  $p<0,05$  y CT-SSZ vs. EN-SSZ:  $p:NS$ ).



Estos resultados indican que la inyección de SSZ 20min antes de la reexposición al contexto de entrenamiento impide la reconsolidación de la memoria. Como dijimos anteriormente, resultados previos del laboratorio indicaban que el aumento de actividad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B ocurría inmediatamente luego de la reexposición al contexto y dicha actividad disminuía si se inyectaba SSZ 20min antes de la reexposición (Merlo et al., 2005). Nuestros resultados estarían indicando que en el nuevo paradigma la cinética de activación de NF- $\kappa$ B sería similar al paradigma clásico y por tanto, la ventana de acción de la droga es también similar.

### *IV.2.3 ¿Qué características debe cumplir el recordatorio para que labilice la memoria?*

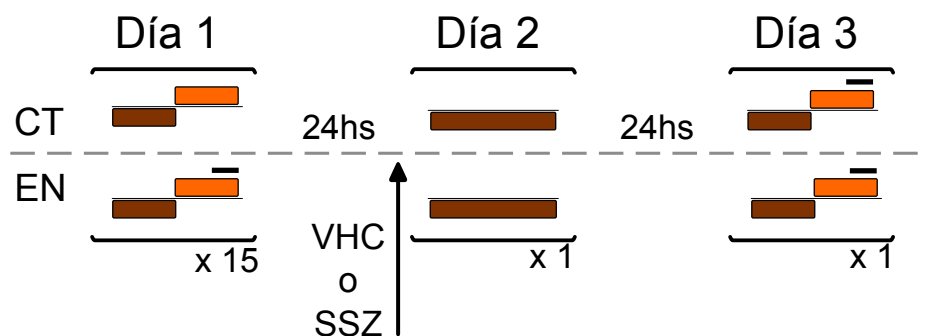
La siguiente sección está orientada a entender cuáles son las características que debe tener el recordatorio para ser capaz de desencadenar el proceso de labilización y reconsolidación de la memoria.

El objetivo del siguiente experimento fue determinar si la sola reexposición al contexto de entrenamiento en ausencia de iluminación superior es capaz de desencadenar el proceso de labilización y reconsolidación. Como vimos en la sección anterior, la inhibición de NF- $\kappa$ B por sulfasalazina impide la reconsolidación de la memoria. La forma de visualizar que el proceso de reconsolidación de la memoria está teniendo lugar es interfiriéndolo y evaluando la retención a largo término después de la reactivación. Este punto es importante a tener en cuenta dado que el proceso de consolidación de la memoria puede ser evidenciado por la presencia de retención de la memoria a largo término. Sin embargo, si el animal reconsolida, la retención de la memoria permanece intacta.

Nuevamente partimos de cuatro grupos, dos grupos entrenados con 15 ensayos y dos grupos controles. En el día 2, un par de grupos control/entrenado fue inyectado con vehículo (CT-VHC/TR-VHC) y el otro par

Figura IV.4

A



B

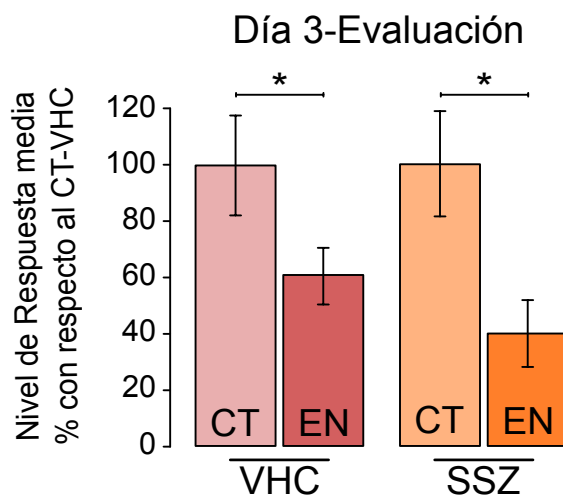


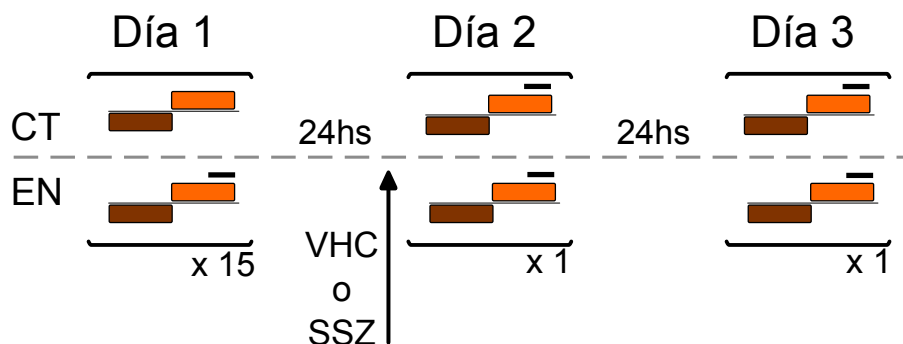
Figura IV.4: La inhibición de NF- $\kappa$ B no tiene efecto si la reconsolidación de la memoria no se desencadena. (A) Protocolo Experimental. En el Día 1 dos pares de grupos controles (CT) y entrenados (TR) recibieron 15 presentaciones del cambio de iluminación. A los grupos entrenados además se les presentó el estímulo visual de peligro. En el Día 2, un par de grupos control y entrenado fue inyectado con vehículo (VHC) y el otro par de grupos fue inyectado con sulfasalazina (SSZ) y 20 minutos luego fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento sin la presentación de la iluminación superior. En el Día 3 los animales fueron colocados en los actómetros y se les presentó el cambio de iluminación con el estímulo visual de peligro a todos los grupos. (B) Sesión de evaluación. Respuesta media  $\pm$  E.E.M en el día 3, normalizado con respecto al grupo control inyectado con vehículo. \*:  $p < 0,05$ .  $n = 30$

fue inyectado con sulfasalazina (CT-SSZ/TR-SSZ). Luego de 20 minutos los animales fueron colocados en los actómetros con la iluminación inferior y en ningún momento se los iluminó con la luz superior. Al día siguiente la memoria fue evaluada con la presentación del estímulo visual de peligro conjuntamente con los últimos segundos de la iluminación superior, de la misma manera que en entrenamiento (Figura IV.4.A). La Figura IV.4.B muestra los resultados obtenidos en la sesión de evaluación de la memoria durante el día 3. Tanto el grupo entrenado inyectado con vehículo como el grupo entrenado inyectado con sulfasalazina, muestran retención de la memoria ( $F_{3,116}=7,79$ ;  $p<0,05$ ; CT-VHC vs. EN-VHC:  $p<0,05$  y CT-SSZ vs. EN-SSZ:  $p<0,05$ ). Por lo tanto, la inhibición de NF- $\kappa$ B previa a la reexposición al contexto iluminado desde abajo, no tiene efecto. Teniendo en cuenta el resultado anterior en el cual la inhibición de NF- $\kappa$ B impide la reconsolidación de la memoria, podríamos concluir que en este caso tampoco tiene lugar la reconsolidación y por lo tanto, no sería necesaria la activación de NF- $\kappa$ B. Por otro lado, podemos afirmar que el proceso de labilización-reconsolidación es específico de la evocación de la memoria, que sólo tiene lugar cuando se presenta la iluminación desde arriba y se reconoce el contexto asociado al EVP.

En trabajos previos realizados con el aprendizaje contexto-señal se observó que la labilización-reconsolidación de la memoria no se desencadena si se presenta el EVP al final de la reexposición al contexto (Pedreira et al., 2004). Si bien hay excepciones, en otros modelos de memoria también se observó que la reexposición reforzada no induce este proceso. Siguiendo con el objetivo de estudiar cuáles son las características del recordatorio que permiten que el proceso de reconsolidación tenga lugar, realizamos un experimento para evaluar si en el nuevo paradigma ocurría lo mismo. Para esto contamos con cuatro grupos de animales, dos grupos entrenados con 15 ensayos y dos grupos controles. En el día 2, un par de grupos entrenado/control fue inyectado con vehículo (CT-VHC/TR-VHC) y otro par inyectado con sulfasalazina (CT-VHC/TR-VHC). Luego de 20 minutos los animales fueron

Figura IV.5

A



B

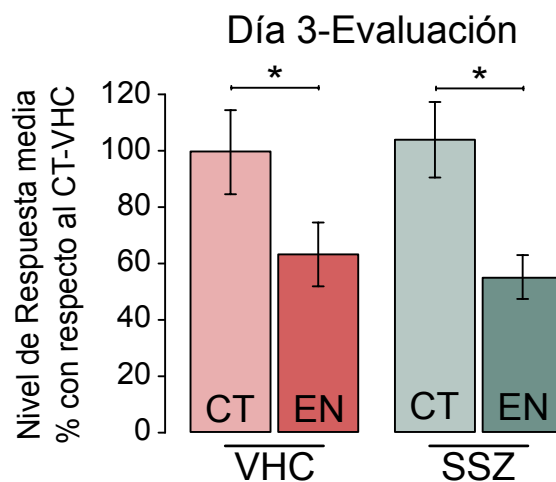


Figura IV.5: La inhibición de NF- $\kappa$ B no tiene efecto si se presenta el estímulo visual de peligro al final de la reexposición. (A) Protocolo Experimental. En el Día 1 dos pares de grupos controles (CT) y entrenados (TR) recibieron 15 presentaciones del cambio de iluminación. A los grupos entrenados además se les presentó el estímulo visual de peligro. En el Día 2, un par de grupos control y entrenado fue inyectado con vehículo (VHC) y el otro par de grupos fue inyectado con sulfasalazina (SSZ) y 20 minutos luego fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento y se les presentó el estímulo visual de peligro. En el Día 3 los animales fueron colocados en los actómetros y se les presentó el cambio de iluminación con el estímulo visual de peligro a todos los grupos. (B) Sesión de evaluación. Respuesta media  $\pm$  E.E.M en el día 3, normalizado con respecto al grupo control inyectado con vehículo. \*:  $p < 0,05$ .  $n = 30$

reexpuestos al contexto de entrenamiento, se les presentó el cambio de iluminación y el estímulo visual de peligro al final de la reexposición. Luego de 24hs los animales fueron colocados nuevamente en los actómetros para evaluar la memoria (Figura IV.5.A). En la Figura IV.5.B se muestran los resultados obtenidos durante la sesión de evaluación de la memoria en el día 3. Como era esperado, tanto los animales entrenados e inyectados con vehículo, como los animales entrenados e inyectados con sulfasalazina, muestran retención de la memoria ( $F_{3,116}=3,69$ ;  $p<0,05$ ; CT-VHC vs. EN-VHC:  $p<0,05$  y CT-SSZ vs. EN-SSZ:  $p<0,05$ ). Por lo tanto, en este nuevo aprendizaje también ocurre que la labilización-reconsolidación de la memoria no se desencadena si se presenta el EI durante la reexposición al contexto.

### IV.3 DISCUSIÓN

Como dijimos en la introducción, los primeros trabajos que determinaron un rol del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en la formación de la memoria fueron realizados en el cangrejo *Neohelice granulata* (Freudenthal y Romano, 2000). Sin embargo, el paradigma utilizado en dichos trabajos fue el clásico. Por ello resultó interesante preguntarse si dicho factor de transcripción también jugaba un rol en la formación de la memoria en el nuevo paradigma de condicionamiento pavloviano. En vista de los resultados observados, podemos concluir que el factor de transcripción NF- $\kappa$ B está involucrado en la consolidación de la memoria en este nuevo paradigma, ya que su inhibición previa al entrenamiento produce un efecto amnésico (Figura IV.2). A su vez, dicho factor de transcripción también está involucrado en la reconsolidación de la memoria de condicionamiento pavloviano puesto que la administración del inhibidor SSZ previa a la reexposición al contexto de entrenamiento produce un efecto amnésico al evaluar la memoria en el día 3 (Figura IV.3). Ambos resultados coinciden con lo observado previamente en nuestro laboratorio (Merlo et al., 2002, 2005).

El segundo objetivo de este capítulo fue establecer las características que debía cumplir el recordatorio para desencadenar el proceso de reconsolidación en este nuevo paradigma.

La administración de SSZ previa a la reexposición al contexto de entrenamiento tiene un efecto amnésico. Sin embargo, como discutimos en el capítulo anterior, en este caso el contexto de entrenamiento está conformado por las características específicas del contexto junto con la iluminación desde arriba y ambos conforman el EC. Por esta razón resultó pertinente preguntarnos cuál de estas características era necesaria para labilizar la memoria y desencadenar el proceso de reconsolidación. Dado que la administración de SSZ previa a la reexposición al contexto sin la presentación de la iluminación superior no tuvo un efecto amnésico, podemos concluir que sólo las características intrínsecas del contexto no son suficientes para labilizar la memoria. Más aún, es necesaria la presentación del contexto de iluminación superior para desencadenar un proceso de labilización-reconsolidación. De esta manera, si la memoria no se labiliza y por lo tanto no es disrumpible, la inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa$ B no tiene consecuencias sobre esa memoria.

En coincidencia con lo visto anteriormente en el paradigma clásico, la presentación del EI al final de la reactivación de la memoria cancela el proceso de labilización (Pedreira et al., 2004). Nuevamente se observa que, aunque se impide la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, la memoria no se ve afectada dado que la presentación del refuerzo impide que la memoria se vuelva lábil y por lo tanto vulnerable a este tratamiento de inhibición.

# Capítulo V

**Efecto paradójico de la inhibición del  
proteasoma en la consolidación y  
reconsolidación de la memoria**

## **Efecto paradójico de la inhibición del proteasoma en la consolidación y reconsolidación de la memoria**

### V.1 INTRODUCCIÓN

Una idea que subyace a los mecanismos neuronales que dan lugar a la formación de las memorias de largo término es que debería existir una reorganización de los contactos sinápticos (Kandel 2001). Para dar lugar a este proceso serían necesarios cambios en los patrones de expresión génica y la expresión *de novo* de proteínas, así como también un rearrreglo de proteínas preexistentes asociado con el fortalecimiento de contactos sinápticos específicos (Kandel 2001). En algunos casos se ha demostrado que la degradación de proteínas inhibitorias preexistentes es un paso fundamental para inducir estas modificaciones sinápticas. En particular, se ha propuesto que el sistema de degradación de proteínas dependiente del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS, del inglés ubiquitin proteasome system) de tipo 26S es necesario para dar lugar a cambios plásticos en las conexiones sinápticas tanto en modelos de vertebrados como de invertebrados (Chain et al., 1999b; Hegde et al., 1997; Lopez-Salon et al., 2001)

En particular, la expresión de la enzima ubiquitin hidroxilasa está relacionada con la degradación de la subunidad regulatoria (R) de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) en la plasticidad sináptica en *Aplysia* (Upadhyay et al., 2004). Esta subunidad R es un pseudosustrato que inhibe la actividad de la subunidad catalítica (C). De esta manera, la degradación de la subunidad R permite la actividad de la subunidad C de manera perdurable e independiente de AMPc. Más aún, el uso de lactacistina ó Z-LLL-H (N-benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal; MG132), inhibidores específicos de la actividad del sistema de proteasoma 26S, interfiere con la formación de la facilitación de largo término (LTF, del inglés long-term facilitation) en *Aplysia*. Este bloqueo es prevenido con la inyección de subunidades catalíticas



C de PKA, sugiriendo que la actividad del proteasoma 26S es necesario para inclinar el balance de actividad de PKA hacia una modalidad de actividad catalítica sostenida en el tiempo (Chain et al., 1999a, 1999b).

El UPS también es crítico para la consolidación de la memoria en vertebrados. En roedores, la inyección bilateral del inhibidor de proteasoma lactacistina en la región CA1 del hipocampo, bloquea la formación de la memoria de largo término en el paradigma de evitación inhibitoria de un sólo ensayo (Lopez-Salon et al., 2001). Consistente con el requerimiento de degradación mediada por el UPS, los niveles de proteínas sinápticas ubiquitinadas en el hipocampo aumenta luego del entrenamiento (Lopez-Salon et al., 2001). Entre las proteínas degradadas durante la consolidación, los autores no encontraron degradación de la subunidad R de la proteína PKA, pero sí de la proteína inhibidora de NF- $\kappa$ B, I kappa B (I $\kappa$ B).

En el Capítulo IV se demostró que en el nuevo paradigma de condicionamiento pavloviano en el cangrejo *Neohelice* la activación de NF- $\kappa$ B es un mecanismo necesario para la formación de la memoria de largo término. Más aún, la participación de este factor de transcripción en el procesamiento de la traza mnésica aparece como una característica evolutivamente conservada, siendo también un proceso necesario para la formación de memorias de evitación inhibitoria (Freudenthal et al., 2005), espaciales (Meffert et al., 2003) y de condicionamiento de miedo en ratones (de la Fuente et al., 2011) y para la potenciación del sobresalto por miedo en ratas (Yeh et al., 2002). El sistema de degradación dependiente del proteasoma 26S constituye un mecanismo central en el proceso de activación de NF- $\kappa$ B. En respuesta a estímulos específicos y por medio de una cascada de activación de proteína-quinasas, la activación de IKK lleva a la fosforilación y ubiquitinización de la proteína I $\kappa$ B. Esta modificación postranscripcional hace que el UPS reconozca y degrade al inhibidor de NF- $\kappa$ B, permitiendo que se transloque al núcleo y pueda cumplir su función como factor de transcripción. La inhibición del UPS con drogas como el MG132 bloquea la degradación de I $\kappa$ B, que aún en su estado ubiquitinizado retiene en el citoplasma al complejo

NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B en su estado inactivo (Roff et al., 1996).

Trabajos realizados en nuestro laboratorio en el paradigma de memoria contexto señal en el cangrejo *Neohelice granulata* demostraron que el efecto amnésico producido por la inhibición del UPS está asociado con la inhibición de NF- $\kappa$ B durante la consolidación de la memoria (Merlo and Romano, 2008). En un paradigma de memoria espacial, se encontró que la degradación de proteínas por el UPS es requerida durante la consolidación en el hipocampo de ratones (Artinian et al., 2008).

La modificación de las conexiones sinápticas por medio de la actividad es esencial para las funciones cerebrales de aprendizaje y la memoria. La depresión de largo término (LTD) así como también la potenciación de largo término (LTP), dos formas opuestas de plasticidad neuronal asociadas a la memoria de largo término en vías glutamatérgicas, pueden ser bloqueadas por la inhibición del UPS (Colledge et al., 2003; Ehlers, 2003; Hou et al., 2006; Karpova et al., 2006).

Como vimos en el capítulo I, una vez que una memoria es consolidada puede volverse nuevamente lábil si se presenta un recordatorio. La reactivación de la memoria original y la subsecuente labilización dispara un proceso de reestabilización de la memoria similar, pero no igual, al observado durante la consolidación tanto a nivel celular como molecular.

Como vimos en los capítulos I y III, un precepto clásico en el campo de la neurobiología de la memoria es el pasaje de la memoria desde una fase lábil a otra estable y duradera (Müller and Pilzecker, 1900). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, un gran número de evidencias experimentales desafiaron el aspecto irreversible de esta hipótesis (Boccia et al., 2007; Kida et al., 2002; Mactutus et al., 1979; Misanin et al., 1968; Nader et al., 2000; Pedreira et al., 2002; Sara, 2000; Sekiguchi et al., 1997) Este fenómeno llamado reconsolidación está presente en diferentes tipos de aprendizajes y en diversas líneas filogenéticamente distantes entre los cuales se encuentran los moluscos, crustáceos, aves, roedores y humanos (Dudai, 2006). En el caso

del aprendizaje asociativo, la memoria es usualmente reactivada por la presentación del EC sin el EI. En los modelos de asociación al contexto, la presentación del EC consiste en la reexposición del animal al contexto de entrenamiento. La reactivación de la memoria por el EC puede desencadenar dos mecanismos aparentemente antagónicos dependiendo de la duración de la reexposición: reconsolidación o extinción, como fue inicialmente caracterizado en cangrejos (Pedreira and Maldonado, 2003).

El rol del UPS en la reconsolidación es controversial. En memorias espaciales en ratones, la inhibición de la degradación de proteínas dependiente de proteasoma en el hipocampo durante la reconsolidación impide la memoria de largo término post-reactivada (Artinian et al., 2008). Sin embargo, en el modelo de condicionamiento de miedo no tuvo efecto ni en el hipocampo (Lee et al., 2008) ni en la amígdala (Jarome et al., 2011). Recientemente, fueron reportados resultados similares en sensibilización y facilitación de *Aplysia* (Lee et al., 2012). Curiosamente, dicha inhibición bloquea la acción amnésica de los inhibidores de síntesis proteica. Este último descubrimiento fue interpretado como una acción específica de los inhibidores del UPS en la labilización de la memoria, sugiriendo que el bloqueo de la traducción ya no resulta amnésico porque la memoria no puede volverse lábil luego de la evocación como resultado de la inhibición del proteasoma. Sin embargo, existe otra interpretación en términos del balance entre síntesis y degradación de elementos positivos y negativos de la plasticidad neuronal, como se encontró en el caso de la potenciación de largo término (LTP, del inglés long.term potentiation) (Fonseca et al., 2006). En este trabajo, la inhibición farmacológica de tanto el UPS como de la síntesis de proteínas impide la expresión de la fase tardía del LTP. Sin embargo, cuando la degradación y la síntesis de proteínas son inhibidas al mismo tiempo, el LTP no se ve afectado. Este resultado sugiere que el LTP y quizás otras formas de plasticidad y memoria, requieren en parte la acción combinada de degradación y síntesis de proteínas de plasticidad. En lo que respecta al reprocesamiento de la memoria luego de la evocación, es concebible que el

balance entre la degradación y la síntesis de algunas proteínas claves sea determinante en los procesos de labilización-reconsolidación. Dicha interpretación podría explicar los resultados obtenidos en el modelo de condicionamiento de miedo en ratones y en *Aplysia* en los cuales la inhibición simultánea del UPS y de la traducción no tiene efecto en la reconsolidación. En este caso, la degradación de proteínas podría no ser crítica para la reconsolidación pero cuando se la inhibe, la síntesis de nuevas proteínas ya no es requerida debido a que las proteínas preexistentes no degradadas son suficientes para sostener el proceso de plasticidad.

Para evaluar estas interpretaciones alternativas, es necesario interferir la reconsolidación con otras drogas que no sean inhibidores de la síntesis de proteínas. Si los inhibidores del UPS son capaces de bloquear los efectos amnésicos o facilitadores de dichas drogas sobre la memoria, entonces se podría confirmar el rol de la degradación de proteínas en la labilización de la memoria más allá de sus efectos sobre el balance entre síntesis y degradación.

## V.2 RESULTADOS

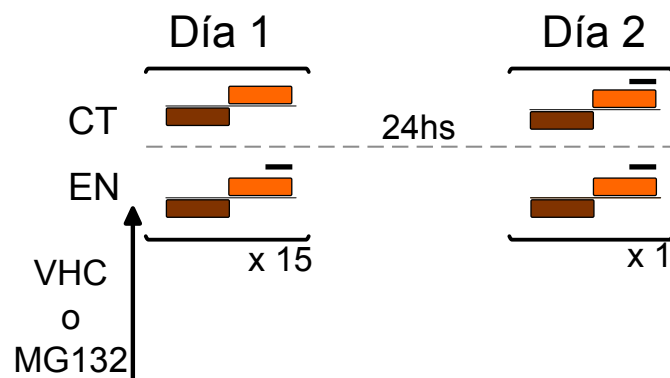
### *V.2.1 Rol del proteasoma en la consolidación de la memoria en el condicionamiento pavloviano contextual*

Resultados previos obtenidos en el laboratorio mostraron que la inhibición de proteasoma disminuye los niveles de NF-kB e impide la consolidación de la memoria. Nosotros nos preguntamos si en el nuevo paradigma desarrollado en esta Tesis la inhibición del proteasoma tiene un rol similar en la consolidación de la memoria.

Entonces, nos propusimos evaluar el efecto de inhibir al UPS con MG132 durante la consolidación de la memoria. El experimento constó de cuatro grupos. Un grupo entrenado con 15 ensayos e inyectado con vehículo (EN-

Figura V.1

A



B

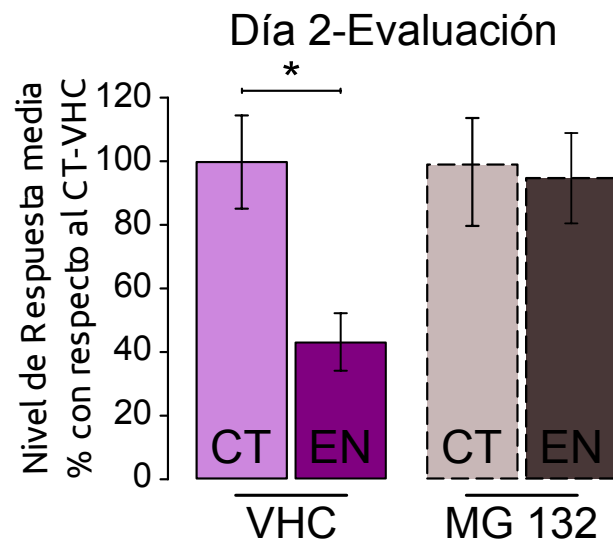


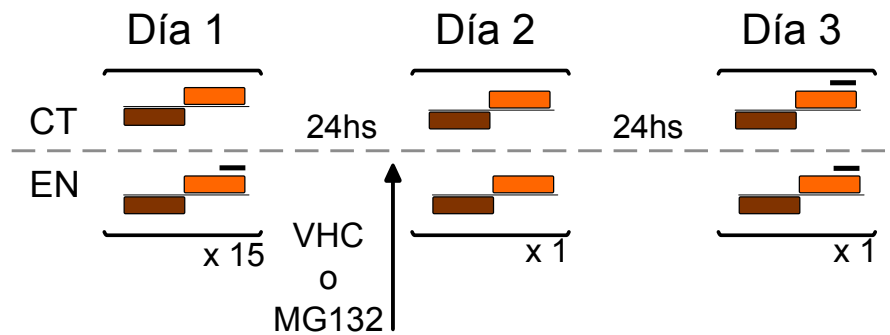
Figura V.1: La inhibición del proteasoma impide la consolidación de la memoria de CPC. (A) Protocolo Experimental. En el Día 1 dos pares de grupos controles (CT) y entrenados (EN) recibieron 15 presentaciones del cambio de iluminación. A los grupos entrenados además se les presentó el estímulo visual de peligro. Un par de grupos control y entrenado fue inyectado con vehículo (VHC) y el otro par de grupos fue inyectado con MG132. Las inyecciones fueron administradas inmediatamente antes del entrenamiento. En el Día 2 los animales fueron colocados en los actómetros y se les presentó el cambio de iluminación con el estímulo visual de peligro a todos los grupos. (B) Sesión de evaluación. Respuesta media +/- E.E.M en el día 2, normalizado con respecto al grupo control inyectado con vehículo. \*:  $p < 0,05$ .  $n = 30$

VHC), un grupo control, al cual se le presentó en cambio de iluminación sin la presentación del estímulo visual de peligro e inyectado con vehículo (CT-VHC), otro grupo entrenado con 15 ensayos pero inyectado con el inhibidor de proteasoma, MG132 (EN-MG132), y otro grupo control inyectado con MG132 (CT-MG132). Las inyecciones se realizaron inmediatamente antes del entrenamiento. Luego del entrenamiento los animales permanecieron en contenedores aislados en cajoneras hasta el día siguiente, cuando se realizó la sesión de evaluación de la memoria (Figura V.1.A). En la Figura V.1.B se muestran los resultados obtenidos durante el día de la evaluación. Como puede verse, los animales entrenados e inyectados con vehículo mostraron diferencias significativas con respecto a su control, indicando retención de la memoria. Sin embargo, los animales entrenados e inyectados con MG132 no mostraron diferencias con respecto a su control ( $F_{3,116}=3,35$ ;  $p<0,05$ ; CT-VHC vs. EN-VHC:  $p<0,05$  y CT-MG132 vs. EN-MG132:  $p:NS$ ). Estos resultados indican que la inhibición del proteasoma impide la consolidación de la memoria.

Resultados previos obtenidos en el laboratorio utilizando la técnica de retardo de la movilidad electroforética (EMSA, por sus siglas en inglés) muestran que la administración de MG 132 previo al entrenamiento disminuye los niveles de actividad de NF-kB (Merlo and Romano, 2008). De esta manera, podemos suponer que el efecto amnésico del inhibidor de proteasoma es debido, al menos en parte, al bloqueo de la activación de NF-kB. Este punto es clave para entender la paradoja que se planteará en las próximas secciones. Sin embargo, es importante aclarar que el proteasoma degrada otras proteínas que pueden estar involucradas en el proceso de formación de memoria, pero que nosotros no hemos evaluado.

Figura V.2

A



B

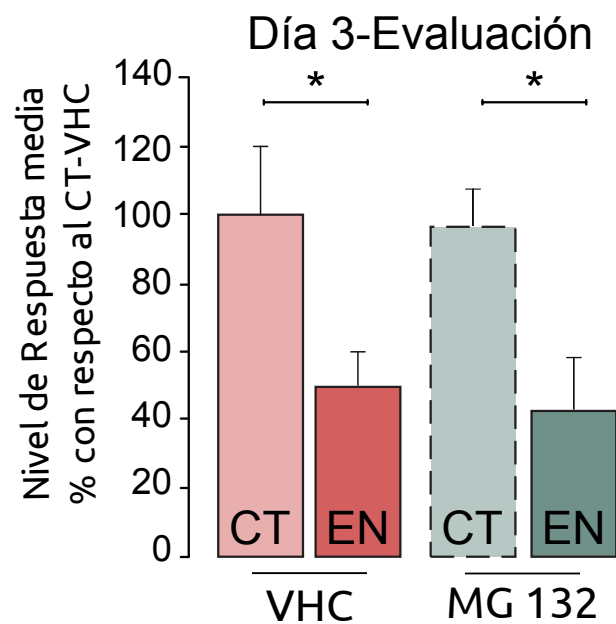


Figura V.2. La inhibición del proteasoma no afecta la memoria cuando se lo administra durante la reconsolidación. (A) Protocolo Experimental. En el Día 1, dos pares de grupos controles (CT) y entrenados (EN) recibieron 15 presentaciones del cambio de iluminación. A los grupos entrenados además se les presentó el estímulo visual de peligro. En el Día 2, un par de grupos control y entrenado fue inyectado con vehículo (VHC) y el otro par de grupos fue inyectado con MG132 y luego de 20 min fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento. En el Día 3, los animales fueron colocados en los actómetros y se les presentó el cambio de iluminación con el estímulo visual de peligro a todos los grupos. (B) Sesión de evaluación. Respuesta media  $\pm$  E.E.M en el día 3, normalizado con respecto al grupo control inyectado con vehículo. \*:  $p < 0,05$ .  $n = 40$

### *V.2.2 Aparece la paradoja – Rol del proteasoma durante la reconsolidación de la memoria.*

Una vez probado el efecto amnésico de inhibir al proteasoma durante la consolidación de la memoria, nos propusimos ver el efecto de su inhibición durante el proceso de reconsolidación. En este experimento utilizamos los mismos cuatro grupos de animales que en la sección anterior, dos pares CT-EN entrenados con 15 ensayos en el día 1. En el día 2, un par CT-EN fue inyectado con VHC y el otro con MG 132 20 min antes de la reexposición al contexto de entrenamiento. Los cuatro grupos fueron evaluados en el día 3 (Figura V.2.A).

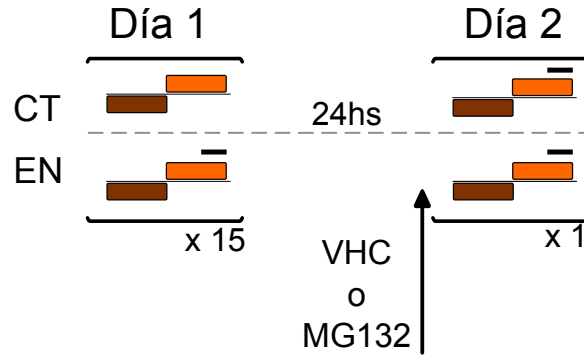
Como puede verse en la figura V.2.B, ambos grupos entrenados tienen niveles de respuesta significativamente menores que sus respectivos controles, es decir que muestran retención de la memoria ( $F_{3,156}=4,13$ ;  $p<0,05$ ; CT-VHC vs. EN-VHC:  $p<0,05$  y CT-MG132 vs. EN-MG132:  $p<0,05$ ). Este resultado es paradójico. Como se dijo anteriormente, la activación de NF- $\kappa$ B es bloqueada por la inhibición del proteasoma, por lo tanto era de esperar que al bloquear a este factor de transcripción durante la reconsolidación, dicho proceso se vería afectado, encontrándose un efecto amnésico al administrar MG132. Asimismo, en la sección anterior vimos que la inhibición del proteasoma durante la consolidación resulta en un efecto amnésico.

A partir de este conjunto de resultados se plantean algunas posibilidades. La primera es que el MG132 impide la evocación de la memoria, por tanto, si la memoria no fuera evocada, no podría pasar a un estado lábil y no se desencadenaría el proceso de reconsolidación, como ya vimos (Figura VI.3). Otra posibilidad estaría vinculada a que la administración de MG132 esté fuera de la ventana temporal durante la cual tiene efecto en la reconsolidación. Por último, se ha planteado que el rol del proteasoma durante la consolidación de la memoria estaría vinculado a la degradación de proteínas inhibitorias críticas. Dicha degradación sería necesaria para permitir que sucedan los mecanismos moleculares que darán lugar a la formación de



Figura V.3

A



B

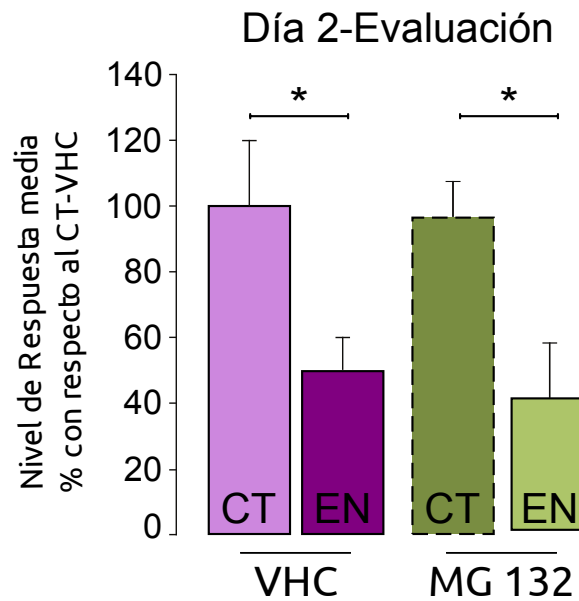


Figura V.3. La inhibición del proteasoma no impide la evocación de la memoria. (A) Protocolo Experimental. En el Día 1 dos pares de grupos controles (CT) y entrenados (EN) recibieron 15 presentaciones del cambio de iluminación. A los grupos entrenados además se les presentó el estímulo visual de peligro. Un par de grupos control y entrenado fue inyectado con vehículo (VHC) y el otro par de grupos fue inyectado con MG132. Las inyecciones fueron administradas inmediatamente antes de la evaluación. En el Día 2, un par de grupos control y entrenado fue inyectado con vehículo (VHC) y el otro par de grupos fue inyectado con MG132. Las inyecciones fueron administradas 10 min antes de ser colocados en los actómetros y se les presentó el cambio de iluminación con el estímulo visual de peligro a todos los grupos. (B) Sesión de evaluación. Respuesta media  $\pm$  E.E.M en el día 2, normalizado con respecto al grupo control inyectado con vehículo. \*:  $p < 0,05$ .  $n = 30$

una memoria duradera. Sin embargo, no sería esta la única función del UPS. Si durante el proceso de reconsolidación también es necesario degradar proteínas inhibitorias para que tengan lugar los mecanismos moleculares que permitirán la reestabilización de la memoria, entonces el inhibidor debería ser amnésico también durante la reconsolidación. Por el contrario, se ha planteado que una vez que la traza mnésica es reactivada se desencadenan mecanismos vinculados a la desestabilización de la memoria que la vuelven lábil. Por lo tanto, planteamos aquí la hipótesis que la inhibición del proteasoma impide que el proceso de labilización de la memoria ocurra. Si la labilización no tiene lugar, no sería necesario reestabilizar la traza mnésica ni tampoco la actividad de NF-kB. Se discutirán estas posibilidades en las siguientes secciones.

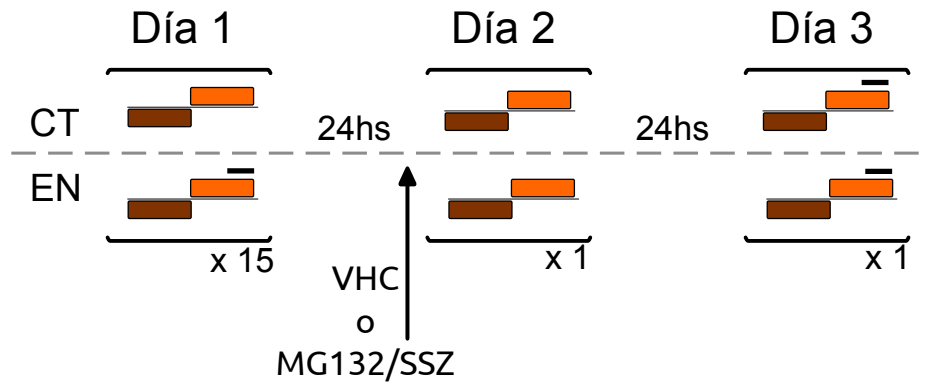
### *V.2.3 Rol del proteasoma durante la evocación de la memoria*

En la sección anterior se plantearon distintas posibilidades acerca de la falta de efecto de la inhibición de proteasoma durante la reconsolidación. En esta sección se abordará la primera de las posibilidades: si el MG 132 impide la evocación de la memoria, entonces esa memoria no se pondrá en juego y por lo tanto no habrá un efecto amnésico por la inhibición del proteasoma. El experimento contó con los mismos cuatro grupos que en el experimento de la sección V.1. En el primer día se entrenó a los animales y en el segundo día se inyectó MG132 20min antes de la sesión de evaluación (Figura V.3.A).

Como puede observarse en la figura V.3.B, el grupo entrenado e inyectado con MG 132 tiene un nivel de respuesta significativamente menor que el grupo control inyectado con MG 132, indicando retención de la memoria ( $F_{3,116}=3,81$ ;  $p<0,05$ ; CT-VHC vs. EN-VHC:  $p<0,05$  y CT-MG132 vs. EN-MG132:  $p<0,05$ ). Por lo tanto, la inhibición de proteasoma con MG 132 no impide la evocación de la memoria dado que los animales pueden expresar esa memoria bajo el efecto de la droga.

Figura V.4

A



B

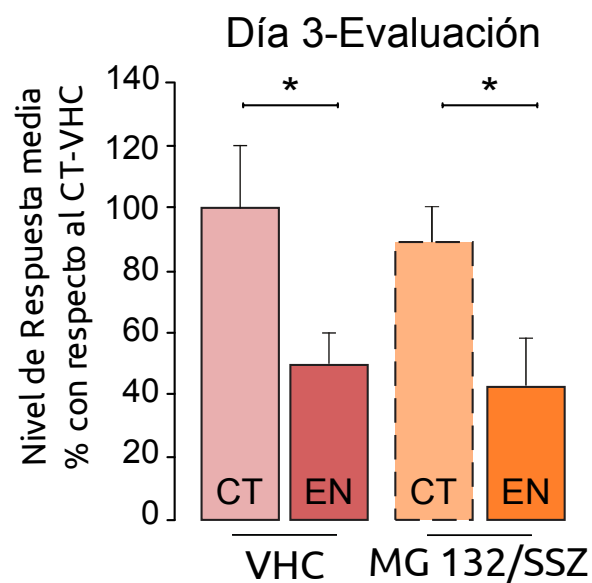


Figura V.4. La inhibición del proteasoma impide el efecto amnésico de la SSZ sobre la reconsolidación de la memoria. (A) Protocolo Experimental. En el Día 1 dos pares de grupos controles (CT) y entrenados (EN) recibieron 15 presentaciones del cambio de iluminación. A los grupos entrenados además se les presentó el estímulo visual de peligro. En el Día 2 un par de grupos control y entrenado fue inyectado con vehículo (VHC) y el otro par de grupos fue coinyectado con MG132 y SSZ, y luego de 20 min fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento. En el Día 3, los animales fueron colocados en los actómetros y se les presentó el cambio de iluminación con el estímulo visual de peligro a todos los grupos. (B) Sesión de evaluación. Respuesta media  $\pm$  E.E.M en el día 3, normalizado con respecto al grupo control inyectado con vehículo. \*:  $p < 0,05$ .  $n = 30$

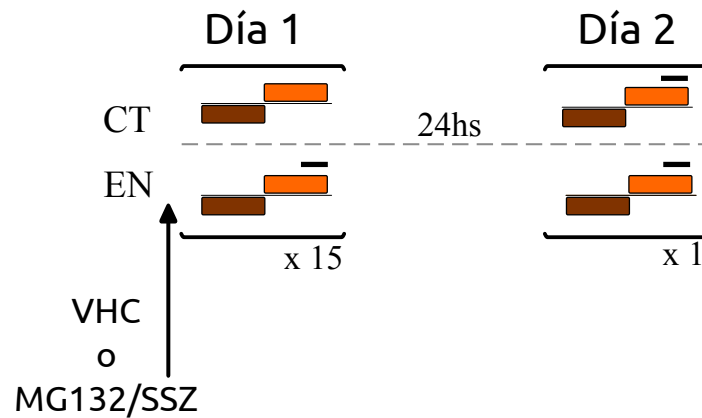
*V.2.4 La inhibición del proteasoma impide el efecto amnésico de la sulfasalazina.*

En esta sección se abordarán las otras dos posibilidades planteadas en la sección V.2. Una, vinculada a la ventana temporal de la administración del inhibidor de proteasoma y su funcionamiento, y la otra vinculada al rol del proteasoma durante la labilización de la memoria. Se diseñó un experimento que constaba con los mismos cuatro grupos empleados anteriormente. En el primer día se entrenó a los animales. Al día siguiente un par de grupos control y entrenado fue inyectado con VHC y el otro par fue inyectado con el inhibidor de proteasoma conjuntamente con el inhibidor de NF-kB (SSZ/MG132). Luego de 24h se realizó la sesión de evaluación de la memoria (Figura V.4.A).

En la figura V.4.B se muestran los resultados obtenidos. El nivel de respuesta del grupo entrenado e inyectado con VHC es significativamente menor que su control, indicando retención de la memoria y lo mismo se observa para el grupo entrenado e inyectado con el cóctel SSZ/MG132 ( $F_{3,116}=4,11$ ;  $p<0,05$ ; CT-VHC vs. EN-VHC:  $p<0,05$  y CT-MG132/SSZ vs. EN-MG132/SSZ:  $p<0,05$ ). Como se mostró en el Capítulo III, la administración de SSZ 20 minutos antes de la reexposición de los animales al contexto de entrenamiento produce efecto amnésico. De esta manera, si el MG 132 se hubiera administrado fuera de la ventana temporal de su efecto, deberíamos haber encontrado efecto amnésico semejante al obtenido con SSZ administrada sola. Sin embargo, no se obtuvo efecto amnésico, por lo que dicha posibilidad debería descartarse. De esta manera, estos resultados están a favor de la hipótesis de esta Tesis en la cual se plantea que el UPS tiene un rol durante la labilización de la memoria y su inhibición determina entonces que los mecanismos necesarios para reestabilizar la traza mnésica no se desencadenen. En otras palabras, si la labilización no tiene lugar porque se inhibió al proteasoma, no es necesaria la activación del factor de transcripción NF-kB para reestabilizar una traza mnésica que no se puso en juego.

Figura V.5

A



B

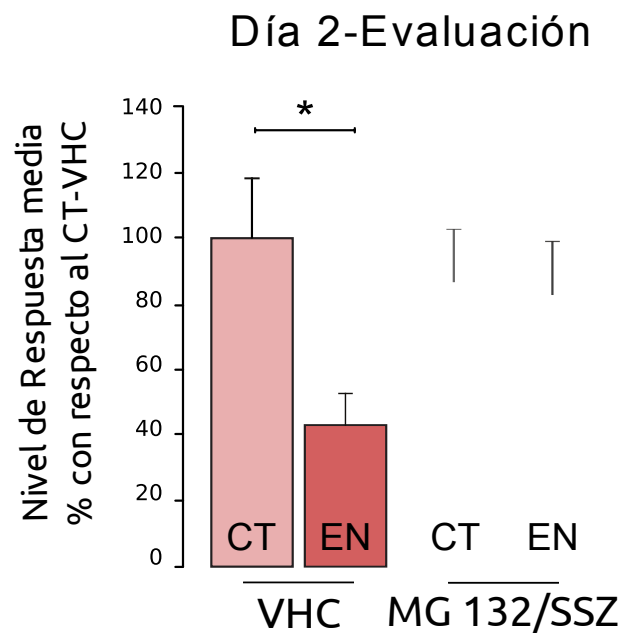


Figura V.5. El coctel MG132/SSZ impide la consolidación de la memoria. (A) Protocolo Experimental. En el Día 1, dos pares de grupos controles (CT) y entrenados (EN) recibieron 15 presentaciones del cambio de iluminación. A los grupos entrenados además se les presentó el estímulo visual de peligro. Un par de grupos control y entrenado fue inyectado con vehículo (VHC) y el otro par de grupos fue coinyectado con MG132 y SSZ. Las inyecciones fueron administradas inmediatamente antes del entrenamiento. En el Día 2, los animales fueron colocados en los actómetros y se les presentó el cambio de iluminación con el estímulo visual de peligro a todos los grupos. (B) Sesión de evaluación. Respuesta media  $\pm$  E.E.M en el día 2, normalizado con respecto al grupo control inyectado con vehículo. \*:  $p < 0,05$ .  $n = 30$

### *V.2.5 Efecto del cóctel M132G/SSZ en consolidación*

En la sección anterior vimos que la inyección de MG132 cancela el efecto amnésico de la SSZ sobre la memoria de condicionamiento pavloviano cuando son inyectados simultáneamente durante la reconsolidación. Frente a este resultado, como acabamos de decir, una de las explicaciones posibles es que el MG132 impide que ocurra el proceso de labilización y por lo tanto la SSZ ya no tendría efecto. Sin embargo, podría ser que la falta de efecto del cóctel MG132/SSZ no fuera un fenómeno particular del proceso de reconsolidación sino un fenómeno general por interacción entre ambas drogas al estar presentes simultáneamente. Para evaluar esta alternativa, se administró el cóctel antes del entrenamiento con el fin de evaluar si se observaba o no el efecto amnésico de ambas drogas cuando son administradas simultáneamente.

Se establecieron los mismos grupos que en la sección anterior. Todos los grupos fueron inyectados inmediatamente antes del entrenamiento. Un par fue inyectado con VHC y el otro con el cóctel MG132/SSZ. La memoria de los animales fue evaluada al día siguiente (Figura V.5.A). Como puede verse en los resultados de la figura V.5.B, los animales entrenados e inyectados con VHC presentan un nivel de respuesta significativamente menor que su control, mostrando retención de la memoria. Por el contrario, los animales entrenados e inyectados con MG132/SSZ no presentan diferencias significativas con respecto al control ( $F_{3,116}=2,69$ ;  $p<0,05$ ; CT-VHC vs. EN-VHC:  $p<0,05$  y CT-MG132/SSZ vs. EN-MG132/SSZ:  $p$ : NS). Este resultado indica que el mismo cóctel de MG132/SSZ que administrado antes de la reactivación de la memoria no afecta el proceso de reconsolidación, es capaz de bloquear el proceso de consolidación de la memoria.

### *V.2.6 La inhibición del proteasoma en la fase de reconsolidación impide el efecto de otras drogas sobre la memoria*

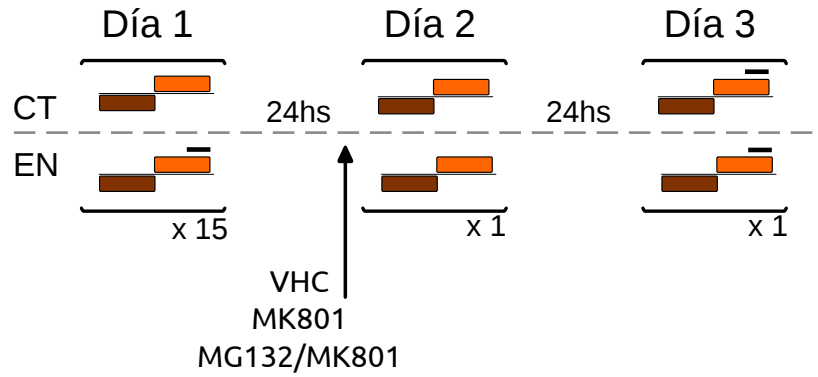
En el experimento de la sección anterior administramos conjuntamente dos inhibidores que coinciden en inhibir la vía de NF- $\kappa$ B. Para determinar si la inhibición del UPS en la fase de reconsolidación impide solamente la acción de la sulfasalazina o si, por el contrario, tiene un efecto generalizado sobre otras drogas que afectan la memoria en dicha fase, realizamos los siguientes dos experimentos. En el primero, decidimos recurrir a un antagonista de los receptores de glutamato de tipo NMDA. Los receptores NMDA se encuentran ampliamente involucrados en la formación y reconsolidación de la memoria, tanto en vertebrados (Morris et al., 1986; Tan et al., 1989; Miserendino et al., 1990; Richard et al., 1994; Weldon et al., 1997; Gutiérrez et al., 1999) como en invertebrados (Lin and Glanzman, 1994; 1997; Roberts and Glanzman, 2003; Browing and Lukowiak, 2008; Rosenegger and Lukowiak, 2010; Si et al., 2004; Müßig et al., 2010; Xia et al., 2005; Wu et al., 2007; Kano et al., 2008; Amano and Maruyama, 2011), y en cangrejos en particular (Pedreira et al., 2002; Troncoso and Maldonado, 2002; Pérez-Cuesta et al., 2007; Hepp et al., 2012). Entonces, evaluamos si la inhibición del UPS mediante el MG132 es capaz de impedir el efecto amnésico de un antagonista no competitivo de los receptores de tipo NMDA, el MK801.

El experimento consistió en seis grupos, tres pares de grupos entrenados y controles. Todos fueron entrenados en el primer día. Al día siguiente el primer par fue inyectado con VHC, el segundo con MK 801, y el tercero con el cóctel MG 132/MK 801. Todas las inyecciones se realizaron 20 minutos antes de la reexposición de los animales al contexto de entrenamiento. Luego de 24h se realizó la sesión de evaluación de la memoria (Figura V.6.A).

En la figura V.6.B se muestran los resultados obtenidos para los seis grupos. El grupo entrenado e inyectado con VHC presenta un nivel de respuesta significativamente menor que el grupo control, indicando retención de la

Figura V.6

A



B

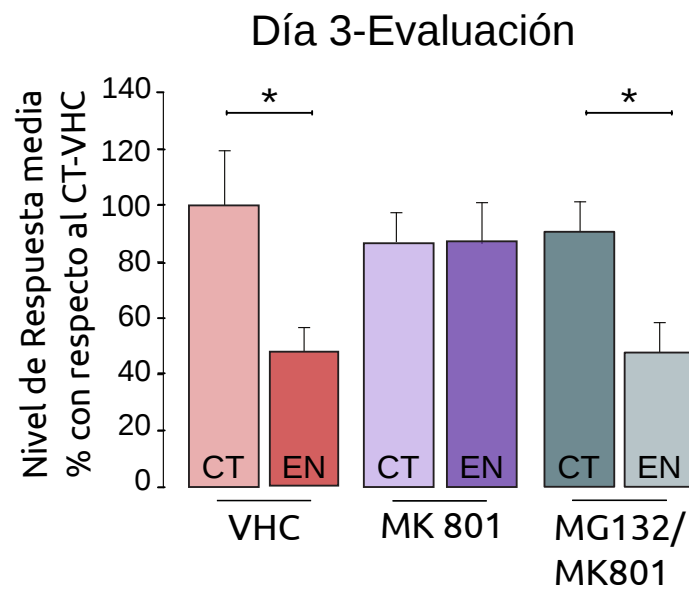


Figura V.6. La inhibición del proteasoma impide el efecto amnésico del MK 801 sobre la reconsolidación de la memoria. (A) Protocolo Experimental. En el Día 1, tres pares de grupos controles (CT) y entrenados (EN) recibieron 15 presentaciones del cambio de iluminación. A los grupos entrenados además se les presentó el estímulo visual de peligro. En el Día 2, un par de grupos control y entrenado fue inyectado con vehículo (VHC), otro par de grupos fue inyectado con MK 801 y el otro par fue coinyectado con MG132 y MK 801. Luego de 20 min fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento. En el Día 3, los animales fueron colocados en los actómetros y se les presentó el cambio de iluminación con el estímulo visual de peligro a todos los grupos. (B) Sesión de evaluación. Respuesta media  $\pm$  E.E.M en el día 3, normalizado con respecto al grupo control inyectado con vehículo. \*:  $p < 0,05$ .  $n = 30$



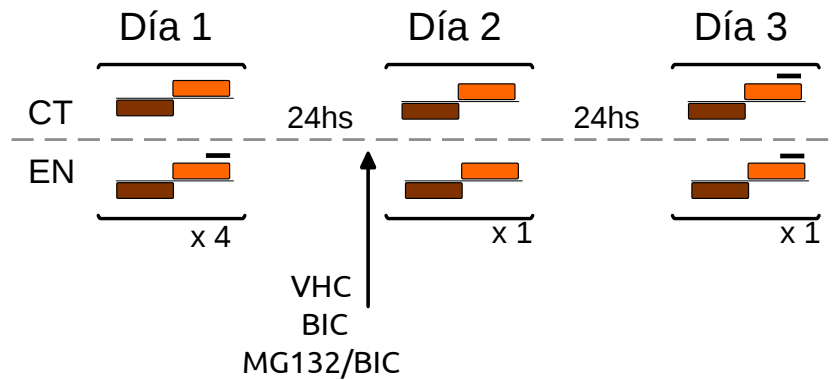
memoria. Sin embargo, el grupo entrenado e inyectado con el antagonista de los receptores NMDA, no muestra diferencias significativas con respecto a su control. Por lo tanto, el bloqueo de receptores de tipo NMDA impide la reconsolidación de la memoria en este modelo. Respecto a los resultados obtenidos para la coadministración de MK 801 y MG 132, el grupo entrenado muestra niveles de respuesta significativamente menores que el grupo control, por lo tanto la inhibición del proteasoma cancela el efecto inhibitorio del MK 801 ( $F_{5,174}=3,70$ ;  $p<0,05$ ; CT-VHC vs. EN-VHC:  $p<0,05$ , CT-MK vs. EN-MK:  $p:NS$  y CT-MG132/MK vs. EN-MG132/MK:  $p<0,05$ ). Este resultado sugiere que la inhibición del UPS impide el bloqueo de la memoria en general y no específicamente inhibiendo la vía IKK-NF.kB.

Siguiendo en la misma línea, nos propusimos evaluar si también la facilitación de la memoria durante la reconsolidación se vería impedida al inhibir el proteasoma. Ya se había visto previamente en el laboratorio que luego de un protocolo de entrenamiento débil, la memoria puede ser facilitada, si se administra el antagonista GABAérgico bicuculina (Carbo Tano et al., 2009). Nuevamente el experimento constó de seis grupos, tres pares entrenados y controles. El primer día se sometió a los animales de los grupos entrenados a un protocolo de entrenamiento débil, que consistió en sólo cuatro presentaciones del estímulo visual de peligro (a diferencia de 15 presentaciones en el estándar). Los animales control, como en el protocolo estándar, permanecieron en el contexto de entrenamiento durante el tiempo que duró la sesión. Luego de 24h, todos los animales fueron inyectados con los distintos fármacos y 20 min después se los reexpuso al contexto de entrenamiento. Un par control/entrenado fue inyectado con VHC, otro con el antagonista de los receptores GABAérgicos, bicuculina (BIC) y el tercer par fue inyectado con BIC y MG 132 en cóctel. Al día siguiente se realizó la sesión de evaluación de la memoria (Figura V.7.A).

En la figura V.7.B se presentan los niveles de respuesta en la evaluación para los distintos grupos. Dado que se trató de un protocolo de entrenamiento débil, el nivel de respuesta del grupo entrenado e inyectado

Figura V.7

A



B

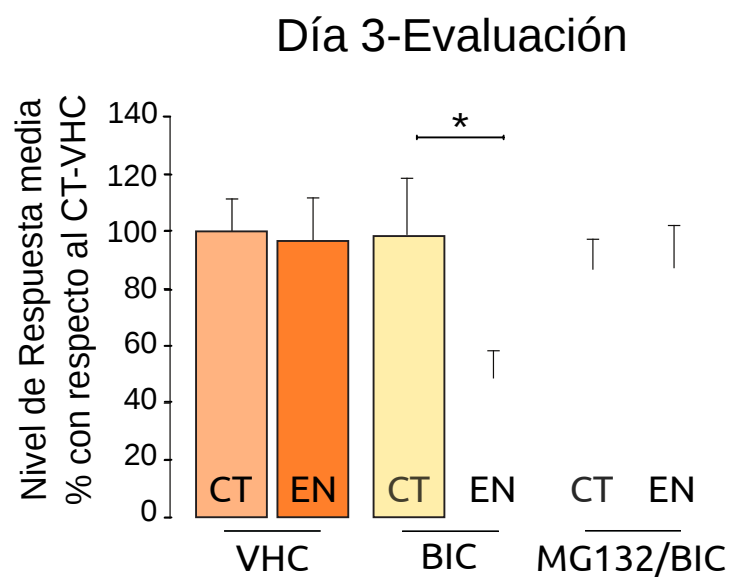


Figura V.7. La inhibición del proteasoma impide el efecto facilitador de la BIC sobre la reconsolidación de la memoria. (A) Protocolo Experimental. En el Día 1, tres pares de grupos controles (CT) y entrenados (EN) recibieron 4 presentaciones del cambio de iluminación. A los grupos entrenados además se les presentó el estímulo visual de peligro. En el Día 2, un par de grupos control y entrenado fue inyectado con vehículo (VHC), otro par de grupos fue inyectado con bicuculina (BIC) y el otro par fue coinyectado con MG132 y BIC. Luego de 20 min fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento. En el Día 3, los animales fueron colocados en los actómetros y se les presentó el cambio de iluminación con el estímulo visual de peligro a todos los grupos. (B) Sesión de evaluación. Respuesta media +/- E.E.M en el día 3, normalizado con respecto al grupo control inyectado con vehículo. \*:  $p < 0,05$ .  $n = 30$

con VHC no difirió significativamente de su control. En cambio, los niveles de respuesta del grupo entrenado e inyectado con BIC sí difirieron significativamente de su control. Esto indica que, efectivamente, en el nuevo paradigma es posible facilitar la memoria durante la reconsolidación si se administra el antagonista GABAérgico bicuculina. Sin embargo, cuando este antagonista es administrado simultáneamente con el inhibidor del proteasoma MG 132, ya no es posible facilitar la memoria. Esto puede verse en la figura, en la cual los niveles de respuesta del grupo entrenado e inyectado con ambas drogas no difiere significativamente de su control ( $F_{5,174}=2,29$ ;  $p<0,05$ ; CT-VHC vs. EN-VHC:  $p=0,88$ , CT-BIC vs. EN-BIC:  $p<0,05$  y CT-MG132/BIC vs. EN-MG132/BIC:  $p$ :NS). Estos resultados indican que la inhibición del UPS impide la facilitación de la memoria en la fase de reconsolidación.

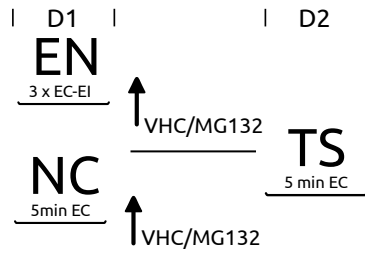
#### *V.2.7 Rol del proteasoma en la consolidación de la memoria de condicionamiento de miedo contextual en ratones*

Los experimentos presentados en las secciones anteriores están orientados a entender el rol del UPS en la consolidación y labilización de la memoria de condicionamiento pavloviano contextual en cangrejos. Para poner a prueba la generalidad de estos resultados, realizamos experimentos similares en otro modelo de condicionamiento contextual, el condicionamiento de miedo en ratones. En esta tarea, un contexto particular (EC) es asociado con un choque eléctrico en las patas (EI) y el entrenamiento consiste en tres ensayos de choque eléctrico en el contexto de entrenamiento.

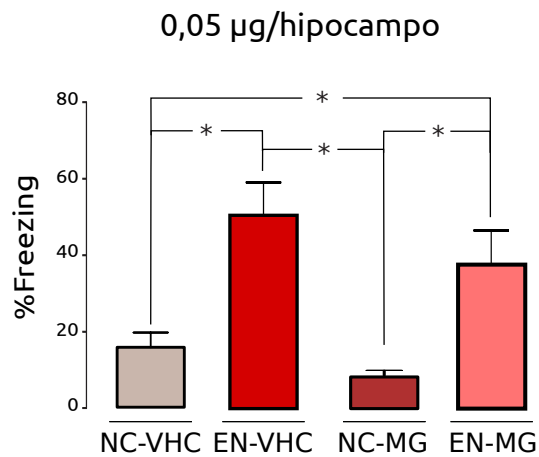
El primer experimento tuvo como objetivo determinar el rol del UPS durante la consolidación de la memoria en el modelo de condicionamiento de miedo en ratones. Asimismo, resultó interesante comparar nuestros resultados en los que usamos MG132 con los trabajos en los cuales se utilizó la droga clasto-lactacistina-beta-lactona como inhibidor del UPS (Lee et al.,

Figura V.8

A



B



C

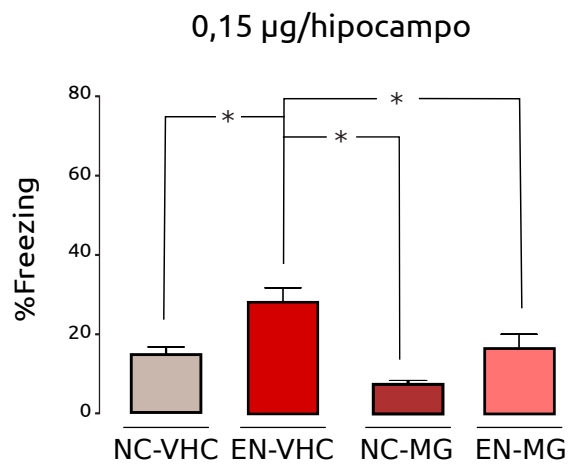


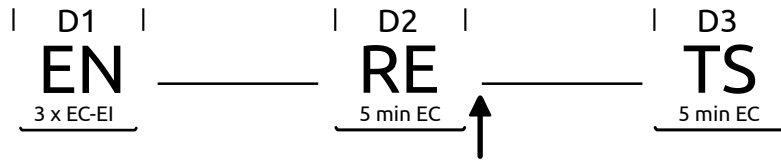
Figura V.8. La inhibición del proteasoma en el hipocampo de ratón impide la consolidación de la memoria de condicionamiento de miedo. (A) Protocolo Experimental. En el Día 1, dos grupos fueron entrenados (EN) y recibieron tres ensayos. Otros dos grupos permanecieron el mismo tiempo en el contexto de entrenamiento pero no recibieron el choque (NC). Inmediatamente luego de la sesión de entrenamiento, recibieron una inyección intrahipocampal bilateral. Un par de grupos control y entrenado fue inyectado con vehículo (VHC) y el otro par de grupos fue inyectado con MG132. En el Día 2, los animales fueron colocados en los dispositivos experimentales durante 5 min. La flecha indica el momento de la inyección. (B) Sesión de evaluación de los animales inyectados con 0,05 µg/hipocampo de MG132. (C). Sesión de evaluación de los animales inyectados con 0,15 µg/hipocampo de MG132. Porcentaje de freezing +/- E.E.M. \*:  $p < 0,05$ .  $n = 10$

2008). El diseño experimental consistió en entrenar un grupo de ratones con el choque eléctrico en las patas (EN) y al otro grupo exponerlo al contexto de entrenamiento pero sin recibir ningún choque (NC). Inmediatamente luego de la sesión de entrenamiento, los animales fueron inyectados bilateralmente en el hipocampo ya sea con VHC o con una dosis de 0,05µg/hipocampo de MG132, determinando cuatro grupos: NC-VHC, EN-VHC, NC-MG132 y EN-MG132. En el día 2, se evaluó la memoria de todos los grupos (Figura V.8.A) determinando el porcentaje de freezing. Los resultados durante la sesión de evaluación se muestran en la figura V.8.B. Los grupos que no recibieron choque (NC), presentaron niveles de *freezing* significativamente menores que aquéllos que recibieron el EI. Sin embargo, no se encontraron efectos significativos de la droga ( $F_{3,36} = 10,45$ ,  $p < 0,05$ ; NC-VHC vs. EN-VHC:  $p < 0,05$ ; NC-MG132 vs. EN-MG132:  $p < 0,05$ ; EN-VHC vs. EN-MG132:  $p$ :NS).

Esta falta de efecto en la administración de MG132 es similar a la observada en el trabajo de Lee y col. (2008) antes mencionado, y podría deberse a que el proteasoma no está involucrado en la consolidación de la memoria en este paradigma, o a que la dosis de la droga es insuficiente. Por consiguiente, realizamos un segundo experimento aumentando tres veces la dosis utilizada anteriormente (dosis de MG132 a 0,15 µg/hipocampo) y utilizamos el mismo diseño experimental mostrado en la figura V.8.A. El resultado de la sesión de evaluación puede verse en la Figura V.8.C. Al igual que en el experimento anterior, los grupos que no recibieron el choque presentaron bajos niveles de freezing. Sin embargo, el grupo que recibió el choque y fue inyectado con MG132 mostró niveles de freezing significativamente menores que el grupo EN-VHC y no difirió de aquéllos que no recibieron el choque. ( $F_{3,36} = 10,45$ ,  $p < 0,05$ ; NC-VHC vs. EN-VHC:  $p < 0,05$ ; NC-MG132 vs. EN-MG132:  $p$ :NS; EN-VHC vs. EN-MG132:  $p < 0,05$ ). Este resultado indica que la consolidación de la memoria depende del UPS dado que su inhibición impide la formación de la memoria de largo término. El resultado anterior y el obtenido por Lee y colaboradores (2008; 2012) se explica en términos de una dosis insuficiente para inducir un efecto amnésico en la fase de consolidación.

Figura V.9

A



B

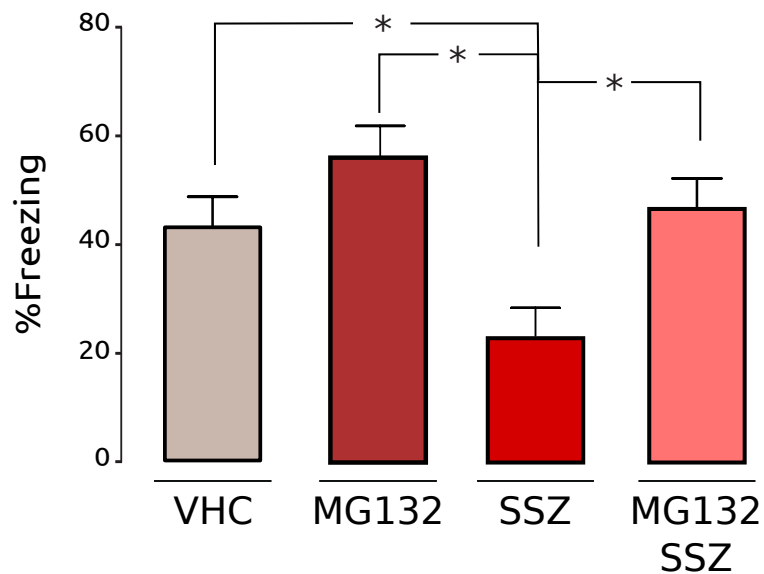


Figura V.9. La inhibición del proteasoma impide el efecto amnésico de la SSZ sobre la reconsolidación de la memoria de condicionamiento de miedo. (A) Protocolo Experimental. En el Día 1, cuatro grupos fueron entrenados con tres ensayos. En el día 2, todos los animales fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento e inmediatamente después recibieron una inyección intrahipocámpica bilateral. Un grupo recibió vehículo (VHC), otro fue inyectado con MG132, otro con sulfasalazina (SSZ) y otro con un coctel de MG132 y SSZ (MG132/SSZ). En el Día 3, los animales fueron colocados en los dispositivos experimentales durante 5 min. La flecha indica el momento de la inyección. (B) Sesión de evaluación. Porcentaje de freezing +/- E.E.M. \*:  $p < 0,05$ .  $n = 10$

### V.2.8 La inhibición del UPS en el hipocampo de ratón durante la reconsolidación bloquea el efecto amnésico de la sulfasalazina sobre la memoria de miedo

Los resultados obtenidos de los experimentos realizados en cangrejos avalan la hipótesis que establece que la inhibición del UPS impide la acción de otra droga en la reconsolidación de la memoria dado que bloquea el proceso de labilización. Por lo tanto decidimos poner a prueba esta hipótesis en el paradigma de condicionamiento de miedo en ratones. En este modelo, la labilización de la memoria y la reconsolidación son inducidas por la reexposición breve al EC sin la presentación del EI un día después del entrenamiento (de la Fuente et al., 2011).

Para inducir un efecto amnésico sobre la reconsolidación utilizamos la inhibición la vía IKK-NF- $\kappa$ B mediante la droga sulfasalazina. En el día 1, todos los grupos de ratones fueron entrenados con tres ensayos. Luego de la reexposición al contexto en el día 2, cuatro grupos de animales fueron inyectados en el hipocampo bilateralmente. Un grupo fue inyectado con vehículo (VHC), otro con sulfasalazina en una dosis de 0,5 $\mu$ g/hipocampo (SSZ) (Boccia et al., 2007), otro con MG132 en una dosis de 0,05 $\mu$ g/hipocampo (MG132) (dosis equivalente a la administrada en cangrejos) y el último fue inyectado con cóctel de MG132 y SSZ (MG132/SSZ), en las mismas dosis antes mencionadas. En el día 3 los animales fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento por 5 min, siendo esta la sesión de evaluación (Figura V.9.A). En la figura V.9.B se muestran los resultados observados en la sesión de evaluación. Como era de esperar, los animales inyectados con VHC muestran un alto nivel de *freezing*, y el grupo inyectado con SSZ muestra un nivel de *freezing* significativamente menor. Estos resultados indican el efecto amnésico debido a la inhibición de la vía IKK/NF- $\kappa$ B durante reconsolidación. Contrariamente, la administración de MG132 no tiene efecto sobre la retención de la memoria. El grupo MG132 muestra altos niveles de *freezing*, que no difieren significativamente de los del VHC y son significativamente

mayores que los del grupo inyectado con SSZ. De manera similar, el grupo MG132/SSZ muestra niveles de freezing equivalentes al inyectado con VHC, sugiriendo que la inhibición del UPS impide la labilización de la memoria, cancelando el efecto amnésico de la SSZ. ( $F_{3,36} = 6,31$ ,  $p < 0,05$ ; VHC vs. SSZ:  $p < 0,05$ ; SSZ vs. MG132:  $p < 0,05$ ; SSZ vs. MG132/SSZ:  $p < 0,05$ ).

### *V.2.9 La inhibición del UPS en el hipocampo de ratón durante la reconsolidación bloquea el efecto facilitador del FK sobre la memoria de miedo*

La fosfatasa 2B dependiente de  $Ca^{+2}$ /calmodulina (calcineurina, CaN) es un regulador importante del nivel de fosforilación de proteínas en el sistema nervioso central dado que es directamente activado por señales de  $Ca^{+2}$ /calmodulina en espinas sinápticas. Algunos estudios apoyan que la CaN juega un rol como elemento negativo de la memoria en diferentes tareas (Baumgärtel et al., 2008; Havekes et al., 2008) y se encontró que está involucrado en la memoria de extinción (de la Fuente et al., 2011; Lin et al., 2003). Recientemente, encontramos evidencias de que CaN juega un rol como limitante negativo en memorias de miedo contextual en ratones y que la inhibición de CaN en el hipocampo mediante el inhibidor específico FK506 facilita la memoria (de la Fuente et al., en preparación).

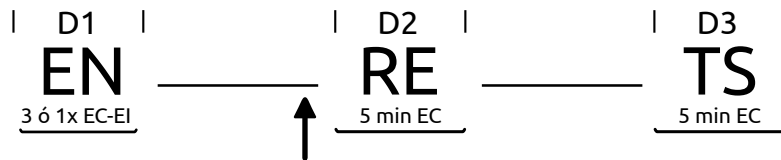
Hasta ahora pudimos comprobar en esta Tesis que el proteasoma juega un rol importante en la labilización de la memoria en cangrejos y que parece tener un rol en la labilización en ratones, como vimos en la sección anterior. En esta sección nos propusimos evaluar si, al igual que en cangrejos, la facilitación de la memoria durante la reconsolidación se vería impedida al inhibir el proteasoma en el paradigma de miedo contextual en ratones.

En el siguiente experimento utilizamos FK506 para facilitar la memoria y una combinación con MG132 para evaluar si la inhibición del UPS bloquea la facilitación durante la consolidación. Un grupo de animales fue entrenado con tres ensayos de choque en las patas y otros 3 grupos recibieron un protocolo



Figura V.10

A



B

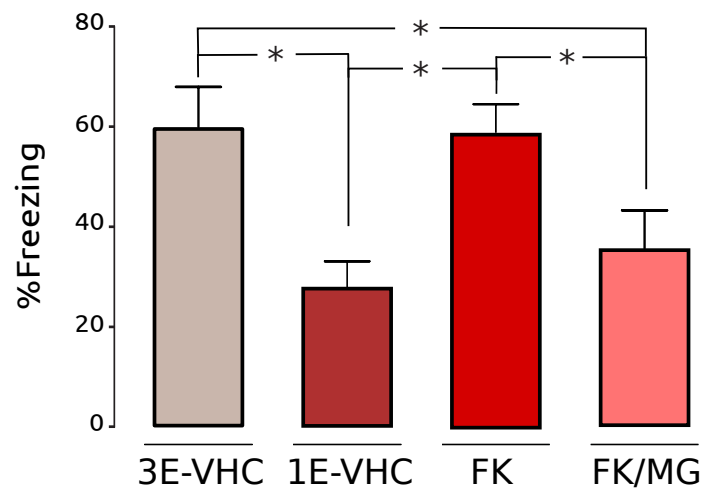


Figura V.10. La inhibición del proteasoma impide el efecto facilitador del FK sobre la reconsolidación de la memoria de condicionamiento de miedo. (A) Protocolo Experimental. En el Día 1, cuatro grupos fueron entrenados, un grupo con tres ensayos y tres grupos con 1 ensayo. En el día 2, todos los animales recibieron una inyección intrahipocampal bilateral. Un grupo entrenado con 3 ensayos recibió vehículo (3E-VHC). Un grupo entrenado con 1 ensayo también recibió vehículo (1E-VHC), otro fue inyectado con FK y otro con un cóctel de FK506 y MG132 (FK/MG). 15 min después, fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento. En el Día 3, los animales fueron colocados en los dispositivos experimentales durante 5 min. La flecha indica el momento de la inyección. (B) Sesión de evaluación. Porcentaje de freezing +/- E.E.M. \*:  $p < 0,05$ .  $n = 10$

de entrenamiento débil, que consistía en un sólo ensayo. En el día 2 todos los grupos fueron inyectados en el hipocampo de forma bilateral con vehículo (VHC) o con FK506 o con el cóctel FK506 y MG132. Luego de 15min fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento por 5min. El grupo que recibió 3 ensayos fue inyectado con vehículo (3E-VHC) y fue establecido como un control positivo de la retención de la memoria el día de la evaluación. Otro grupo entrenado con 1 ensayo fue también inyectado con vehículo (1E-VHC) y los otros dos grupos entrenados débilmente fueron inyectados con FK506 (FK) o con FK506 y MG132 (FK/MG). En el día 3 todos los ratones fueron reexpuestos 5min al contexto de entrenamiento para evaluar la memoria (Figura V.10.A). Durante la evaluación se estableció el porcentaje de *freezing* (Figura V.10.B). Como se esperaba, el grupo 3E-VHC mostró altos niveles de *freezing* mientras que el grupo 1E-VHC mostró niveles de *freezing* significativamente menores. El grupo 1E-FK manifestó niveles de *freezing* tan altos como el grupo 3E-VHC pero el grupo inyectado con el cóctel mostró niveles de *freezing* significativamente menores ( $F_{3,35} = 5,14, p < 0,05$ ; 1E-VHC vs. 3E-VHC:  $p < 0,05$ ; 1E-VHC vs. FK:  $p < 0,05$ ; 1E-VHC vs. FK/MG132: NS; FK/MG132 vs. 3E-VHC:  $p < 0,05$ ; FK/MG132 vs FK:  $p < 0,05$ ; FK vs 3E-VHC: NS]. Estos resultados indican que la administración del inhibidor de CaN en el hipocampo durante la consolidación facilita la memoria de miedo en ratones. Sin embargo, cuando es coadministrado con el inhibidor del UPS dicha facilitación no tiene lugar, indicando un bloqueo del proceso de labilización.

### V.3 DISCUSIÓN

En este capítulo vimos que el sistema de degradación de proteínas dependiente de proteasoma (UPS) es necesario durante la consolidación de la memoria, tanto en cangrejos como en ratones ya que la administración de MG132 provoca un efecto deletéreo sobre la memoria. A su vez, la administración de MG132 no afecta la memoria en estos dos modelos cuando se lo inyecta poco antes o poco después de la reactivación de la memoria pero es capaz de bloquear el efecto de drogas amnésicas o facilitadoras de la reconsolidación. El bloqueo por parte de MG132 de la acción de estas drogas es interpretado como una acción sobre el proceso de labilización de la memoria. Los resultados obtenidos están a favor de la hipótesis que plantea que el proteasoma juega un rol importante en la labilización, permitiendo la degradación de ciertas proteínas, principalmente sinápticas (Jarome et al., 2011; Lee et al., 2012, 2008). De esta manera, la inhibición del UPS impide que el proceso de labilización tenga lugar y por lo tanto en esas condiciones no es posible afectar el proceso de reconsolidación, ya sea para disrumpir o para facilitar la memoria.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Lee y colaboradores (Lee et al., 2012, 2008). En ese trabajo, la administración del inhibidor de UPS clasto-lactacistina-beta-lactona en el hipocampo durante la reconsolidación no impide la memoria de miedo contextual en ratones y sí impide el efecto amnésico del inhibidor de la síntesis de proteína, anisomicina. Los autores, además, encuentran que la misma dosis del inhibidor de UPS no tiene efecto durante la consolidación de la memoria. Estos resultados son contradictorios con la gran mayoría de los resultados obtenidos en distintas especies y modelos de memoria que reportan un efecto amnésico de la inhibición del UPS durante la consolidación. Los experimentos de este capítulo realizados en ratones durante la consolidación indican que es necesaria una dosis mayor del inhibidor del UPS MG132 para lograr un impedimento durante la consolidación de la memoria con respecto a la necesaria para bloquear el proceso de

labilización luego de la reactivación. Esto podría sugerir que la degradación de proteínas es de mayor magnitud o más prolongada en el tiempo en el caso de la consolidación con respecto a la labilización, lo que requeriría entonces una mayor dosis para bloquearla.

A diferencia de los trabajos antes mencionados, en este capítulo demostramos que la inhibición del UPS no sólo bloquea el efecto disruptor de inhibidores de síntesis proteica, sino también de un inhibidor más específico de una vía de señalización, en este caso, la vía IKK/NF- $\kappa$ B. Este resultado es importante para diseccionar el efecto de la inhibición del UPS sobre la memoria y sobre la labilización/reconsolidación en particular. Como planteamos en la introducción de este capítulo, la acción de los inhibidores de UPS fue interpretado como una acción específica sobre la labilización de la memoria, sugiriendo que el bloqueo de la traducción ya no era amnésico porque la memoria no podía volverse lábil luego de la evocación. Sin embargo, existe otra interpretación en términos del balance entre síntesis y degradación de elementos positivos y negativos de la plasticidad neuronal, como se encontró en el caso del LTP (Fonseca et al., 2006). En este caso, la degradación de proteínas podría no ser crítica para la reconsolidación pero cuando se inhibe dicha degradación, la síntesis de nuevas proteínas ya no sería requerida debido a que las proteínas preexistentes son suficientes para sostener el proceso de plasticidad. En este capítulo vimos que la inhibición del UPS bloquea el efecto amnésico de la inhibición de la vía IKK/NF- $\kappa$ B, tanto en cangrejos como en ratones. Este hecho apoya la interpretación de un efecto sobre la labilización y no sobre el balance entre degradación y síntesis de proteínas que estaría siendo alterado por los inhibidores del UPS y los inhibidores generales de la síntesis de proteína.

A su vez, a diferencia de los reportes de otros grupos, en este capítulo evaluamos por primera vez si el inhibidor del UPS también es capaz de bloquear el efecto de drogas facilitadoras de la reconsolidación. En este trabajo utilizamos dos drogas capaces de facilitar la memoria. Una de ellas, la bicuculina, es un antagonista competitivo del receptor tipo A de GABA y fue

utilizado previamente en la facilitación de la memoria de diferentes taxones (Brioni et al., 1989; Clements and Bourne, 1996; Chapouthier and Venault, 2002; Luft et al., 2004) y particularmente en cangrejos (Carbo Tano et al., 2009). Alternativamente, administramos FK506 en ratones, un inhibidor específico de CaN. El efecto facilitador de FK506 es atribuido al rol de CaN como un elemento negativo tanto en la consolidación como en la reconsolidación. Sin embargo, esta proteína fosfatasa juega un rol importante como elemento positivo en la formación de la memoria de extinción del condicionamiento de miedo en el hipocampo (de la Fuente et al., 2011).

Efectivamente, tanto en cangrejos como en ratones la facilitación de la memoria inducida durante la reconsolidación es bloqueada por el MG132. Este hallazgo apoya que la labilización de la memoria requiere de la degradación de ciertas proteínas mediante el UPS y sin ella no es posible modificar la fuerza de una memoria en la instancia de reactivación-reconsolidación (Baumgärtel et al., 2008; Havekes et al., 2008; de la Fuente, en preparación).

El mecanismo de degradación de proteínas por el mecanismo ubiquitina-proteasoma se encuentra evolutivamente conservado (Hegde et al., 1997; Chain et al., 1999, 2000; Lopez-Salon et al., 2001). La utilización de dos modelos de memoria asociativa contextual en diferentes *filum*, nos permitió evaluar el rol del UPS en la consolidación y reconsolidación de la memoria. En conclusión, el UPS juega un rol similar con cinéticas similares aunque la organización del sistema nervioso central de estas dos especies sea completamente diferente. Nuestros resultados, junto con la evidencia previa, apoya la idea de que durante la consolidación la degradación de proteínas que actúan como elementos negativos es importante para la plasticidad neural requerida para el almacenamiento de la memoria. Durante la reconsolidación sin embargo, la degradación de proteínas es también crítica para permitir el proceso de labilización, que permite que la fuerza de la memoria almacenada pueda ser modificada en base a la nueva experiencia, como veremos en el próximo capítulo.

# Capítulo VI

## **Posible papel de la labilización- reconsolidación en el fortalecimiento de la memoria**

## **Posible papel de la labilización-reconsolidación en el fortalecimiento de la memoria**

### VI.1 INTRODUCCIÓN

Hemos llegado al último capítulo de resultados de esta Tesis. En este capítulo nos preguntamos ¿Cuál es el rol de la labilización-reconsolidación? ¿Cuál es el valor adaptativo de poner en juego determinada memoria una y otra vez en la medida en que resulta reactivada? Quizás estas preguntas podrían haberse formulado al principio de esta Tesis, pero entonces el lector podría no estar familiarizado con el proceso que estamos discutiendo. De manera que hemos elegido abordar estas preguntas al final.

La reconsolidación no es una estabilización automática de la memoria evocada, sino un proceso especial que presenta la oportunidad de modificar adaptativamente esa memoria. La capacidad de realizar cambios plásticos en la fuerza o en el contenido de una memoria resulta adaptativo en términos de la relevancia de esa memoria al guiar el comportamiento (Lee, 2009). De esta manera se plantean dos hipótesis, no necesariamente excluyentes. La primera, el hecho de desestabilizar la traza mnésica, permitiría la integración de nueva información a la memoria preexistente. A este fenómeno se lo denominó actualización de la memoria (memory updating en la literatura inglesa) (Bailey et al., 1996; Lewis, 1969; Nader et al., 2000; Sara, 2000a, 2000b; Sara and Hars, 2006).

Existen determinadas condiciones que limitan al proceso de reconsolidación. Algunos trabajos aportaron evidencia de la incorporación de nueva información luego de la evocación, siempre y cuando los animales reactiven la memoria en paradigmas en los cuales el aprendizaje no alcanza el nivel asintótico o en situaciones en donde el estado del contexto de aprendizaje pueda variar en el tiempo, es decir bajo circunstancias en las

cuales sea probable que ocurra nuevo aprendizaje (Morris et al., 2006; Rodriguez-Ortiz et al., 2005), mientras que en otros casos si no existe la posibilidad de actualizar, la reconsolidación no tiene lugar (Tronel et al., 2005). Por otro lado, durante la incorporación de nueva información también se ha resaltado la importancia de la incongruencia entre la situación durante el aprendizaje y durante la evocación (ausencia del refuerzo) y particularmente el no cumplimiento de la expectativa que que tiene lugar durante la presentación del recordatorio debido a que, en el caso de el aprendizaje asociativo, el EC no es seguido del EI (Pedreira et al., 2003; Pedreira et al., 2004).

La segunda hipótesis sugiere que la funcionalidad del proceso está relacionada con que las memorias necesitan constantemente ser reforzadas (Alberini, C. M., 2007). Existen pocos trabajos que estudian el rol del fortalecimiento de la memoria en la reconsolidación (Forcato et al., 2011; Inda et al., 2011; Lee, 2008). En uno de los trabajos utilizan un paradigma de miedo contextual, en el cual los animales son entrenados en el día 1 con un único ensayo para asociar un contexto a un choque eléctrico. Al día siguiente se les presenta un segundo ensayo de entrenamiento y finalmente son evaluados en el tercer día (Lee, 2008). Resultados anteriores demostraron, en un paradigma similar, que el segundo ensayo de entrenamiento (día 2) induce la reconsolidación de la memoria adquirida en el día 1 (Duvarci and Nader, 2004). El problema que surge a partir de este protocolo es que se desconoce si el segundo ensayo desencadena un proceso de reconsolidación o de consolidación. Entonces plantean una doble disociación de los mecanismos celulares de la consolidación y la reconsolidación de memorias de miedo contextuales dependientes del hipocampo en el cual el factor neurotrófico derivado del cerebro BDNF es requerido para la consolidación mientras que un aumento de Zif268 indica un proceso de reconsolidación (Lee et al., 2004). De esta manera justifican que un segundo ensayo de entrenamiento desencadena un proceso de reconsolidación de la memoria al encontrarse



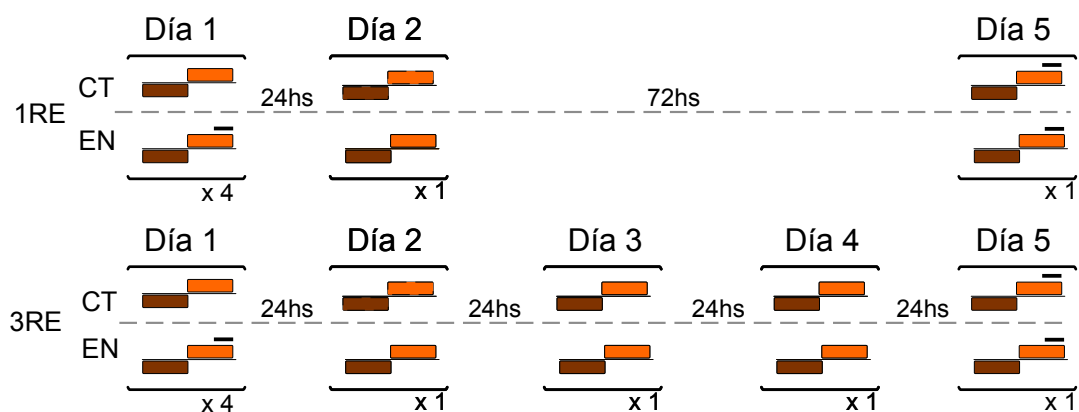
Zif268 aumentado. En relación al rol de la reconsolidación como instancia de fortalecimiento de la memoria, Lee encontró que un segundo ensayo de entrenamiento refuerza una memoria de miedo contextual previamente consolidada por sucesivas reactivaciones pero sólo si ocurre dentro de una ventana temporal. Asimismo, observó que bloqueando el proteasoma con clasto-Lactacystin-b-lactone de manera de prevenir la desestabilización, se mantenía invariable la fuerza de la memoria original (Lee, 2008). En otro trabajo realizado por el grupo de Alberini en el cual utilizan el paradigma de evitación inhibitoria, encontraron que la presentación de 3 recordatorios breves espaciados por 2 días aumentó la latencia de entrada al compartimento donde habían recibido el choque eléctrico, es decir que se reforzó la memoria. Dicho fortalecimiento fue sensible a inhibidores de las síntesis de proteínas como la cicloheximida (Inda et al., 2011).

En un trabajo realizado en memoria declarativa en humanos en nuestro laboratorio por Pedreira y colaboradores, se entrenó a los sujetos en el día 1 a que aprendieran una lista de sílabas y se realizaron tres tipos de protocolos de reactivación con un estímulo clave capaz de desencadenar el proceso de labilización, uno espaciado 5min, otro espaciado 2hs y el otro espaciado 24hs. Un grupo recibió un sólo estímulo clave, otro grupo recibió dos presentaciones del estímulo clave en dos días sucesivos, un tercer grupo recibió 2 presentaciones en un mismo día espaciado por 5min, un cuarto grupo recibió 2 presentaciones en un mismo día espaciado por 2hs y un último grupo recibió 4 presentaciones en un mismo día espaciado por 5min. Cuando se evaluó la memoria en el día 3 ó 4 se vio que la presentación del estímulo clave sólo fue capaz de reforzar la memoria si las presentaciones se realizaban dentro de la ventana temporal de la reconsolidación iniciada por el anterior, es decir a los 5min y a las 2hs (Forcato et al., 2011).

En este capítulo estudiaremos el posible efecto que tiene presentar sucesivos recordatorios sobre una memoria consolidada, evaluando la segunda hipótesis para la funcionalidad de la labilización-reconsolidación

Figura VI.1

A



B

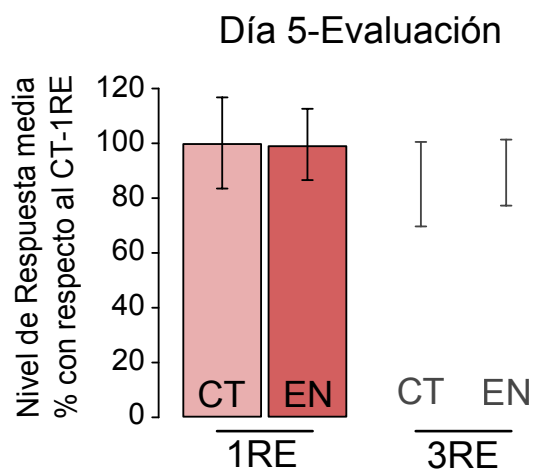


Figura VI.1: Varias reexposiciones en días consecutivos no refuerzan la memoria de CPC. (A) Protocolo Experimental. En el Día 1, dos pares de grupos controles (CT) y entrenados (EN) recibieron 4 presentaciones del cambio de iluminación. A los grupos entrenados además se les presentó el estímulo visual de peligro. En el Día 2, todos los grupos fueron reexpuestos a los actómetros y se les presentó el cambio de iluminación. En los días 3 y 4, un par CT/EN fue reexpuesto contexto de entrenamiento. En el Día 5, se realizó la sesión de evaluación y se les presentó el estímulo visual de peligro. (B) Sesión de evaluación. Respuesta media  $\pm$  E.E.M en el día 5, normalizado con respecto al grupo control reexpuesto una sola vez. \*:  $p < 0,05$ .  $n = 40$

relacionada con el fortalecimiento de la memoria. Para ello, utilizaremos el condicionamiento asociativo contextual en el cangrejo y el condicionamiento de miedo contextual en el ratón.

## VI.2 RESULTADOS

### *VI.2.1 Efecto sobre la memoria del CPC de tres reexposiciones al contexto de entrenamiento en días sucesivos*

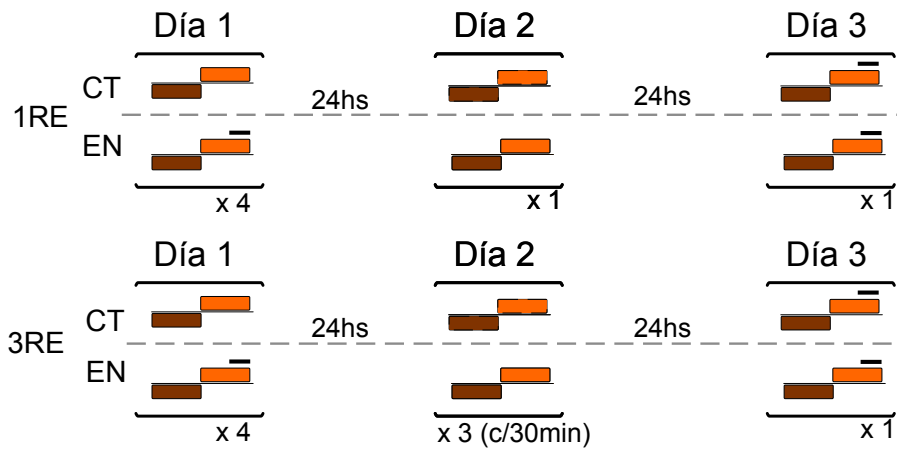
En los experimentos realizados en la primera parte de este capítulo empleamos protocolos de entrenamiento débil de CPC en *Neohelice*. Esto es, los animales son entrenados de manera tal que la memoria no es capaz de expresarse a largo término. De esta forma, es posible evaluar un posible efecto facilitador de la memoria como consecuencia de varias reexposiciones.

Como en los capítulos anteriores, el diseño experimental consistió en dos pares de grupos. Cada par estaba compuesto por un grupo control, expuesto al dispositivo experimental pero sin la presentación del estímulo visual de peligro (EI) y otro grupo entrenado con 4 ensayos. Luego de 24hs (día 2) todos los grupos fueron sometidos a un ensayo de cambio de iluminación sin la presentación del EI. En los días 3 y 4, un par de grupos fue colocado en el dispositivo experimental pero no recibió el cambio de iluminación (CT-1RE/EN-1RE) y el otro par tuvo el mismo cambio que en el día 2 (CT-3RE/EN-3RE). En el día 5 se evaluó la memoria de todos los animales (Figura VI.1.A).

Los resultados obtenidos en el día de la evaluación se muestran en la figura VI.1.B. Una única reexposición luego de un protocolo débil no facilita la memoria ( $F_{3,156}=0,01$ ; P:NS; CT-1RE vs. EN-1RE: p:NS y CT-3RE vs. EN-3RE: p:NS). En los resultados del presente experimento, nuevamente comprobamos que una única reexposición al contexto de entrenamiento luego de un protocolo

Figura VI.2

A



B

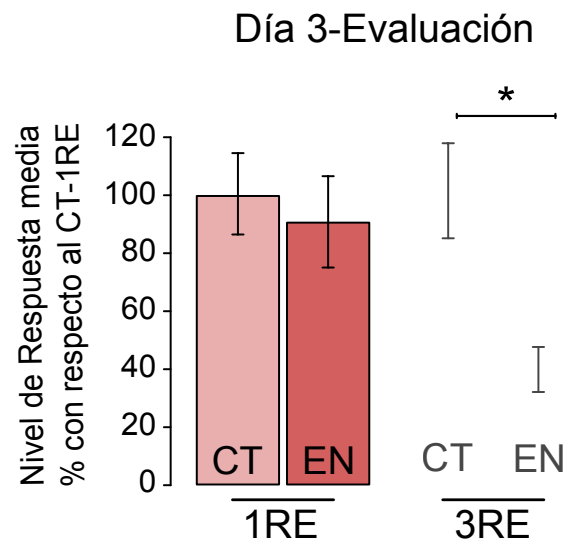


Figura VI.2: Varias reexposiciones en un mismo día refuerzan la memoria. (A) Protocolo Experimental. En el Día 1, dos pares de grupos controles (CT) y entrenados (EN) recibieron 4 presentaciones del cambio de iluminación. A los grupos entrenados además se les presentó el estímulo visual de peligro. En el Día 2, todos los grupos fueron reexpuestos a los actómetros y se les presentó el cambio de iluminación. Un par de grupos CT/EN recibió dos presentaciones más espaciadas cada 30min. En el Día 3, se realizó la sesión de evaluación y se les presentó el estímulo visual de peligro. (B) Sesión de evaluación. Respuesta media  $\pm$  E.E.M en el día 3, normalizado con respecto al grupo control reexpuesto una sola vez. \*:  $p < 0,05$ .  $n = 37$

débil no facilita la memoria, dado que no se ven diferencias significativas entre los grupos control y entrenado, como vimos en la figura 7 del capítulo V para el par VEH. Más aún, cuando se observan los resultados para los grupos reexpuestos 3 veces en 3 días consecutivos, no se observan diferencias significativas entre los grupos control y entrenados, indicando que este tipo de reexposición no es capaz de facilitar la memoria de largo término.

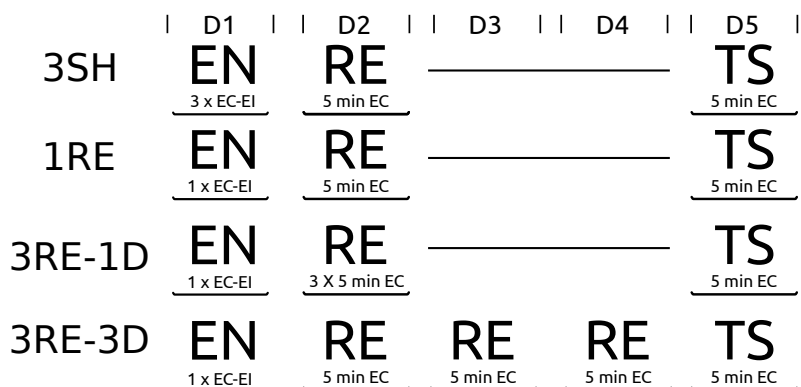
#### *VI.2.2 Efecto sobre la memoria del CPC de tres reexposiciones sucesivas en un mismo día*

El siguiente experimento fue realizado con el fin de evaluar si la presentación repetida del recordatorio con un intervalo breve entre presentaciones es capaz de producir una facilitación de la memoria. Nuevamente contamos con los 2 mismos pares de grupos del experimento anterior y realizamos un protocolo de entrenamiento débil durante el día 1. Luego de 24hs un par de grupos fue sometido al cambio de iluminación una sola vez (CT-1RE/EN-1RE) mientras que el otro par fue sometido al cambio de iluminación 3 veces con un intervalo entre reexposiciones de 30min (CT-3RE/EN-3RE). En el día 3 se realizó la sesión de evaluación de todos los grupos (Figura VI.2.A).

Los resultados obtenidos para la sesión de evaluación se muestran en la figura VI.2.B. Nuevamente comprobamos que luego de un entrenamiento débil, una sola reexposición al contexto no alcanza para facilitar la memoria de largo término dado que los grupos CT/EN no difieren significativamente. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y entrenado del par reexpuesto 3 veces en un mismo día ( $F_{3,144}=4,38$ ;  $p<0,05$ ; CT-1RE vs. EN-1RE:  $p$ :NS y CT-3RE vs. EN-3RE:  $p<0,05$ ). Estos resultados indican que la inducción repetida del proceso de reconsolidación es capaz de reforzar la memoria de largo término en este modelo, siempre y cuando dichas

Figura VI.3

A



B

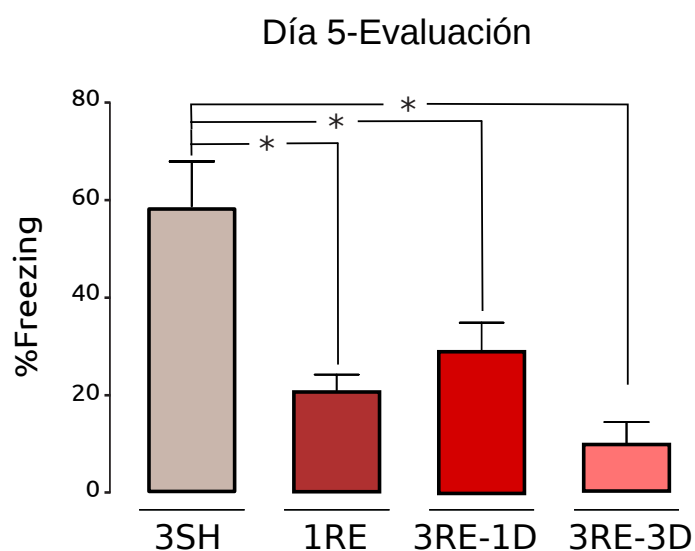


Figura VI.3: Varias reexposiciones no refuerzan la memoria de condicionamiento de miedo en ratones. (A) Protocolo Experimental. En el Día 1, cuatro grupos fueron entrenados un grupo con tres ensayos (3SH) y tres grupos con 1 ensayo. En el Día 2, todos los grupos fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento durante 5min, el grupo 3SH y otro grupo entrenado con un ensayo (1RE) no recibieron más reexposiciones hasta la sesión de evaluación. En el mismo Día 2, uno de los grupos entrenados con 1 ensayo fue reexpuesto dos veces más al contexto de entrenamiento con un intervalo entre reexposiciones de 30min (3RE-1D). En los días 3 y 4, otro grupo entrenado con 1 ensayo fue reexpuesto durante 5min cada vez (3RE-3D). En el Día 5, se realizó la sesión de evaluación. (B) Sesión de evaluación. Porcentaje de freezing +/- E.E.M. \*:  $p < 0,05$ .  $n=10$

inducciones tengan lugar con un intervalo breve de tiempo entre ellas.

### *VI.2.3 Efecto de tres reexposiciones al contexto de entrenamiento sobre la memoria de miedo contextual en el ratón*

Con el objetivo de realizar un estudio comparativo entre la memoria contextual en crustáceos y en mamíferos, realizamos el siguiente experimento en ratones, conteniendo cuatro grupos. Un grupo fue entrenado con un protocolo estándar de 3 choques asociados a un tono (3SH). Este grupo nos permite definir un nivel de *freezing* adecuado a una memoria de largo término. Los otros tres grupos fueron entrenados con un protocolo débil, consistente en un solo choque. Este entrenamiento sólo permite la formación de una memoria débil que desencadena un bajo nivel de *freezing*. Luego de 24hs todos los grupos recibieron una reexposición al contexto de entrenamiento. Uno de los grupos, recibió además otras 2 reexposiciones al contexto de entrenamiento espaciadas por 30min (3RE-1D). Durante dos días sucesivos todos los grupos permanecieron en sus cajas excepto uno de los grupos que recibió entrenamiento débil y que fue reexpuesto en el día 2. Este grupo fue reexpuesto nuevamente en los días 3 y 4 (3RE-3D). El último grupo, que llamaremos 1RE, fue entrenado débilmente y reexpuesto una sola vez en el día 2. En el día 5 evaluamos la memoria de todos los animales por reexposición al contexto (Figura VI.3.A).

Los resultados obtenidos durante la sesión de evaluación se muestran en la figura VI.3.B. Los animales que recibieron 3 choques eléctricos en el día del entrenamiento y una reexposición en el día 2, muestran un alto nivel de *freezing*, significativamente mayor que el de los otros grupos. Esto indica por un lado, que una reexposición no es suficiente para facilitar la memoria de miedo contextual a largo término. Más aún, de acuerdo a estos resultados, 3 reexposiciones en un mismo día espaciadas por 30min o 3 reexposiciones en

días consecutivos no son suficientes para facilitar la memoria en este modelo ( $F_{3,36} = 10,14$ ,  $p < 0,05$ ; 3SH vs. 3RE-3D:  $p < 0,05$ ; 3RE-3D vs. 3RE-1D: NS; 3RE-3D vs. 1RE: NS; 3SH vs. 1RE:  $p < 0,05$ ; 3RE-1D vs 1RE: NS; 3SH vs 3RE-1D:  $p < 0,05$ ).

### VI.3 DISCUSIÓN

La conclusión central de este capítulo es que cuando la memoria es labilizada por la presentación de un estímulo apropiado y el proceso de labilización-reconsolidación es desencadenado nuevamente por la presentación de un nuevo recordatorio dentro de la ventana temporal del primero, la memoria resulta facilitada, de modo tal que los cangrejos *Neohelice* son capaces de expresar en la sesión de evaluación una memoria inicialmente débil y no expresada. Este fortalecimiento de la memoria encontrado en el cangrejo coincide con los resultados encontrados en humanos (Forcato et al., 2011). Por el contrario, si los recordatorios son presentados en días distintos, el fortalecimiento no ocurre.

Esta diferencia entre las ventanas temporales podría deberse a que un recordatorio puede activar determinadas cascadas de señalización intracelular que quedarían disponibles para ser reactivadas rápidamente, o para sumar y acumular activaciones, pero esto no ocurriría si la reactivación sucede algún tiempo después, cuando la activación de las cascadas de señalización decayó.

En relación a los resultados obtenidos en ratones, no encontramos fortalecimiento de la memoria con ninguno de los dos protocolos presentados. Los resultados para el protocolo espaciado 24hs coinciden con el observado en cangrejos pero no así el resultado para el espaciado 30min. Es posible que en ratones la ventana temporal sea distinta y por lo tanto estemos por fuera de ella a los 30 min. Dado que en los experimentos realizados en humanos las sesiones están espaciadas por 5min o por 2hs y



en ese caso sí ocurre un fortalecimiento de la memoria (Forcato et al., 2011), se podría en un futuro experimento evaluar en ratones el efecto de utilizar ese mismo intervalo entre sesiones.

Sin embargo, los resultados obtenidos aquí en cangrejos y ratones difieren con los obtenidos en los únicos trabajos previos en ratas en los cuales se encuentra un fortalecimiento de la memoria en días sucesivos (Inda et al., 2011; Lee, 2008). Las diferencias encontradas con el trabajo del grupo de Alberini (Inda et. al., 2011) podrían deberse principalmente al tipo de paradigma utilizado, así como al hecho de utilizar una especie distinta. En este trabajo se observa un fortalecimiento de la memoria consolidada de evitación inhibitoria luego de un protocolo de entrenamiento fuerte y las reexposiciones utilizadas fueron muy breves, de manera de evitar que se desencadene un proceso de extinción en lugar de uno de reconsolidación. En cambio, en nuestro paradigma entrenamos a los animales con un protocolo débil dado que con uno fuerte no es posible ver un fortalecimiento ulterior debido a que en el condicionamiento de miedo contextual encontramos un efecto de "techo" que no permite ver valores de RC mayores a 40-60 %. De esta manera, nuestras reexposiciones fueron de 5min, tiempo necesario para desencadenar la reconsolidación en este paradigma, pero no hemos podido dilucidar aún si existe un proceso de extinción que contrabalancea el posible efecto facilitador.

Los resultados de fortalecimiento obtenidos por Lee (2008) podrían atribuirse a un re-entrenamiento y no a un proceso de reconsolidación debido a que en su diseño experimental presenta el EC seguido del EI. El autor plantea que la reconsolidación está teniendo lugar a pesar de la presentación reforzada porque encuentra un aumento de Zif268, que fue encontrado anteriormente en su laboratorio como característica diagnóstica de dicho proceso. Sin embargo, consideramos que este dato es poca evidencia para afirmar que se trata de un proceso de reconsolidación y no simplemente de un reentrenamiento. Una sesión de reentrenamiento naturalmente es capaz de

reforzar la memoria original.

En estos trabajos mencionados no se presentan los recordatorios en un mismo día, sino que son espaciados por 24hs. De esta manera, no es posible comparar con los resultados observados en esta Tesis en los que el fortalecimiento se obtiene con un intervalo breve de sesiones de recordatorio.

# Capítulo VII

## **Discusión General**

## Discusión general

A lo largo de esta Tesis se llevaron a cabo diferentes estudios orientados a profundizar sobre las características de la fase de labilización-reconsolidación de la memoria que permite el reprocesamiento de una memoria ya formada y consolidada. Este estudio se llevó a cabo de manera comparativa, estudiando memorias de características similares en crustáceos y mamíferos.

### *VII.1 El nuevo paradigma*

En esta Tesis demostramos inicialmente la existencia de un aprendizaje asociativo contextual en el cangrejo *Neohelice granulata*. Luego de su caracterización y determinación de las fases de la memoria para este aprendizaje, realizamos estudios comparativos con un paradigma semejante en un vertebrado, el condicionamiento de miedo contextual en el ratón *Mus musculus*. De esta manera, obtuvimos evidencias que indican que el cangrejo *Neohelice* establece una asociación entre un contexto particular y un estímulo aversivo, llamado estímulo visual de peligro (Estímulo incondicionado, EI) y que dicha asociación sólo sucede si los estímulos son presentados de manera pareada. A su vez, encontramos que el estímulo aversivo no se asocia con las características generales del dispositivo experimental, sino con los rasgos particulares del contexto de iluminación superior. Este resultado permite descartar la interpretación de una habituación en lugar de una asociación.

Más aún, encontramos que la respuesta de *freezing* adquirida durante el entrenamiento no es expresada cuando se cambian las características relevantes del contexto entre la sesión de entrenamiento y la de evaluación. Esta diferencia en la percepción indica que la iluminación superior no está actuando como una clave asociada al EI por sí misma, sino que la combinación entre el contenedor y la iluminación superior es lo que define el EC en este

nuevo paradigma.

Contrariamente a lo que ocurría con el protocolo tradicional, con el nuevo paradigma encontramos una clara respuesta anticipatoria luego del cambio de iluminación inferior a superior durante el primer ensayo de evaluación

Inicialmente encontramos MCT que se expresa 2hs luego del entrenamiento pero que no se expresa con la presentación del EC, pero sí con la presentación de EI. Contrariamente, 4hs luego del entrenamiento pudo observarse un bajo nivel de respuesta en los animales entrenados tanto con la presentación del EC como con la del EI. Nosotros postulamos que inicialmente se expresa una MCT no asociativa y luego, una vez que la consolidación de la memoria de condicionamiento está completa, la MCT es reemplazada por una MLT asociativa. Sin embargo, otros experimentos serían necesarios para evaluar si la memoria expresada a las 4hs posee distintas características que la memoria expresada 24hs luego del entrenamiento.

La consolidación de la memoria del nuevo paradigma fue sensible al inhibidor de síntesis de proteínas cicloheximida, como era de esperar para una MLT. Más aún, fue posible facilitar la memoria durante la consolidación con la administración del antagonista GABAérgico bicuculina como se había visto en el paradigma tradicional (Carbo Tano et al., 2009).

Encontramos que la memoria generada a partir del nuevo paradigma muestra extinción cuando los cangrejos son reexpuestos al contexto de iluminación superior de manera prolongada un día luego del entrenamiento. Dicha extinción sólo fue alcanzada cuando la exposición al contexto fue de 2hs, similar a lo observado en el protocolo tradicional (Hepp et al., 2009; Pedreira et al., 2004).

Actualmente se dispone de importante información sobre las características de la representación del estímulo visual de peligro, pero existe poca evidencia sobre los sustratos neuronales de la representación de las características contextuales (Sztarker and Tomsic, 2011). El desarrollo de este nuevo paradigma es una herramienta importante a la hora de buscar estos

sustratos neuronales que codifiquen para la representación del contexto debido a la posibilidad de una presentación discreta del mismo, lo cual permitiría el abordaje con técnicas electrofisiológicas, entre otras.

### *VII.2 El factor de transcripción NF-κB*

En relación al rol que juega la vía de regulación transcripcional dependiente del factor de transcripción NF-κB en la formación de la memoria en el nuevo paradigma de condicionamiento pavloviano, podemos concluir que se encuentra involucrado en la consolidación ya que la inhibición de dicha vía previa al entrenamiento produce un efecto amnésico

A su vez, dicho factor de transcripción también está involucrado en la reconsolidación de la memoria de condicionamiento pavloviano puesto que su inhibición previa a la reactivación conduce a un efecto amnésico, al impedir la reestabilización. Ambos resultados coinciden con lo observado previamente en nuestro laboratorio en el modelo de MCS (Merlo et al., 2002; Merlo et al., 2005).

### *VII.3 El Recordatorio*

Una vez consolidada la memoria contexto-señal, la presentación del contexto de entrenamiento por un período breve sin el estímulo visual de peligro, desencadena el proceso de reconsolidación (Pedreira et al., 2002; Pedreira & Maldonado, 2003). Asimismo, resultados previos en el paradigma clásico demostraron que para desencadenar la labilización, el recordatorio no debe incluir el refuerzo. Esto fue interpretado en términos del cumplimiento de la expectativa que generó el aprendizaje asociativo. Es decir que, una vez establecida la contingencia entre el contexto de aprendizaje y el estímulo

visual de peligro, ante la presencia del contexto de entrenamiento el animal espera la presentación del EI. Si el estímulo visual de peligro es presentado, entonces la expectativa contexto-señal queda cumplida y el fenómeno de labilización no se desencadena. Por el contrario, si sólo se presenta el contexto, la discordancia entre lo que el animal espera y lo que realmente ocurre es fundamental para que la memoria contexto-señal atraviese la fase de labilización-reconsolidación. Demostrando así que no toda evocación desencadena la reconsolidación y la importancia del componente de discordancia (Pedreira et al., 2004). En esta Tesis demostramos que lo mismo ocurre en el nuevo paradigma pavloviano. La presencia del EI en la fase de reexposición al contexto de entrenamiento hace que la labilización no tenga lugar. Vimos además que es necesario que la iluminación superior asociada al estímulo incondicionado sea presentada. De lo contrario, es decir si el animal permanece en el contexto de entrenamiento iluminado desde abajo, tampoco se desencadena el proceso de labilización-reconsolidación. Este hecho está indicando que la labilización-reconsolidación es altamente específica para el EC que fue asociado con el EI. En este caso la asociación fue establecida pareando explícitamente al EI con un lugar determinado únicamente cuando se presenta con una iluminación superior.

### *VII.4 El sistema ubiquitina-proteasoma*

Como vimos en el capítulo V, el sistema de degradación de proteínas dependiente de proteasoma (UPS) es necesario durante la consolidación de la memoria, tanto en cangrejos como en ratones. A su vez, la administración del inhibidor no afecta la memoria en estos dos modelos cuando se lo inyecta antes o después de la reactivación de la memoria, pero sí es capaz de bloquear el efecto de drogas amnésicas o facilitadoras de la reconsolidación de la memoria.

El bloqueo por parte de MG132 de la acción de estas drogas es

interpretado como una acción sobre el proceso de labilización de la memoria. Los resultados obtenidos están a favor de la hipótesis que plantea que el proteasoma juega un rol importante en la labilización de la memoria, permitiendo la degradación de ciertas proteínas, principalmente sinápticas (Jarome et al., 2011; Lee et al., 2012, 2008) que desestabilizarían la traza de memoria. De esta manera, la inhibición del UPS impide que el proceso de labilización tenga lugar y por lo tanto en esas condiciones no es posible afectar la reconsolidación, ya sea para disrumpir o para facilitar la memoria. Estos resultados concuerdan con los reportados por Lee y colaboradores (Lee et al., 2012, 2008) donde utilizan una droga diferente para inhibir al UPS (clasto-lactacistina-beta-lactona) en el hipocampo en la memoria de miedo contextual en ratones.

La acción de los inhibidores de UPS fue interpretado como específica sobre la labilización de la memoria, sugiriendo que el bloqueo de la traducción ya no resulta amnésico porque la memoria no puede volverse lábil luego de la evocación. Sin embargo, existe otra interpretación en términos del balance entre síntesis y degradación de elementos positivos y negativos de la plasticidad neuronal, como se encontró en el caso del LTP (Fonseca et al., 2006). En este caso, cuando se inhibe al proteasoma, la síntesis de nuevas proteínas ya no sería requerida debido a que las proteínas preexistentes son suficientes para sostener el proceso de plasticidad y por lo tanto, la degradación de proteínas podría no ser crítica para la reconsolidación. Nosotros encontramos que la inhibición del UPS bloquea el efecto amnésico de la inhibición de la vía IKK/NF- $\kappa$ B, tanto en cangrejos como en ratones. De esta manera, nuestros resultados apoyan la interpretación de un efecto sobre la labilización y no sobre el balance entre degradación y síntesis de proteínas.

A su vez, evaluamos por primera vez en un modelo de memoria el efecto de inhibir al UPS sobre la acción de drogas facilitadoras de la reconsolidación. Nosotros encontramos que la administración de bicuculina, un antagonista competitivo del receptor tipo A de GABA capaz de facilitar la memoria de



reconsolidación en cangrejos (Carbo Tano et al., 2009) no es capaz de facilitar dicho proceso en presencia del inhibidor del sistema UPS. Alternativamente, el efecto facilitador de FK506, debido a la inhibición de CaN como un elemento negativo en la consolidación y reconsolidación en ratones (de la Fuente et al., en preparación), pierde su efecto cuando se lo administra conjuntamente con el inhibidor del proteasoma MG132. Este hallazgo se encuentra en concordancia con la idea de que la labilización de la memoria requiere de la degradación de ciertas proteínas mediante el UPS y que sin ella no es posible modificar la fuerza de una memoria en la instancia de labilización-reconsolidación (Baumgärtel et al., 2008; Havekes et al., 2008; de la Fuente, en preparación). La gran mayoría de los resultados obtenidos en distintas especies y modelos de memoria reportan un efecto amnésico de la inhibición del UPS durante la consolidación. Sin embargo, en esta Tesis y en otros trabajos se encontró que la misma dosis del inhibidor de UPS que tiene efecto durante la reconsolidación, no tiene efecto durante la consolidación de la memoria (Lee et al., 2008). De esta manera, nosotros encontramos que en ratones es necesaria una dosis mayor del inhibidor del UPS MG132 para lograr un impedimento durante la consolidación de la memoria con respecto a la necesaria para bloquear el proceso de labilización luego de la reactivación. Esto podría deberse a que durante la consolidación la degradación de proteínas es de mayor magnitud o sucede en un tiempo más prolongado, requiriendo entonces una mayor dosis para bloquearla.

La utilización de dos modelos de memoria asociativos contextuales en diferentes *filum*, nos permitió evaluar el rol del UPS en la consolidación y reconsolidación de la memoria. Los resultados obtenidos sugieren que el papel de este sistema se encuentra evolutivamente conservado.

En conclusión, el UPS juega un rol similar con cinéticas similares aunque la organización del sistema nervioso central de estas dos especies sea completamente diferente. Nuestros resultados, junto con la evidencia previa, sostiene la idea de que durante la consolidación, la degradación de proteínas

que actúan como elementos negativos es importante para la plasticidad neural requerida en el almacenamiento de la memoria. Durante la reconsolidación, la degradación de proteínas es también crítica para permitir el proceso de labilización en el cual la fuerza de la memoria almacenada puede ser modificada en base a la nueva experiencia. Más aún, se encontró que determinadas proteínas sinápticas, en particular GKAP y SHANK, se encontraban poliubiquitinizadas y posteriormente degradadas luego de la reactivación de la memoria en un paradigma de miedo condicionado (Lee et al., 2008 y Jarome et al., 2011). Un trabajo realizado en FLT en *Aplysia* sugiere que las mismas conexiones sináptica que codifican para el almacenamiento de una memoria son desestabilizadas y reestabilizadas luego de la reactivación de la memoria (Lee et al., 2012). Estas evidencias apoyan la idea de que durante la labilización de la memoria ocurren fenómenos relacionados con la desestabilización y retracción de las sinapsis. En este sentido resulta interesante poder observar el número y la calidad de las espinas luego de la reactivación de la memoria. En resultados preliminares de nuestro grupo se ha observado una disminución en la densidad de espinas luego de la labilización del condicionamiento de miedo contextual en la región CA1 del hipocampo (de la Fuente et al., en preparación).

### *VII.5 Fortalecimiento*

Diferentes hipótesis han sido postuladas acerca de la posible funcionalidad del fenómeno de reconsolidación. Una de ellas plantea a la reconsolidación como un fenómeno que permite el fortalecimiento de las memorias por sucesivas reactivaciones, la otra lo propone como un mecanismo que posibilita la incorporación de nueva información a memorias preexistentes (Sara, 2000a; Nader, 2003; Morris et al., 2006), pero hasta el momento muy pocos trabajos ilustran el posible rol de este fenómeno quedando la interpretación de los resultados abierta a debate (Tronel et al., 2005; Morris et al., 2006; Lee, 2009).

En nuestro modelo de memoria de miedo pavloviano en el cangrejo *Neohelice* se observó que sucesivas reactivaciones producían el fortalecimiento de la memoria. Para que esto sucediera, los recordatorios debían ser presentados dentro de una ventana temporal. Si los recordatorios son presentados en días distintos, el fortalecimiento no ocurre. Este fortalecimiento de la memoria encontrado en el cangrejo coincide con los resultados encontrados en humanos (Forcato et al., 2011).

Esta diferencia entre las ventanas temporales de los recordatorios sucesivos podría ser atribuida a que un recordatorio puede activar determinadas cascadas de señalización intracelular que quedarían disponibles para ser reactivadas rápidamente, o para sumar y acumular activaciones, pero esto no ocurriría si la reactivación sucede algún tiempo después, cuando la activación de las cascadas de señalización decayó a niveles basales.

En relación a los resultados obtenidos en ratones, no encontramos fortalecimiento de la memoria con ninguno de los dos protocolos presentados. Los resultados observados para el protocolo espaciado 24hs coinciden con el observado en cangrejos pero no así el resultado para el espaciado 30min. Es posible que en ratones la ventana temporal sea distinta y por lo tanto estemos por fuera de ella a los 30 min. Dado que en los experimentos realizados en humanos cuando las sesiones están espaciadas por 5min o 2hs sí ocurre un fortalecimiento de la memoria (Forcato et al., 2011), se plantea en un futuro experimento evaluar en ratones el efecto de utilizar esos mismos intervalos entre sesiones.

## Conclusiones generales

-El cangrejo *Neohelice* es capaz de establecer asociaciones de tipo contextual con las características del condicionamiento pavloviano. Las asociaciones contextuales son más complejas que las establecidas con estímulos o claves puntuales ya que implican el procesamiento de un conjunto de estímulos que deben estar presentes y que el reconocimiento de un lugar específico. En el caso estudiado en esta Tesis, el reconocimiento de estas características contextuales llegan a un nivel de sutileza tal que es capaz discriminar la forma en que el lugar es iluminado.

- El proceso de labilización y reconsolidación de la memoria asociativa contextual es inducido de manera similar entre cangrejos y ratones. Requiere de una re-exposición breve al contexto de entrenamiento. Una re-exposición prolongada lleva a la extinción de la memoria (Fustiñana et al., 2012; Suzuki et al., 2004; de la Fuente et al., 2011).

-En ambos modelos, la vía de regulación transcripcional dependiente del factor de transcripción NF-kB es necesaria para la consolidación y reconsolidación de la memoria.

-En ambos modelos, el UPS es necesario en la consolidación para la degradación de elementos reguladores negativos de los mecanismos de plasticidad neuronal. Por otro lado, es necesario para el proceso de labilización, en el cual la degradación de proteínas participaría en la

desestabilización de la marca mnésica.

-Sólo en el modelo de memoria en cangrejos encontramos un efecto de fortalecimiento de la memoria por sucesivos eventos de labilización-reconsolidación. Esta facilitación de la memoria sólo tiene lugar cuando los recordatorios son presentados dentro de la ventana temporal de la reconsolidación, sugiriendo un efecto acumulativo de los mecanismos de plasticidad desencadenados. Este fenómeno ha sido encontrado también en memorias en humanos (Forcato et al., 2011), lo que sugiere una funcionalidad conservada para la fase de reconsolidación.

# Referencias

## Referencias

- Agranoff, B.W., Davis, R.E., Brink, J.J., 1965. Memory fixation in the goldfish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54, 788–793.
- Alberini, C.M., 2005. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 28, 51–6.
- Alberini, C.M., 2007. Reconsolidation: the samsara of memory consolidation. *Debates in Neuroscience* 1, 17–24.
- Alberini, C.M., 2008. The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism. *Neurobiol Learn Mem* 89, 234–246.
- Amano, H., Maruyama, I.N., 2011. Aversive olfactory learning and associative long-term memory in *Caenorhabditis elegans*. *Learn. Mem.* 18, 654–665.
- Anagnostaras, S.G., Maren, S., Fanselow, M.S., 1999. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J. Neurosci.* 19, 1106–1114.
- Anagnostaras, S.G., Gale, G.D., Fanselow, M.S., 2001. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 11, 8–17.
- Anokhin, K.V., Tiunova, A.A., Rose, S.P.R., 2002. Reminder effects - reconsolidation or retrieval deficit? Pharmacological dissection with protein synthesis inhibitors following reminder for a passive-avoidance task in young chicks. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1759–1765.
- Artinian, J., McGauran, A.-M.T., De Jaeger, X., Mouldous, L., Frances, B., Roulet, P., 2008. Protein degradation, as with protein synthesis, is required during not only long-term spatial memory consolidation but also reconsolidation. *Eur. J. Neurosci.* 27, 3009–3019.
- Bailey, C.H., Bartsch, D., Kandel, E.R., 1996. Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13445–13452.

- Barger, S.W., Hörster, D., Furukawa, K., Goodman, Y., Kriegstein, J., Mattson, M.P., 1995. Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca<sup>2+</sup> accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9328–9332.
- Baumgärtel, K., Genoux, D., Welzl, H., Tweedie-Cullen, R.Y., Koshibu, K., Livingstone-Zatchej, M., Mamie, C., Mansuy, I.M., 2008. Control of the establishment of aversive memory by calcineurin and Zif268. *Nat. Neurosci.* 11, 572–578.
- Berón, M.P., 2003. Dieta de juveniles de Gaviota Cangrejera (*Larus atlanticus*) en estuarios de la provincia de Buenos Aires. *El hornero* 18, 113–117.
- Bingol, B., Schuman, E.M., 2005. Synaptic protein degradation by the ubiquitin proteasome system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 536–541.
- Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., 1969. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J Comp Physiol Psychol* 68, 129–135.
- Blondeau, N., Widmann, C., Lazdunski, M., Heurteaux, C., 2001. Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. *J. Neurosci.* 21, 4668–4677.
- 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, 13436–45.
- Bouton, M.E., 1988. Context and ambiguity in the extinction of emotional learning: implications for exposure therapy. *Behav Res Ther* 26, 137–149.
- Bouton, M.E., 1993. Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol Bull* 114, 80–99.
- Bouton, M.E., 2002. Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biol. Psychiatry* 52, 976–986.
- Brembs, B., Wiener, J., 2006. Context and occasion setting in *Drosophila* visual



- learning. *Learn. Mem.* 13, 618–628.
- Brioni, J.D., Nagahara, A.H., McGaugh, J.L., 1989. Involvement of the amygdala GABAergic system in the modulation of memory storage. *Brain Res* 487, 105–12.
- Brooks, D.C., Bouton, M.E., 1993. A retrieval cue for extinction attenuates spontaneous recovery. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 19, 77–89.
- Browning, K., Lukowiak, K., 2008. Ketamine inhibits long-term, but not intermediate-term memory formation in *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience* 155, 613–625.
- Burnovicz, A., Hermitte, G., 2010. Conditioning of an autonomic response in Crustacea. *Physiol. Behav.* 101, 168–175.
- Carbo Tano, M., Molina, V.A., Maldonado, H., Pedreira, M.E., 2009. Memory consolidation and reconsolidation in an invertebrate model: the role of the GABAergic system. *Neuroscience* 158, 387–401.
- Castellucci, V., Pinsker, H., Kupfermann, I., Kandel, E.R., 1970. Neuronal mechanisms of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 167, 1745–1748.
- Chain, D.G., Casadio, A., Schacher, S., Hegde, A.N., Valbrun, M., Yamamoto, N., Goldberg, A.L., Bartsch, D., Kandel, E.R., Schwartz, J.H., 1999a. Mechanisms for generating the autonomous cAMP-dependent protein kinase required for long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron* 22, 147–156.
- Chain, D.G., Schwartz, J.H., Hegde, A.N., 1999b. Ubiquitin-mediated proteolysis in learning and memory. *Mol. Neurobiol.* 20, 125–142.
- Chapouthier, G., Venault, P., 2002. GABA-A receptor complex and memory processes. *Curr Top Med Chem* 2, 841–51.
- Clements, M.P., Bourne, R.C., 1996. Passive avoidance learning in the day-old chick is modulated by GABAergic agents. *Pharmacol Biochem Behav* 53, 629–34.

- Colledge, M., Snyder, E.M., Crozier, R.A., Soderling, J.A., Jin, Y., Langeberg, L.K., Lu, H., Bear, M.F., Scott, J.D., 2003. Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. *Neuron* 40, 595–607.
- Davis, H.P., Squire, L.R., 1984. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 96, 518–59.
- De la Fuente, V., Freudenthal, R., Romano, A., 2011. Reconsolidation or extinction: transcription factor switch in the determination of memory course after retrieval. *J. Neurosci.* 31, 5562–5573.
- Debiec, J., LeDoux, J.E., Nader, K., 2002. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36, 527–38.
- Dickinson, A., 1980. *Contemporary Animal Learning Theories*. Cambridge: Cambridge University Press.
- DiDonato, J., Mercurio, F., Rosette, C., Wu-Li, J., Suyang, H., Ghosh, S., Karin, M., 1996. Mapping of the inducible I $\kappa$ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1295–1304.
- Dudai, Y., 2002. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol* 12, 211–6.
- Dudai, Y., 2004. *Memory from A to Z: Keywords, Concepts, and Beyond*. Oxford University Press.
- Dudai, Y., Eisenberg, M., 2004. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44, 93–100.
- Dudai, Y., 2006. Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Curr Opin Neurobiol* 16, 174–8.
- Duncan, C.P., 1949. The retroactive effect of electroshock on learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 42, 32–44.
- Duvarci, S., Nader, K., 2004. Characterization of fear memory reconsolidation. *J. Neurosci.* 24, 9269–9275.
- Duvarci, S., Nader, K., LeDoux, J.E., 2008. De novo mRNA synthesis is required

- for both consolidation and reconsolidation of fear memories in the amygdala. *Learn. Mem.* 15, 747–755.
- Ehlers, M.D., 2003. Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci* 6, 231–42.
- Eisenberg, M., Kobil, T., Berman, D.E., Dudai, Y., 2003. Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science* 301, 1102–1104.
- Emptage, N.J., Carew, T.J., 1993. Long-term synaptic facilitation in the absence of short-term facilitation in *Aplysia* neurons. *Science* 262, 253–256.
- Falls, W.A., Miserendino, M.J., Davis, M., 1992. Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J. Neurosci.* 12, 854–863.
- Fanselow, M.S., 2000. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav. Brain Res.* 110, 73–81.
- 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.
- 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.
- Fonseca, R., Vabulas, R.M., Hartl, F.U., Bonhoeffer, T., Nägerl, U.V., 2006. A balance of protein synthesis and proteasome-dependent degradation determines the maintenance of LTP. *Neuron* 52, 239–245.
- Forcato, C., Burgos, V.L., Argibay, P.F., Molina, V.A., Pedreira, M.E., Maldonado, H., 2007. Reconsolidation of declarative memory in humans. *Learn Mem* 14, 295–303.
- Forcato, C., Rodríguez, M.L.C., Pedreira, M.E., 2011. Repeated labilization-reconsolidation processes strengthen declarative memory in humans. *PLoS*

- ONE 6, e23305.
- Franklin KBJ, Paxinos G, 2001. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic., London.
- 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, 143–6.
- Freudenthal, R., Romano, A., 2000. Participation of Rel/NF-kappaB transcription factors in long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res* 855, 274–81.
- Freudenthal, R., Boccia, M.M., Acosta, G.B., Blake, M.G., Merlo, E., Baratti, C.M., Romano, A., 2005. NF-kappaB transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice. *Eur J Neurosci* 21, 2845–52.
- Geller, A., Robustelli, F., Barondes, S.H., Cohen, H.D., Jarvik, M.E., 1969. Impaired performance by post-trial injections of cycloheximide in a passive avoidance task. *Psychopharmacologia* 14, 371–376.
- Gibbs, M.E., Ng, K.T., 1984. Dual action of cycloheximide on memory formation in day-old chicks. *Behav. Brain Res.* 12, 21–27.
- Glanzman, D.L., Kandel, E.R., Schacher, S., 1990. Target-dependent structural changes accompanying long-term synaptic facilitation in *Aplysia* neurons. *Science* 249, 799–802.
- Goelet, P., Castellucci, V.F., Schacher, S., Kandel, E.R., 1986. The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* 322, 419–22.
- Gordon, W.P., 1983. Memory disorders in aphasia--I. Auditory immediate recall. *Neuropsychologia* 21, 325–339.
- Gutiérrez, H., Gutiérrez, R., Silva-Gandarias, R., Estrada, J., Miranda, M.I., Bermúdez-Rattoni, F., 1999. Differential effects of 192IgG-saporin and NMDA-induced lesions into the basal forebrain on cholinergic activity and

- taste aversion memory formation. *Brain Res.* 834, 136–141.
- Gutierrez, H., Hale, V.A., Dolcet, X., Davies, A., 2005. NF-kappaB signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. *Development* 132, 1713–1726.
- Hall, G, 1994. Pavlovian Conditioning: Laws of Association., in: Mackintosh, N J (ed) *Animal Learning and Cognition*. Academic Press, New York, pp. 12–43.
- Havekes, R., Nijholt, I.M., Visser, A.K.D., Eisel, U.L.M., Van der Zee, E.A., 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.
- Hawkins, R.D., Carew, T.J., Kandel, E.R., 1986. Effects of interstimulus interval and contingency on classical conditioning of the *Aplysia* siphon withdrawal reflex. *J. Neurosci.* 6, 1695–1701.
- Hebb, D.O., 1949. *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. Wiley.
- Hegde, A.N., Goldberg, A.L., Schwartz, J.H., 1993. Regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinases are degraded after conjugation to ubiquitin: a molecular mechanism underlying long-term synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 7436–7440.
- Hepp, Y., Perez-Cuesta, L.M., Maldonado, H., Pedreira, M.E., 2009. Extinction memory in the crab *Chasmagnathus*: recovery protocols and effects of multi-trial extinction training. *Anim Cogn* 13, 391–403.
- Hepp, Y., Tano, M.C., Pedreira, M.E., Freudenthal, R.A.M., 2012. NMDA-like receptors in the nervous system of the crab *Neohelice granulata*: A neuroanatomical description. *J. Comp. Neurol.*
- Hermitte, G., Pedreira, M.E., Tomsic, D., Maldonado, H., 1999. Context shift and protein synthesis inhibition disrupt long-term habituation after spaced, but not massed, training in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem* 71,

34–49.

- Holland, P. C., 1983. Occasion setting in Pavlovian feature positive discriminations, in: M. L. Commons, R. J. Herrnstein, & A. R. Wagner (Eds.), *Quantitative Analyses of Behavior: Discrimination Processes*. Ballinger, New York, pp. 183–206.
- Hou, L., Antion, M.D., Hu, D., Spencer, C.M., Paylor, R., Klann, E., 2006. Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. *Neuron* 51, 441–454.
- Howell, David. C., 1987. *Statistical methods for psychology*, 2nd ed. ed. Duxbury Press, Boston.
- Inda, M.C., Muravieva, E.V., Alberini, C.M., 2011. Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *J. Neurosci.* 31, 1635–1643.
- Iribarne, O. Gutiérrez, J., 2004. Conditional responses of organisms to habitat structure: an example from intertidal musflats. *Oecologia* 139, 572–582.
- Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., De Souza, M.M., Izquierdo, L.A., Medina, J.H., 1998. Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393, 635–6.
- Jarome, T.J., Werner, C.T., Kwapis, J.L., Helmstetter, F.J., 2011. Activity dependent protein degradation is critical for the formation and stability of fear memory in the amygdala. *PLoS ONE* 6, e24349.
- Judge, M.E., Quartermain, D., 1982. Characteristics of retrograde amnesia following reactivation of memory in mice. *Physiol. Behav.* 28, 585–590.
- Kaltschmidt, B., Widera, D., Kaltschmidt, C., 2005. Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochim. Biophys. Acta* 1745, 287–299.
- Kandel, E.R., Squire, L.R., 2000. Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind. *Science* 290, 1113–1120.

- Kandel, E.R., 2001. The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Biosci. Rep.* 21, 565–611.
- Kano, T., Brockie, P.J., Sassa, T., Fujimoto, H., Kawahara, Y., Iino, Y., Mellem, J.E., Madsen, D.M., Hosono, R., Maricq, A.V., 2008. Memory in *Caenorhabditis elegans* is mediated by NMDA-type ionotropic glutamate receptors. *Curr. Biol.* 18, 1010–1015.
- Karpova, A., Mikhaylova, M., Thomas, U., Knöpfel, T., Behnisch, T., 2006. Involvement of protein synthesis and degradation in long-term potentiation of Schaffer collateral CA1 synapses. *J. Neurosci.* 26, 4949–4955.
- Kida, S., Josselyn, S.A., Pena de Ortiz, S., Kogan, J.H., Chevere, I., Masushige, S., Silva, A.J., 2002. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci* 5, 348–55.
- Konorski, J., 1948. *Conditioned reflexes and neuron organization*. University Press.
- Korner, M., Rattner, A., Mauxion, F., Sen, R., Citri, Y., 1989. A brain-specific transcription activator. *Neuron* 3, 563–572.
- Kucharczak, J., Simmons, M.J., Fan, Y., Gélinas, C., 2003. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 22, 8961–8982.
- 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.
- Lechner, H.A., Squire, L.R., Byrne, J.H., 1999. 100 years of consolidation--remembering Müller and Pilzecker. *Learn. Mem.* 6, 77–87.
- LeDoux, J.E., 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 155–184.
- Lee, J.L.C., Everitt, B.J., Thomas, K.L., 2004. Independent cellular processes for

- hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304, 839–843.
- Lee, J.L.C., Milton, A.L., Everitt, B.J., 2006. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *J. Neurosci.* 26, 10051–10056.
- Lee, J.L.C., 2008. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat. Neurosci.* 11, 1264–1266.
- Lee, J.L.C., 2009. Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends Neurosci* 32, 413–420.
- Lee, J.L.C., 2010. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Front Behav Neurosci* 4, 168.
- Lee, S.H., Choi, J.H., Lee, N., Lee, H.R., Kim, J.I., Yu, N.K., Choi, S.L., Kim, H., Kaang, B.K., 2008. Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science* 319, 1253–6.
- Lee, S.H., Kwak, C., Shim, J., Kim, J.-E., Choi, S.-L., Kim, H.F., Jang, D.-J., Lee, J.-A., Lee, K., Lee, C.-H., Lee, Y.-D., Miniaci, M.C., Bailey, C.H., Kandel, E.R., Kaang, B.-K., 2012. A cellular model of memory reconsolidation involves reactivation-induced destabilization and restabilization at the sensorimotor synapse in *Aplysia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 14200–14205.
- Lewis, D.J., Maher, B.A., 1965. Neural consolidation and electroconvulsive shock. *Psychol Rev* 72, 225–239.
- Lewis, D.J., 1969. Sources of experimental amnesia. *Psychol Rev* 76, 461–472.
- Lin, C.-H., Yeh, S.-H., Leu, T.-H., Chang, W.-C., Wang, S.-T., Gean, P.-W., 2003. Identification of calcineurin as a key signal in the extinction of fear memory. *J. Neurosci.* 23, 1574–1579.
- Lin, X.Y., Glanzman, D.L., 1994. Hebbian induction of long-term potentiation of *Aplysia* sensorimotor synapses: partial requirement for activation of an NMDA-related receptor. *Proc. Biol. Sci.* 255, 215–221.



- Lin, X.Y., Glanzman, D.L., 1997. Effect of interstimulus interval on pairing-induced LTP of *Aplysia* sensorimotor synapses in cell culture. *J. Neurophysiol.* 77, 667–674.
- Liu, L., Wolf, R., Ernst, R., Heisenberg, M., 1999. Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies. *Nature* 400, 753–756.
- Lopez-Salon, M., Alonso, M., Vianna, M.R., Viola, H., Mello e Souza, T., Izquierdo, I., Pasquini, J.M., Medina, J.H., 2001. The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. *Eur J Neurosci* 14, 1820–6.
- Lozada, M., Romano, A., Maldonado, H., 1990. Long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Physiol Behav* 47, 35–41.
- Lu, K.T., Walker, D.L., Davis, M., 2001. Mitogen-activated protein kinase cascade in the basolateral nucleus of amygdala is involved in extinction of fear-potentiated startle. *J. Neurosci.* 21, RC162.
- Lubin, F.D., Sweatt, J.D., 2007. The I $\kappa$ B kinase regulates chromatin structure during reconsolidation of conditioned fear memories. *Neuron* 55, 942–57.
- Luft, T., Pereira, G.S., Cammarota, M., Izquierdo, I., 2004. Different time course for the memory facilitating effect of bicuculline in hippocampus, entorhinal cortex, and posterior parietal cortex of rats. *Neurobiol Learn Mem* 82, 52–6.
- Mackintosh, N.J., 1975. A Theory of attention\_ Variations in the associability of stimulus with reinforcement. *Psychol. Rev.* 82, 276–298.
- Mactutus, C.F., Riccio, D.C., Ferek, J.M., 1979. Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. *Science* 204, 1319–20.

- Maldonado, H., 2008. La memoria animal. Eudeba, Buenos Aires.
- Maldonado, H., Romano, A., Tomic, D., 1997. Long-term habituation (LTH) in the crab *Chasmagnathus*: a model for behavioral and mechanistic studies of memory. *Braz J Med Biol Res* 30, 813–26.
- Mattson, M.P., Camandola, S., 2001. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J. Clin. Invest.* 107, 247–254.
- McClelland, J.L., 1985. Distributed models of cognitive processes. Applications to learning and memory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 444, 1–9.
- McGaugh, J.L., 1966. Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153, 1351–8.
- McGaugh, J.L., 2000. Memory--a century of consolidation. *Science* 287, 248–51.
- Meberg, P.J., Kinney, W.R., Valcourt, E.G., 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.
- Meffert, M.K., Baltimore, D., 2005. Physiological functions for brain NF-kappaB. *Trends Neurosci* 28, 37–43.
- Meffert, M.K., Chang, J.M., Wiltgen, B.J., Fanselow, M.S., Baltimore, D., 2003. NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat. Neurosci.* 6, 1072–1078.
- Merlo, E., Freudenthal, R., Romano, A., 2002. The IkappaB kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience* 112, 161–72.
- Merlo, E., Freudenthal, R., Maldonado, H., Romano, A., 2005. Activation of the transcription factor NF-kappaB by retrieval is required for long-term memory reconsolidation. *Learn Mem* 12, 23–9.
- Merlo, E., Romano, A., 2007. Long-term memory consolidation depends on proteasome activity in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience* 147, 46–52.

- Merlo, E., Romano, A., 2008. Memory extinction entails the inhibition of the transcription factor NF-kappaB. *PLoS ONE* 3, e3687.
- Miller, C.A., Sweatt, J.D., 2006. Amnesia or retrieval deficit? Implications of a molecular approach to the question of reconsolidation. *Learn. Mem.* 13, 498–505.
- Misanin, J.R., Miller, R.R., Lewis, D.J., 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 160, 554–5.
- Miserendino, M.J., Sananes, C.B., Melia, K.R., Davis, M., 1990. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature* 345, 716–718.
- Montarolo, P.G., Goelet, P., Castellucci, V.F., Morgan, J., Kandel, E.R., Schacher, S., 1986. A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* 234, 1249–54.
- Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., Baudry, M., 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774–776.
- Morris, R.G.M., Inglis, J., Ainge, J.A., Olverman, H.J., Tulloch, J., Dudai, Y., Kelly, P.A.T., 2006. Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron* 50, 479–489.
- Moser, M.B., Moser, E.I., 1998. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8, 608–619.
- Müller, G.E., Pilzecker, A., 1900. Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis. *Z. Psychol. Ergänzungsband* 1, 1–300.
- Müssig, L., Richlitzki, A., Rössler, R., Eisenhardt, D., Menzel, R., Leboulle, G., 2010. Acute disruption of the NMDA receptor subunit NR1 in the honeybee brain selectively impairs memory formation. *J. Neurosci.* 30, 7817–7825.

- Myers, K.M., Davis, M., 2002. Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* 36, 567–584.
- Nader, K., Schafe, G.E., Le Doux, J.E., 2000a. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406, 722–6.
- Nader, K., Schafe, G.E., LeDoux, J.E., 2000b. The labile nature of consolidation theory. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 216–219.
- O’Neill, L.A., Kaltschmidt, C., 1997. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* 20, 252–258.
- Pavlov, I.P., Anrep, G.V., 1927. *Conditioned Reflexes*. Courier Dover Publications.
- Pearce, J.M., Hall, G., 1980. A model for Pavlovian learning: variations in the effectiveness of conditioned but not of unconditioned stimuli. *Psychol Rev* 87, 532–52.
- Pedreira, M.E., Dimant, B., Tomsic, D., Quesada-Allue, L.A., Maldonado, H., 1995. Cycloheximide inhibits context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav* 52, 385–95.
- Pedreira, M.E., Dimant, B., Maldonado, H., 1996. Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav* 54, 611–7.
- Pedreira, M.E., Romano, A., Tomsic, D., Lozada, M., Maldonado, H., 1998. Massed and spaced training build up different components of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Animal Learning and Behavior* 26, 34–45.
- Pedreira, M.E., Perez-Cuesta, L.M., 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, 8305–11.

- Pedreira, M.E., Maldonado, H., 2003. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* 38, 863–9.
- Pedreira, M.E., Perez-Cuesta, L.M., Maldonado, H., 2004. Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction. *Learn Mem* 11, 579–85.
- Pereyra, P., Gonzalez Portino, E., Maldonado, H., 2000. Long-lasting and context-specific freezing preference is acquired after spaced repeated presentations of a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem* 74, 119–34.
- Perez-Cuesta, L.M., Hepp, Y., Pedreira, M.E., Maldonado, H., 2007. Memory is not extinguished along with CS presentation but within a few seconds after CS-offset. *Learn Mem* 14, 101–8.
- Pérez-Cuesta, L.M., Maldonado, H., 2009. Memory reconsolidation and extinction in the crab: mutual exclusion or coexistence? *Learn. Mem* 16, 714–721.
- Phillips, R.G., LeDoux, J.E., 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 106, 274–285.
- Przybylski, J., Sara, S.J., 1997. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* 84, 241–6.
- Przybylski, J., Roulet, P., Sara, S.J., 1999. Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J Neurosci* 19, 6623–8.
- Rescorla, R.A. & W., 1972. *Classical Conditioning II: Current Research and Theory.* eds Blak, A.H. & Prokasky, W.F. Appleton century Crofts, New York 64–99.
- Rescorla, R.A., Heth, C.D., 1975. Reinstatement of fear to an extinguished

- conditioned stimulus. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 1, 88–96.
- Rescorla, R.A., 1988. Pavlovian conditioning. It's not what you think it is. *Am Psychol* 43, 151–160.
- Rescorla, R.A., 2001. Experimental extinction., in: *Handbook of Contemporary Learning Theories*. Mahwah, NJ: Erlbaum. Mowrer RR, Klein S, pp. 119–154.
- Rickard, N.S., Poot, A.C., Gibbs, M.E., Ng, K.T., 1994. Both non-NMDA and NMDA glutamate receptors are necessary for memory consolidation in the day-old chick. *Behav. Neural Biol.* 62, 33–40.
- Roberts, A.C., Glanzman, D.L., 2003. Learning in *Aplysia*: looking at synaptic plasticity from both sides. *Trends Neurosci.* 26, 662–670.
- Rodriguez-Ortiz, C.J., De la Cruz, V., Gutiérrez, R., Bermudez-Rattoni, F., 2005. Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learn. Mem.* 12, 533–537.
- Roff, M., Thompson, J., Rodriguez, M.S., Jacque, J.M., Baleux, F., Arenzana-Seisdedos, F., Hay, R.T., 1996. Role of IkappaBalpha ubiquitination in signal-induced activation of NFkappaB in vivo. *J. Biol. Chem.* 271, 7844–7850.
- Romano, A., Lozada, M., Maldonado, H., 1990. Effect of naloxone pretreatment on habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Behav Neural Biol* 53, 113–22.
- Romano, A., Lozada, M., Maldonado, H., 1991. Nonhabituation processes affect stimulus specificity of response habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Behav Neurosci* 105, 542–52.
- Romano, A., Delorenzi, A., Pedreira, M.E., Tomic, D., Maldonado, H., 1996. Acute administration of a permeant analog of cAMP and a phosphodiesterase inhibitor improve long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Behav Brain Res* 75, 119–25.
- 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, 1507–16.
- Romano, A., Locatelli, F., Freudenthal, R., Merlo, E., Feld, M., Ariel, P., Lemos, D., Federman, N., Fustinana, M.S., 2006b. Lessons from a crab: molecular mechanisms in different memory phases of *Chasmagnathus*. *Biol Bull* 210, 280–8.
- Rosenegger, D., Lukowiak, K., 2010. The participation of NMDA receptors, PKC, and MAPK in the formation of memory following operant conditioning in *Lymnaea*. *Mol Brain* 3, 24.
- Rosenthal, R., Rosnow, R.L., 1985. *Contrast Analysis: Focused Comparisons in the Analysis of Variance*. Cambridge University Press.
- Sangha, S., Scheibenstock, A., Lukowiak, K., 2003. Reconsolidation of a long-term memory in *Lymnaea* requires new protein and RNA synthesis and the soma of right pedal dorsal 1. *J. Neurosci.* 23, 8034–8040.
- Santini, E., Muller, R.U., Quirk, G.J., 2001. Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *J. Neurosci.* 21, 9009–9017.
- Sara, S.J., 2000a. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* 7, 73–84.
- Sara, S.J., 2000b. Strengthening the shaky trace through retrieval. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 212–213.
- Sara, S.J., Hars, B., 2006. In memory of consolidation. *Learn. Mem.* 13, 515–521.
- Sekiguchi, T., Yamada, A., Suzuki, H., 1997. Reactivation-dependent changes in memory states in the terrestrial slug *Limax flavus*. *Learn Mem* 4, 356–64.
- Shen, W., Zhang, C., Zhang, G., 2002. Nuclear factor kappaB activation is mediated by NMDA and non-NMDA receptor and L-type voltage-gated Ca(2+) channel following severe global ischemia in rat hippocampus. *Brain*

- Res. 933, 23–30.
- Si, A., Helliwell, P., Maleszka, R., 2004. Effects of NMDA receptor antagonists on olfactory learning and memory in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 77, 191–197.
- Spivak, E.D., 1997. Cangrejos estuariales del Atlántico sudoccidental (25o-41oS) (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Investigaciones marinas* 25, 105–120.
- Squire, L.R., 1987. *Memory and brain*. New York: Oxford University Press.
- Squire, L.R., Alvarez, P., 1995. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 169–177.
- Squire, L.R., 2004. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82, 171–177.
- Strausfeld, N.J., Hansen, L., Li, Y., Gomez, R.S., Ito, K., 1998. Evolution, discovery, and interpretations of arthropod mushroom bodies. *Learn. Mem.* 5, 11–37.
- Suárez, L.D., Smal, L., Delorenzi, A., 2010. Updating contextual information during consolidation as result of a new memory trace. *Neurobiol Learn Mem* 93, 561–571.
- Suzuki, A., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., Masushige, S., Silva, A.J., Kida, S., 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24, 4787–95.
- Sweatt, J.D., 2009. *Mechanisms of Memory*. Academic Press.
- Sztarker, J., Tomsic, D., 2011. Brain modularity in arthropods: individual neurons that support “what” but not “where” memories. *J. Neurosci.* 31, 8175–8180.
- Tan, S., Kirk, R.C., Abraham, W.C., McNaughton, N., 1989. Effects of the NMDA antagonists CPP and MK-801 on delayed conditional discrimination. *Psychopharmacology (Berl.)* 98, 556–560.



- Tomsic, D., Maldonado, H., Rakitin, A., 1991. Morphine and GABA: effects on perception, escape response and long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res. Bull.* 26, 699–706.
- Tomsic, D., Massoni, V., Maldonado, H., 1993. Habituation to a danger stimulus in two semiterrestrial crabs: ontogenic, ecological and opioid modulation correlates. *J Comp Physiol A* 173, 621–633.
- Tomsic, D., Romano, A., Maldonado, H., 1998. Behavioral and mechanistic bases of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Adv Exp Med Biol* 446, 17–35.
- Troncoso, J., Maldonado, H., 2002. Two related forms of memory in the crab *Chasmagnathus* are differentially affected by NMDA receptor antagonists. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 251–265.
- Tronel, S., Milekic, M.H., Alberini, C.M., 2005. Linking new information to a reactivated memory requires consolidation and not reconsolidation mechanisms. *PLoS Biol.* 3, e293.
- Tronson, N.C., Corcoran, K.A., Jovasevic, V., Radulovic, J., 2012. Fear conditioning and extinction: emotional states encoded by distinct signaling pathways. *Trends Neurosci.* 35, 145–155.
- Unlap, T., Jope, R.S., 1995. Inhibition of NFkB DNA binding activity by glucocorticoids in rat brain. *Neurosci. Lett.* 198, 41–44.
- Upadhyya, S.C., Smith, T.K., Hegde, A.N., 2004. Ubiquitin-proteasome-mediated CREB repressor degradation during induction of long-term facilitation. *J Neurochem* 91, 210–9.
- Wagner, A. R., W., J. W., 1984. Memory and habituation, in: H. V S. Peeke & L. Petrinovich (Eds.), *Habituation. Sensitization and Behavior*. Academic Press., New York, pp. 103–153.
- Wahl, C., Liptay, S., Adler, G., Schmid, R.M., 1998. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J. Clin. Invest.* 101, 1163–1174.

- Walker, M.P., Brakefield, T., Hobson, J.A., Stickgold, R., 2003. Dissociable stages of human memory consolidation and reconsolidation. *Nature* 425, 616–620.
- Weber, C.K., Liptay, S., Wirth, T., Adler, G., Schmid, R.M., 2000. Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of I-kappaB kinases alpha and beta. *Gastroenterology* 119, 1209–1218.
- Wehner, J.M., Radcliffe, R.A., 2004. Cued and contextual fear conditioning in mice. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8, Unit 8.5C.
- Weldon, D.A., Fedorcik, G.G., LoRusso, C.M., Tiburzi, M.J., Lenoci, J.M., 1997. Olfactory conditioning impairment following posttraining NMDA receptor blockade in neonatal rats. *Neurobiol Learn Mem* 67, 34–42.
- Wiltgen, B.J., Sanders, M.J., Ferguson, C., Homanics, G.E., Fanselow, M.S., 2005. Trace fear conditioning is enhanced in mice lacking the delta subunit of the GABAA receptor. *Learn. Mem.* 12, 327–333.
- Wu, C.-L., Xia, S., Fu, T.-F., Wang, H., Chen, Y.-H., Leong, D., Chiang, A.-S., Tully, T., 2007. Specific requirement of NMDA receptors for long-term memory consolidation in *Drosophila* ellipsoid body. *Nat. Neurosci.* 10, 1578–1586.
- Xia, S., Miyashita, T., Fu, T.-F., Lin, W.-Y., Wu, C.-L., Pyzocha, L., Lin, I.-R., Saitoe, M., Tully, T., Chiang, A.-S., 2005. NMDA receptors mediate olfactory learning and memory in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 15, 603–615.
- Yeh, S.-H., Lin, C.-H., Lee, C.-F., Gean, P.-W., 2002. A requirement of nuclear factor-kappaB activation in fear-potentiated startle. *J. Biol. Chem.* 277, 46720–46729.
- Yi, J.J., Ehlers, M.D., 2007. Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function. *Pharmacol. Rev.* 59, 14–39.
- Yu, Z., Zhou, D., Bruce-Keller, A.J., Kindy, M.S., Mattson, M.P., 1999. Lack of the p50 subunit of nuclear factor-kappaB increases the vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic injury. *J. Neurosci.* 19, 8856–8865.

## Referencias

Zeil, J., Zanker, J.M., 1997. A glimpse into crabworld. *Vision Res.* 37, 3417–3426.