

Tesis Doctoral

# Dinámica, localización y activación de NF-kappa B durante la consolidación de la memoria en ratón

Salles, Angeles

2017-03-13

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:

Salles, Angeles. (2017-03-13). Dinámica, localización y activación de NF-kappa B durante la consolidación de la memoria en ratón. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Salles, Angeles. "Dinámica, localización y activación de NF-kappa B durante la consolidación de la memoria en ratón". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-03-13.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

# **Dinámica, localización y activación de NF-kappa B durante la consolidación de la memoria en ratón.**

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

Tesista: Lic. Angeles Salles

Director de tesis: Dr. Ramiro Freudenthal

Director asistente: Dr. Mariano Boccia

Consejero de Estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Laboratorio de Neurobiología de la Memoria, IFIBYNE-CONICET,  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Buenos Aires, 2017

# Agradecimientos

---

Al CONICET por otorgarme la beca que me permitió realizar mi doctorado.

A la UBA y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por una vez más proveerme de una educación de excelencia y un lugar para realizar mis estudios doctorales.

A Rami por aceptar dirigir mi doctorado allá en 2011 y por todo el trabajo, charlas y discusiones desde entonces. Por hacer de mi doctorado una gran y lindísima experiencia. Por siempre querer escuchar mi opinión y tratarme como par. Por formarme como científica y enseñarme muchísimo. Por fomentar que haga cursos, vaya a congresos y en general desarrolle mi carrera. Por acompañarme, entenderme y ayudarme a crecer a nivel personal. Por todo, gracias.

A Boccia, por ser mi director asistente, por todo el trabajo, los experimentos, las discusiones y los distintos aportes durante el doctorado. Por todas las correcciones y sugerencias durante la escritura. Por ofrecer otros puntos de vista y trabajar en equipo.

A Artur por co-dirigir mi beca de CONICET y por innumerables aportes al trabajo de esta tesis.

A Euge por el apoyo y el cariño; y por invitarme a colaborar y descubrir el mundo de los cangrejos.

A Mari, Nad, Martincito, Gise, Cande, Mechi, Marcos y Vero, mis amigos y compañeros de doctorado, sin quienes esta experiencia no hubiese sido lo mismo. Más que nada por la amistad y los momentos fuera del labo pero también por todos aquellos dentro del labo, las colaboraciones, ayudas y discusiones. En particular a Mari, sin quien muchos de los experimentos de esta tesis no hubiesen sido posibles.

A todo el LNM, una gran familia que está siempre presente a nivel personal y laboral. Donde fomentar la ciencia y un buen ambiente de trabajo es primordial; y donde siempre me sentí bienvenida, querida y contenida. En especial a los miembros del “arco de enfrente” con quienes compartí muchos mates y donde siempre encontré interlocutor para discutir ideas o papers.

A mi Comisión seguimiento por aportar ideas y ayudarme a organizar el trabajo.

A mi consejera de estudios, Lidia, quién realmente actúo como tal y me oriento mucho en el aspecto académico del doctorado y de mi carrera.

A Kevin quien me acompañó durante todo lo vivido estos últimos años, quien me apoyó durante de la escritura de esta tesis y quien continúa apoyándome en el desarrollo de mi carrera científica, siempre creyendo en mí y queriéndome incondicionalmente.

A Alejo, Mamá y Papá, por tanto tanto tanto... tanto que no me alcanzan las palabras. Los quiero muchísimo, gracias por ser mi ejemplo, gracias por todo.

# Publicaciones

---

Parte de los resultados de esta tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- **Angeles Salles**, Maria del Carmen Krawczyk, Mariano Blake, Arturo Romano, Mariano Boccia, Ramiro Freudenthal. REQUIREMENT OF NF-KAPPA B ACTIVATION IN DIFFERENT BRAIN AREAS DURING LONG-TERM MEMORY CONSOLIDATION IN TWO VERSIONS OF A CONTEXTUAL ONE TRIAL TASK. *under review.*
- **Angeles Salles**, Mariano Boccia, Mariano Blake, Nicoletta Corbi, Claudio Passananti, Carlos Maria Baratti, Arturo Romano, Ramiro Freudenthal. HIPPOCAMPAL DYNAMICS OF SYNAPTIC NF-kappa B DURING INHIBITORY AVOIDANCE LONG-TERM MEMORY CONSOLIDATION IN MICE. *Neuroscience*, Feb 2015.

# Índice

---

<b>Agradecimientos</b>	<b>1</b>
<b>Publicaciones</b>	<b>3</b>
<b>Resumen</b>	<b>7</b>
<b>Abstract</b>	<b>9</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>11</b>
<b>Introducción</b>	<b>14</b>
a. Memoria	14
b. Aprendizaje	17
c. Valencia de una memoria	20
d. Áreas del cerebro involucradas en procesos mnésicos	22
e. Bases moleculares de la memoria	26
f. El factor de transcripción NF-kappa B	30
g. NF-kappa B en el sistema nervioso	32
h. Rol de NF-kappa B en la memoria	35
i. NF-kappa B y proteínas sinápticas	40
<b>Hipótesis y Objetivos</b>	<b>45</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>46</b>
a. Animales	46
b. Aparatos y procedimientos para experimentos comportamentales	46
i. Aparato de evitación inhibitoria (Inhibitory Avoidance)	46
ii. Plancha caliente	47
iii. Tablero con agujeros (Hole Board)	48
iv. Acicalamiento	49
c. Cirugías para canulación	49
d. Drogas e inyecciones	52
i. Inyecciones	52
1. Intra-cerebrales	52
2. Intra-venosas	52
3. Intra-peritoneales	53
ii. Drogas	53
e. Extractos	54
i. Nucleares y Citoplasmáticos	54
ii. Sinaptosomales (CS, ET y mSDS)	54
f. Ensayos de Western Blot	56
g. Ensayos de determinación de actividad de NF-kappa B	57
h. Inmunofluorescencia	58

i. Secciones	58
ii. Sinaptosomales	59
i. Análisis de datos	60
j. Anticuerpos	62
<b>Resultados Capítulo I - NF-kappa B en memorias apetitivas y aversivas</b>	<b>63</b>
a. Tanto animales S como U muestran retención 48 horas después de un entrenamiento	65
b. Nf-kappa B se activa luego del entrenamiento tanto para animales S como para animales U pero no para animales Si	68
c. Inyecciones intra-hipocampales de Sulfasalazina son amnésicas para ambos grupos S y U	71
d. Inyecciones intra-amygdala de Sulfasalazina son amnésicas para ambos grupos S y U	74
e. Inyecciones intra-núcleo accumbens de Sulfasalazina son amnésicas para ambos grupos S y U	77
f. La Sulfasalazina solo impide la memoria cuando es inyectada en áreas involucradas en la retención del entrenamiento	80
<b>Discusión Capítulo I - NF-kappa B en memorias apetitivas y aversivas</b>	<b>83</b>
a. Tarea de aprendizaje contextual de un solo ensayo para el estudio del condicionamiento apetitivo y aversivo	83
b. NF-kappa B en el hipocampo durante la consolidación de tareas aversivas y apetitivas	86
c. Implicación de la vía de NF-kappa B en la amígdala y el núcleo accumbens durante la consolidación de tareas aversivas y apetitivas	88
<b>Resultados Capítulo II - NF-kappa B en la sinapsis</b>	<b>92</b>
a. NF-kappa B está presente en núcleo, citoplasma perinuclear, dendritas y sinaptosomas	93
b. NF-kappa B en la sinapsis está presente el sinaptoplasma y en la membrana	96
c. La activación de NF-kappa B sinaptosomal ocurre a un tiempo distinto que la activación nuclear	99
d. Los componentes de la vía de NF-kappa B translocan a membrana después de un entrenamiento de evitación inhibitoria	102
e. La relación en membrana de los componentes de NF-kappa B cambia luego de un entrenamiento	105
f. Un péptido que impide la interacción de PSD95 con NMDA impide la consolidación de la memoria	108
i. Estudio de toxicidad del péptido	110
ii. El péptido no es analgésico cuando se inyecta en hipocampo	111
iii. El péptido afecta la consolidación de la memoria	113
iv. El péptido no causa un daño permanente en el hipocampo	115
v. La canulación enmascara la activación nuclear y sináptica de NF-kappa B durante la consolidación	118

vi. El péptido no tiene efecto comportamental cuando es inyectado intra-peritonealmente	119
<b>Discusión Capítulo II - NF-kappa B en la sinapsis</b>	<b>121</b>
a. Localización de NF-kappa B	121
b. Dinámica de NF-kappa B en la sinapsis	122
c. La búsqueda de una herramienta para estudiar el rol sináptico de NF-kappa B	125
<b>Conclusiones Generales</b>	<b>129</b>
<b>Referencias</b>	<b>133</b>

# Resumen

---

## Dinámica, localización y activación de NF-kappa B durante la consolidación de la memoria en ratón.

NF-kappa B es un factor de transcripción cuya activación es necesaria para la consolidación de la memoria a largo plazo en varias especies. Este factor de transcripción se activa y se transloca al núcleo de las células en una ventana temporal específica durante la consolidación. NF-kappa B tiene una amplia distribución en el sistema nervioso, con una fuerte presencia en dendritas y terminales sinápticas. Esta tesis se centra en la activación, localización y dinámica de NF-kappa B en tareas de aprendizaje que se adquieren con un solo ensayo, la evitación inhibitoria (IA) y una tarea adquirida en el mismo contexto pero de signo opuesto.

Los ratones son entrenados de dos modos diferentes; ya sea recibiendo o no un estímulo eléctrico al entrar en un compartimiento oscuro (aversivo con choque eléctrico vs. apetitivo sin choque). Cuarenta y ocho horas después el desempeño de los animales es evaluado. Durante la sesión de evaluación, las latencias de entrada al compartimiento oscuro (independientemente del tipo de entrenamiento) fueron significativamente diferentes al día de entrenamiento y a las latencias de un grupo control que en el día del entrenamiento recibe un choque no relacionado con el contexto. Además, la actividad nuclear de NF-kappa B se vió aumentada durante la consolidación de ambas tareas comparando con animales control y *naïve*. La inhibición de NF-kappa B con sulfasalazina inyectada en el hipocampo, amígdala o el núcleo accumbens inmediatamente luego del entrenamiento produjo un deterioro en la retención de la memoria en ambas versiones de la tarea. Los resultados sugieren que en ratón, NF-kappa B es un paso molecular crítico en diferentes áreas del cerebro para la consolidación de la memoria de largo término en una tarea de evitación inhibitoria y en una versión “apetitiva” de la misma.

La activación de este factor de transcripción en el núcleo de las células del hipocampo ha sido descrita a exhaustivamente. La presencia del factor de transcripción en la sinapsis nos llevó a investigar un posible rol local en la sinapsis, activación y dinámica en este sitio. En este trabajo se describen los cambios en la localización sináptica de NF-kappa B y de su actividad, durante la consolidación de la memoria a largo plazo, tanto de la tarea

aversiva como apetitiva asociada al IA. La comparación de la actividad sinaptosomal y nuclear de NF-kappa B indican diferentes dinámicas para ambas localizaciones. Además, se identifican dos fracciones de NF-kappa B sinaptosomal, una que se obtiene soluble en el contenido sinaptosomal (fracción libre) y la otra se encuentra fuertemente unida a las membranas sinaptosomales. Durante las primeras etapas de la consolidación la fracción libre se activa, la fracción asociada a membrana aumenta mientras que la cantidad de la fracción libre disminuye. Estos resultados sugieren que la activación sináptica de NF-kappa B y su translocación a membranas son parte de la consolidación de la memoria a largo plazo en ratones.

Existen evidencias que demuestran que NF-kappa B se activa a través de la actividad del receptor de NMDA. Tomando en cuenta este dato se apuntó a disociar la señal eléctrica que llega al núcleo de la señal de transducción molecular local en la sinapsis para estudiar la función sináptica local del NF-kappa B. Para abordar este objetivo se trabajó con péptidos que impiden la interacción de PSD-95 (proteína de andamiaje postsináptico) con el receptor de NMDA. En este trabajo se muestra que la inyección intra-hipocampo de este péptido interfiere de forma reversible con la consolidación de la memoria de Evitación Inhibitoria (IA).

Los resultados presentados en esta tesis aportan datos cruciales para entender la función sináptica local del NF-kappa B durante la consolidación de la memoria, tanto para las tareas de aprendizaje aversivas como apetitivas.

**Palabras Clave:** NF-kappa B, memoria a largo término, consolidación, NMDA, PSD-95, hipocampo, núcleo accumbens, amígdala, evitación inhibitoria, aprendizaje del apetitivo, aprendizaje aversivo.

# Abstract

---

## Dynamics, localization and activation of NF-kappa B during long-term memory consolidation in mice.

NF-kappa B is a transcription factor whose activation has been shown to be necessary for long-term memory consolidation in several species. This transcription factor is activated and translocates to the nucleus of cells in a specific temporal window during consolidation. NF-kappa B has a wide distribution in the nervous system, with a well-reported presence in dendrites and synaptic terminals. This thesis focuses on the activation, localization and dynamics of NF-kappa B in a one trial learning task associated to the inhibitory avoidance (IA) setting.

Mice were trained either receiving or not a footshock when entering a dark compartment (aversive vs “appetitive” learning). Forty eight hours after training, latencies to step-through regardless of its training condition were significantly different from training day and from testing latencies of a control group that only receives a shock unrelated to context. Moreover, nuclear NF-kappa B DNA-binding activity was augmented in the aversive and the appetitive tasks when compared with control and naïve animals. NF-kappa B inhibition by Sulfasalazine injected either in the Hippocampus, Amygdala or Nucleus Accumbens immediately after training was able to impair retention in both training versions. The results suggest that NF-kappa B is a critical molecular step, in different brain areas on memory consolidation.

The activation of NF-kappa B in the nucleus has been thoroughly described of hippocampal cells but the presence of the transcription factor at the synapse led us to investigate a possible local role, activation and dynamics at this site. Here I report changes in synaptosomal NF-kappa B synaptic localization and activity, during long-term memory consolidation of both the aversive and appetitive learning tasks associated to the IA. Activity comparison of synaptosomal and nuclear NF-kappa B, indicate different dynamics for both localizations. In this work two pools of synaptosomal NF-kappa B are identified, one obtained with the synaptoplasm (free fraction) and the second bound to the synaptosomal membranes. During the early steps of consolidation the first pool is activated, as the membrane associated transcription factor fraction increases and concomitantly the free

fraction decreases. These results suggest that the activation of synaptic NF-kappa B and its translocation to membranes are part of the consolidation of long-term memory in mice.

It has been reported that NF-kappa B is activated through NMDA receptor activity. Taking this data into account, I aimed to dissociate the electrical signal that reaches the nucleus of the local molecular transduction signal at the synapse, to study the local synaptic function of NF-kappa B. To address this I worked with peptides that impede the interaction of PSD-95 (postsynaptic scaffold protein) with the NMDA receptor. This work shows that the intra-hippocampus injection of this peptide reversibly interferes with the consolidation of memory in the aversive version of task IA.

The results presented in this thesis lay valuable groundwork for future investigation of the local synaptic role of NF-kappa B during memory consolidation, both for aversive and appetitive learning tasks.

**Keywords:** NF-kappa B, Long-term memory, consolidation, NMDA, PSD-95, Hippocampus, Nucleus Accumbens, Amygdala, Inhibitory avoidance, appetitive learning, aversive learning.

# Abreviaturas

---

AChR - Receptor de acetil-colina

AIS - segmento inicial del axón

AMPA - Receptor de ácido \alpha - amino - 3 - hidroxil - 5 - metil - 4 - isoxazolpropiónico

AMY - amígdala

APP - proteína precursora amiloide

ARD1 - ADP Proteína del dominio del factor de ribosilación 1

BDNF - factor neurotrófico derivado del cerebro

c-fos - subunidad del factor de transcripción AP-1

C/EBP $\delta$  - proteína de unión a potenciador CCAAT delta

CA1 - cuerno de amon 1

CA3 - cuerno de amon 3

CaMKII $\delta$  - calcio / calmodulina proteína quinasa II delta

CPEB3 - Proteína citoplasmática de unión al elemento de poliadenilación

CS - contenido sinaptosomal

DOR - Densidad óptica relativa

EC - estímulo condicionado

EI - estímulo incondicionado

EMSA - Ensayo de movilidad electroforética

ET - extracto de tritón

GluA1 - subunidad del receptor AMPA

HIPPO - hipocampo

IA - evitación inhibitoria (inhibitory avoidance)

IGF2 - insulina-como el factor de crecimiento 2

IKK - quinasa de IkappaB

IL beta - interleuquina beta

LPS - lipo poli sacárido

LTD - depresión de largo término

LTP - potenciación de largo término

mRNA - ARN mensajero

mSDS - membranas SDS

N - grupo naïve

NAcc - Núcleo Accumbens

NCAM - molécula de adhesión celular neuronal

NF-kappa B - Factor nuclear kappa B

NLS - señal de localización nuclear

NMDAR - Receptor de N-metil-D-aspartato

nNOS - Óxido nítrico sintasa neuronal

NR1 - Subunidad del receptor de NMDA

NR2 - Subunidad del receptor de NMDA

PDZ1&2 - péptido que interfiere con los sitios PDZ1 y 2 de PSD95

PDZ3 - péptido que interfiere con el sitio PDZ 3 de PSD95

PKA - la subunidad catalítica  $\alpha$  de la proteína quinasa A dependiente de cAMP

PKC $\delta$  - la proteína quinasa C delta

PSD95 - proteína de densidad post sináptica 95

RC - respuesta condicionada

RHD - Dominio de homología Rel

S - grupo con choque

Sap97 - Disks large homolog 1 (DLG1)

Si - grupo con choque inmediato

SULFA - Sulfasalazina

TLRMyD88 - Receptor toll de respuesta primaria de diferenciación mioide 88

Tmem35 - Proteína transmembrana de función desconocida que se expresa abundantemente en el sistema límbico

TNFalpha - Factor de necrosis tumoral alfa

U - grupo sin choque

Veh -Vehículo

Zif268 - Factor de transcripción de dedos de zinc

# Introducción

---

## a. Memoria

Todos los animales pertenecemos a un mundo donde las presiones de selección deben ser afrontadas tomando decisiones que conducen a distintos comportamientos. Resulta imprescindible entonces adaptar los comportamientos teniendo en cuenta las experiencias vividas. El almacenamiento de información, ya sea a corto o largo plazo, es lo que da lugar a la toma de diversas decisiones y a los distintos comportamientos emergentes. Esta capacidad de almacenar información durante periodos que van desde minutos a una vida es una de las características más importantes del cerebro, permitiendo predecir los eventos en un entorno cambiante. Por este motivo, entre otros, la memoria es un área de estudio de gran importancia en la neurociencia. Identificar los procesos y mecanismos que subyacen al almacenamiento de información sobre el ambiente que nos rodea es crucial para lograr comprender en detalle el funcionamiento del cerebro.

Se ha definido 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). Esta definición pone énfasis en los procesos que subyacen a la formación y expresión de la memoria. Sin embargo, antes de poder examinar en detalle estos mecanismos es pertinente definir las distintas fases que comprenden a la memoria y los distintos tipos de memoria.

Las fases de la memoria son dinámicas y no están fijamente delimitadas. Sin embargo, se pueden definir la adquisición, consolidación, retención, recuperación y el olvido (Dudai, 2002a). La adquisición y la consolidación conforman la codificación de la memoria;

durante la adquisición se obtiene información del ambiente y/o las asociaciones pertinentes, mientras que durante la consolidación esta información se traduce en cambios neuronales (celulares y moleculares) que permiten el posterior almacenamiento o retención. La memoria puede cambiar entre estados no activos (almacenados) y activos (evocación de la memoria) (Lewis, 1979) donde la memoria puede ser expresada en un comportamiento. Más aún, durante la evocación de la memoria, podrían incluso readquirirse y reconsolidarse (Sara, 2000; Nader et al. 2000). A su vez, se pueden formar nuevas memorias que compiten con la memoria original al momento de la expresión. Estas memorias se denominan memorias de extinción y se definen como *“una disminución de la frecuencia o intensidad de un comportamiento condicionado después de la detención del refuerzo”* (Dudai, 2000a). Por ejemplo, se puede formar una memoria de extinción que pareciera “borrar” lo adquirido originalmente, sin embargo en virtud de la existencia de distintos protocolos conductuales (recuperación espontánea, reinstalación, etc.) que permiten la expresión de la memoria original se sugiere la existencia de dos trazas de memorias que competirían por el control de la conducta. La extinción difiere del olvido pues requiere de una fase de consolidación de la memoria para la nueva experiencia (Braud y Broussard 1973, Berman y Dudai 2001), y podría ella misma ser olvidada (Bouton 1994). El olvido se define como una *“inhabilidad para evocar una memoria”*, ya que no se puede asegurar que efectivamente la memoria se haya borrado completa e irreparablemente (Loftus and Loftus 1980).

Esta tesis se concentra en el estudio de la fase de consolidación de la memoria y los mecanismos moleculares que la constituyen. Como se mencionó anteriormente, la consolidación conforma parte de la codificación del engrama mnésico. En particular, durante la consolidación se estabiliza este engrama mediante cambios moleculares y celulares que ocurren en las neuronas reclutadas, dando lugar a memorias de largo término. En la práctica, se define al período de consolidación como la ventana de tiempo durante la cual la formación de la memoria de largo término es susceptible de ser interferida y/o modulada

con distintas herramientas farmacológicas y/o conductuales (Greksch y Matthies 1980; DeZazzo y Tully 1995). En particular esto refiere a procesos locales neuronales y se podría hablar entonces de una consolidación celular. Por otra parte se puede hablar de consolidación sistémica que implica el reclutamiento gradual de otras áreas cerebrales y la reorganización continua de los circuitos, tiempo después de la adquisición (Dudai, 2002). En algunos sistemas este tiempo puede ser de unas pocas horas (Shadmehr et al., 1996; Shadmehr y Holcomb, 1996), pero en otros sistemas puede tomar mucho más tiempo: varios días o semanas (Winocur, 1990). La consolidación sistémica se puede detectar observando la sensibilidad dependiente del tiempo de ciertos tipos de memoria a las determinadas lesiones cerebrales (Schmidtke y Vollmer, 1997; Reed y Squire, 1997; Teng y Squire, 1999). En este trabajo se utilizará el término consolidación refiriéndose siempre a la consolidación celular y se aclarará en los casos particulares que sea en referencia a la consolidación sistémica.

Cuando se habla de memoria, además de las fases, es también importante definir los tipos de memoria. Se puede de esta manera hablar de memoria de trabajo, memoria de corto término y memoria de largo término. La memoria de trabajo dura segundos y se refiere a una facultad cognitiva que es esencial para el comportamiento complejo (Miller et al., 1960). Por ejemplo, la memoria de trabajo permite leer palabras de un texto y combinarlas en un mensaje significativo. Por otro lado la memoria de corto término permite retener información por minutos a horas. Aunque esta memoria comparte varios mecanismos con la memoria de largo término una diferencia importante es que la memoria de corto término no se ve afectada por disruptores que afectan la memoria de largo término como, por ejemplo, los inhibidores de la síntesis proteica (Flexner et al., 1963; Agranoff y Klinger, 1964; Barondes y Cohen, 1966). La memoria de largo término puede durar horas, días, semanas y hasta una vida. Una característica fundamental de la memoria de largo término es como se mencionó anteriormente, la necesidad de la síntesis proteica para su consolidación.

La memoria de largo término se puede subdividir en dos clasificaciones de memoria distintas, estas son la memoria declarativa o explícita y la memoria no declarativa o implícita (Dudai, 2002a; Graf y Schacter 1985). La memoria declarativa es la retención consciente de hechos o eventos, mientras que la memoria no declarativa es aquella que se refiere a la retención de habilidades, reflejos condicionados y condicionamiento emocional. Una manera de definirlo sería distinguir entre el “saber porqué” (memoria declarativa) y el “saber como” (memoria no declarativa) (Ryle y Dennett, 2003). La evidencia de que el cerebro se rige por esta distinción fue dada por el estudio de la amnesia en humanos y monos que logró identificar y distinguir las áreas del cerebro utilizadas durante una u otra memoria (Cohen y Squire, 1980; Squire y Zola, 1996). Dentro de la memoria declarativa se puede categorizar aún más en memoria semántica (refiriéndose a la retención de palabras, ideas, conceptos y hechos) y memoria episódica (la cual se refiere a eventos en la vida del sujeto). La memoria episódica incluye información acerca de una experiencia limitada a un momento y un contexto en particular, mientras que la memoria semántica no está limitada en estas dimensiones y es independiente de la experiencia personal (Dudai, 2002a). A su vez, la memoria episódica es la que luego puede dar lugar a la memoria semántica ya que a partir de un episodio se puede generalizar un concepto, a medida que se disocia de el evento puntual donde se adquirió la información. En esta tesis se trabajó con el aparato de evitación inhibitoria y dos tareas que generan memorias de largo término del tipo no declarativa, ya que los animales son condicionados a una asociación entre un estímulo y un contexto que ocurren simultáneamente.

## **b. Aprendizaje**

En la sección anterior se desarrolló el concepto de memoria pero no se ahondó en cómo se adquieren las memorias. El medio por el cual se generan nuevas memorias y se

actualizan otras es el aprendizaje. Yadin Dudai define en 1989 al aprendizaje como *“Generación dependiente de la experiencia de representaciones internas duraderas, o modificaciones duraderas en tales representaciones”* (Dudai, 1989).

Se pueden definir tres tipos principales de aprendizaje: aprendizaje dado por la existencia de un estímulo (habitación y sensibilización), el aprendizaje que se da mediante la observación y/o el modelado de una situación (aprendizaje complejo o cognitivo), y el aprendizaje de la relación entre estímulos (aprendizaje asociativo) (Rescorla, 1972; Maldonado, 2008). Dentro del aprendizaje no asociativo, la habituación que se define como *“una reducción en la respuesta a un estímulo que se entrega repetidamente”*, y la sensibilización es *“una mejora o aumento de una respuesta producida por la presentación de un fuerte estímulo”* (Dudai, 2002). Por otro lado, el aprendizaje cognitivo es de alguna manera un aprendizaje asociativo pero tiene una complejidad mucho mayor ya que el sujeto aprende basándose en una regla o principio general (Maldonado, 2008). En este caso el animal puede extraer un concepto mediante la observación de otro individuo o la propia introspección (Dudai, 2002). El aprendizaje asociativo más simple incluye muchas de nuestras actividades diarias que implican la formación de asociaciones entre estímulos y/o respuestas. Éste se puede subdividir en condicionamiento clásico y condicionamiento instrumental u operante (Squire et al., 2008).

El condicionamiento clásico (o pavloviano) es inducido por un procedimiento en el que un estímulo generalmente neutro, denominado estímulo condicionado (EC), se acompaña de un estímulo que naturalmente provoca una respuesta, denominada estímulo incondicionado (EI). En el conocido caso del perro de Pavlov el animal es presentado con un estímulo incondicionado que es la comida, la presencia de ésta promueve naturalmente la salivación en el animal. La presentación de la comida es luego acompañada o brevemente precedida por el sonido de una campana, siendo este entonces el estímulo condicionado. Tras varias presentaciones de los estímulos EI y EC pareados se observa

que el animal comienza a salivar luego de la presentación del sonido de la campana en ausencia de la comida, denominándose ahora a ésta como la respuesta condicionada (RC) (Pavlov, 1928). El condicionamiento instrumental (u operante) ocurre cuando un animal asocia las consecuencias o estímulos con su propio comportamiento. En este tipo de aprendizaje la entrega de un estímulo ya sea aversivo ó apetitivo depende de la expresión de un comportamiento particular. El aprendizaje y la memoria se expresan entonces en la probabilidad de que el comportamiento ocurra o en la manera en que este comportamiento se ve afectado. Un ejemplo es el de una rata que recibe un pedacito de chocolate luego de apretar una palanca dentro de la caja experimental. Se observa que la rata explora la caja sin recibir ningún estímulo hasta que eventualmente en su exploración toca la palanca que produce la entrega de la recompensa. Durante sesiones posteriores se ve que si la rata logró establecer la asociación entre su comportamiento y la recompensa, la frecuencia de manipulación de la palanca habrá aumentado (Skinner, 1959).

Algunos tipos de aprendizaje, progresan gradualmente, a través de numerosas repeticiones, ésto se denomina "aprendizaje incremental" (Hebb, 1949). Por el contrario, otros tipos de aprendizaje, tanto en la vida real como en el laboratorio, ocurren abruptamente, siguiendo una función escalonada. En particular existen casos donde luego de varias repeticiones aparece un momento "*revelación*" a partir del cual el sujeto ejecuta la respuesta esperada repentinamente. Por otro lado, hay casos en los que el contenido emocional de los estímulos es tal que una sola repetición basta para generar la respuesta esperada (Dudai, 2008a).

Como se mencionó en la sección anterior, en este trabajo de tesis se estudian aprendizajes que generan memoria de largo término. En particular se trabaja con el aparato de evitación inhibitoria en ratón en dos versiones de aprendizaje de un solo ensayo, una apetitiva y otra aversiva. En ambos casos se trata de un aprendizaje asociativo entre un estímulo (ya sea el apetitivo o el aversivo) y el contexto. A su vez, en ambos casos se trata

de un aprendizaje con un componente operante ya que el animal debe realizar un comportamiento para “obtener” el estímulo. Este comportamiento es el que se ve afectado o cambiado durante la evaluación posterior, aunque en cada caso se ve afectado de distinta manera.

### c. Valencia de una memoria

La valencia de una memoria refiere al componente emocional y su significado biológico para el sujeto; y está estrechamente relacionada con la valencia de el ó los estímulos que se presentan durante la experiencia de aprendizaje. Un estímulo aversivo como puede ser un choque eléctrico puede generar una memoria asociativa de valencia negativa ya sea a un contexto o a otro estímulo *a priori* neutro. Así mismo, un estímulo apetitivo como puede ser una recompensa de comida, tiene la capacidad de generar una memoria asociativa de valencia positiva. En el primer caso, la memoria de valencia negativa podrá ser evidenciada durante la recuperación por ejemplo mediante una respuesta comportamental que indique un rechazo al estímulo condicionado o al contexto. También podría verse una inhibición de un comportamiento natural en presencia del estímulo condicionado o del contexto donde se experimentó la situación de valencia negativa. Por el otro lado, una memoria apetitiva se puede evidenciar durante la recuperación y expresión de la memoria por un acercamiento al estímulo condicionado o al contexto. A su vez, también se puede evidenciar por cambios comportamentales como un aumento en la frecuencia de un determinado comportamiento que previamente se asoció con la entrega de la recompensa (Tzschentke, 2007).

La valencia por si sola no determina cuán significativo es un estímulo para un sujeto. Este valor (conocido como “*arousal*”) está dado por el costo o la ganancia referido a la relevancia biológica que dicho estímulo tenga. Si una memoria se consolida como memoria

de largo término dependerá de ambos parámetros (Posner et al., 2005). Dos clases de memorias con valencias opuestas podrían ser el resultado de experiencias adversas dependiendo del momento en el que el sujeto recibe los estímulos. Por un lado, las memorias negativas son inducidas cuando los estímulos preceden a la experiencia adversa. Por otro lado, las memorias positivas son inducidas cuando los estímulos se experimentan luego de la experiencia adversa, al momento del alivio (Niewalda et al., 2015). Entrar en un compartimiento oscuro para un ratón luego de estar expuesto a una plataforma abierta, elevada e iluminada podría constituir una experiencia positiva y de alivio. Una experiencia apetitiva puede definirse como una que aumenta la probabilidad de satisfacer una necesidad particular del animal (como encontrar refugio) o como un estado de quiescencia cuyo requisito previo es la ausencia de un estímulo perturbador (Lorenz, 1978). En esta tesis se utilizará dicha definición para referirse a una experiencia apetitiva.

Las memorias aversivas y de alivio se pueden encontrar en especies filogenéticamente distantes como la mosca, las ratas, los ratones y los seres humanos (Vogt et al., 2015; Andreatta et al., 2012). Hasta hace poco, se creía que regiones cerebrales específicas, como la amígdala y el núcleo accumbens cumplían su función principalmente en la codificación de la valencia de un estímulo. Dentro de estas áreas pueden ser distintas poblaciones neuronales las encargadas de determinar el componente emocional de una memoria. Existe una heterogeneidad que permite a neuronas que codifican para un estímulo aversivo residir lado a lado con aquellas que responden a estímulos positivos (Namburi et al., 2015). Sin embargo, como se desarrollará en la siguiente sección, hoy se sabe que el rol de estas áreas en la memoria abarca más que la codificación de la valencia de un estímulo.

## d. Áreas del cerebro involucradas en procesos mnésicos

Desde la introducción de la frenología a mediados del siglo XVII existió la noción de que distintas áreas del cerebro tienen funciones determinadas (Sabbatini, 1997). Aunque se descartó ampliamente la teoría de la frenología (que estipulaba que la forma del cráneo podía predecir la aptitud de los sujetos en distintas categorías) se sabe hoy en día que existe una distribución de funciones en el cerebro regida por ciertos parámetros anatómicos, morfológicos y celulares. Se han trazado mapas anatómicos que permiten la identificación de áreas involucradas en distintas tareas. Por ejemplo se conoce en bastante detalle el mapa de la corteza somatosensorial que nos permite identificar específicamente donde se encuentra la población de neuronas que responderá a un estímulo táctil en un determinado sector del cuerpo. En el caso de la memoria se torna más difícil delimitar exactamente qué áreas están involucradas y de qué manera.

Cuando hablamos de áreas involucradas en la consolidación de la memoria es crucial hablar del hipocampo, la amígdala y núcleo accumbens. Todas estas estructuras desempeñan un papel en la consolidación de la memoria de manera integrada (Hyman et al., 1990; Ferreira et al., 1992b; Izquierdo et al., 1993b; Willner et al., 1993).

Es ampliamente aceptado que el hipocampo procesa datos espaciales, contextuales y otros datos cognitivos (Izquierdo et al., 1993b; Bechara et al., 1995; Eichenbaum, 1996). Muchos estudios destacan a la amígdala como un centro de procesamiento principalmente de información emocional o aversiva (Bechara et al., 1995, Cahill et al., 1995), sin embargo evidencias recientes apuntan a un rol de la amígdala también en memorias apetitivas (Fernando et al., 2013) y en la codificación del intervalo entre el EC y el EI (Diaz-Mataix et al., 2014). La corteza entorrinal está involucrada en el procesamiento de diversos tipos de memoria (Thompson, 1976; Ferreira et al., 1992a, b; Squire, 1992; Wiig y Bilkey, 1994; Suzuki, 1996) y se estipula que la misma integra la información procesada por

la amígdala y el hipocampo durante y después del entrenamiento (Ferreira et al., 1992a, Willner et al., 1993). Todas estas áreas han sido implicadas tanto en la consolidación como en la recuperación de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria en ratas (Izquierdo et al., 1996).

En lo referido particularmente al hipocampo hay una cantidad de evidencia que han proporcionado pruebas convincentes de la participación de esta estructura en la consolidación de la memoria. Los primeros estudios que probaron definitivamente que el hipocampo y las estructuras vecinas del lóbulo temporal medial son esenciales para la memoria fueron aquellos sobre el paciente H.M. (Scoville, 1996). El caso del paciente H.M. es ampliamente conocido en el estudio de la memoria y resulta imposible referirse a las funciones del hipocampo sin mencionarlo. Este paciente sufría de epilepsia y en pos de intentar tratar esta aflicción se le extirpó quirúrgicamente gran parte del lóbulo temporal medial incluyendo dos tercios de su hipocampo, corteza parahipocampal, corteza entorrinal, corteza piriforme y amígdala, tras la cual sufrió de amnesia anterógrada severa. Específicamente, estudios posteriores determinaron que el hipocampo es esencial para la rápida formación de nuevas memorias y para el proceso de consolidación de la memoria (Corkin, 1984; Squire y Alvarez, 1995; Milner et al., 1998). A partir de estos estudios se han desarrollado centenares de líneas de investigación para descifrar el rol del hipocampo y uno de los hallazgos más sorprendentes fue el de las llamadas "*place cells*" ó "células de lugar" (O'Keefe y Dostrovsky, 1971). Estas células del hipocampo, en roedores se activan cuando los animales ocupan ubicaciones específicas en un entorno. Además, han sido asociadas con la formación y recuperación de memorias; codifican objetos y eventos en contextos específicos (Eichenbaum et al., 2007). Recientemente, se descubrieron en el hipocampo las "células de tiempo" que trazan la organización temporal de la información disparando en momentos secuenciales para episodios ordenados temporalmente (Pastalkova et al., 2008; Macdonald et al. 2011; Naya y Suzuki 2011). Howard Eichenbaum propone que estas

“células del tiempo” pueden ser parte de un mecanismo subyacente del hipocampo para el orden de los acontecimientos en las experiencias cotidianas que dan lugar a la formación de memorias (Eichenbaum, 2011). Esta organización espacial y temporal no sólo proporciona un esquema de codificación para apoyar la adquisición rápida de memorias de eventos individuales, sino que también permite explicar la posibilidad de la repetición mental de secuencias espacio-temporales en momentos posteriores (Preston y Eichenbaum 2013). Todos estos descubrimientos y muchos más consolidan al hipocampo como una estructura crucial en la formación de memorias y destacan su importancia en la codificación y almacenamiento de la información contextual (Morris y Frey 2007; Myers y Gluck, 1994).

La importancia que se le ha dado al hipocampo en la consolidación de la memoria y la cantidad de estudios sobre esta estructura pueden de algún modo eclipsar a otras estructuras con una participación de igual relevancia en estos procesos. Una de estas estructuras que ya se mencionó anteriormente es la amígdala. Esta estructura se ha caracterizado principalmente en memorias con un componente emocional negativo; de allí es que surge el concepto ya hoy en día antiguo, de que la amígdala procesa solamente memorias de miedo. Con lesiones pre- y post-entrenamiento se ha determinado la necesidad de la amígdala en la formación de estas memorias de miedo (LeDoux, 2000; Maren, 2001). A su vez, su inactivación reversible mediante inyección local de muscimol (un agonista de los receptores GABAA) previa a la adquisición ha aportado aún más evidencia en esta dirección (Muller et al. 1997). Sin embargo, otros estudios apoyan la noción de que la amígdala tiene un rol más amplio en la memoria. En particular se encontró que la amígdala está involucrada en el procesamiento y almacenamiento del intervalo entre EC y EI (Diaz-Mataix et al., 2014). Por otra parte, más recientemente se comenzó a estudiar el rol de la amígdala en la consolidación y reconsolidación de memorias de valencia positiva (Feltenstein y See, 2007; Fernando et al., 2013; Heldt et al., 2014; Merlo et al., 2015). Todos estudios moleculares y comportamentales plantean a la amígdala como un área de gran

importancia en la memoria más allá del procesamiento de la información emocional negativa de un estímulo. Los mecanismos moleculares que subyacen a estas funciones en la amígdala se introducirán en mayor detalle en la sección siguiente.

Otro área que ha recibido poca atención en el estudio de la memoria en comparación con el hipocampo es el núcleo accumbens. Tradicionalmente el núcleo accumbens se ha estudiado como un centro de procesamiento de actividad locomotora, recompensa, adicción y motivación (White, 1989; Robbins y Everitt, 1996). En particular se ha estudiado el rol de esta estructura en el condicionamiento de alivio (Gerber et al., 2014), ya que el estímulo se presenta en el momento del alivio del evento aversivo. A diferencia de un estímulo aversivo, un estímulo de alivio induce comportamiento de aproximación (Yarali et al., 2008) o una atenuación de la respuesta de sobresalto (Andreatta et al., 2010), indicando que debe compartir características básicas con condicionamiento de recompensa. Existe, sin embargo, un creciente cuerpo de literatura que sugiere que esta estructura está involucrada en el aprendizaje y la memoria de una manera dissociable de su rol en otros aspectos de la conducta (Setlow, 1997). Lesiones en el núcleo accumbens previas al entrenamiento impiden el aprendizaje en el laberinto de agua de Morris, una tarea declarativa donde las ratas deben encontrar una plataforma sumergida (Morris et al., 1982). Así mismo, infusiones intra-núcleo accumbens del agonista dopaminérgico haloperidol tienen un efecto similar (Ploeger et al., 1994). Varios estudios han encontrado que este área está involucrada en el aprendizaje y en la consolidación, pero no en la recuperación, lo que sugiere que éste no es un sitio de almacenamiento permanente de la memoria (Setlow, 1997). Las mismas lesiones e infusiones de haloperidol que perjudican el aprendizaje cuando se realizan antes del entrenamiento tienen poco o ningún efecto cuando se realizan en ratas que están entrenadas en la tarea antes de la manipulación (Sutherland y Rodríguez, 1989). Por otro lado, el estudio del núcleo accumbens en memorias aversivas ha dado lugar a evidencias de su rol en memorias de aversión gustativa (Fenu et al., 2003),

memorias de miedo (Levita et al., 2002), y aún más interesante para este trabajo, en memorias de evitación inhibitoria (Manago et al., 2008).

En este trabajo de tesis se explora la participación del hipocampo, la amígdala y el núcleo accumbens en la consolidación de memorias apetitivas y aversivas en un mismo paradigma contextual basado en el aparato de evitación inhibitoria en ratón.

## e. Bases moleculares de la memoria

Se ha avanzado mucho en el estudio de las bases moleculares de la memoria desde que en 1972 Edward Kosower publicó una primera revisión con la teoría de las bases moleculares de la memoria. En ese momento la teoría se basaba principalmente que las memorias se guardaban en las sinapsis y dependían mayoritariamente de la dinámica del receptor de acetilcolina (Kosower, 1972). Hoy en día se sabe que hay muchas moléculas que forman parte de los distintos procesos mnésicos. Además se discute exactamente en qué localización subcelular se almacenan las memorias, con fuerte evidencia que apunta a un rol del núcleo de igual importancia que el de las sinapsis (Chen et al., 2014).

La comprensión de los mecanismos que subyacen a la consolidación celular, o simplemente consolidación, ha sufrido grandes avances en los últimos años gracias al progreso en las técnicas de neurobiología molecular y celular. Ahora se sabe que en la consolidación celular, las modificaciones postraduccionales, inducidas por la activación de vías de transducción de señales intracelulares, culminan en la modulación de la expresión génica neuronal y en la síntesis de nuevas proteínas (Davis y Squire, 1984; Goelet et al., 1986; Dudai, 2002a). Estos procesos implican mecanismos sinápticos locales, mecanismos que comprenden a toda la célula y un intercambio de información cruzada entre la sinapsis y el núcleo (Frey y Morris, 1997; Dudai y Morris, 2000). Se cree que las las proteínas que se sintetizan *de novo* incorporan e introducen modificaciones a largo plazo en las propiedades

funcionales de la sinapsis lo cual probablemente implique plasticidad morfológica (Bailey y Kandel, 1993).

La primera evidencia de la síntesis de proteínas durante la consolidación proviene del uso de antibióticos como la puromicina y la cicloheximida (Flexner et al., 1963; Agranoff y Klinger, 1964; Barondes y Cohen, 1966). Estos inhibidores de la traducción indujeron un impedimento en la memoria cuando se administraron justo antes o después de la adquisición. Éste efecto se limitó a las memorias de largo plazo, es decir no se observó deterioro del aprendizaje cuando se evaluó la memoria a corto término luego de la infusión de estos inhibidores. El hallazgo de la necesidad de la traducción para la consolidación de la memoria de largo término se vió acompañado por el descubrimiento de la necesidad de la transcripción para este mismo proceso mnésico (Agranoff & Klinger, 1964; Barondes et al., 1964, Barondes & Cohen, 1966, revisado en Alberini & Kandel, 2014). El papel de la síntesis de ARNm en la formación de memoria se evidenció inicialmente por el uso del inhibidor transcripcional actinomicina D (Barondes y Jarvik, 1964). Al igual que los otros inhibidores de la síntesis proteica, la actinomicina D impidió la consolidación de la memoria de largo término sólo cuando se administró alrededor de la sesión de entrenamiento. A partir de estos resultados se continuó con el estudio de los procesos río arriba de la transcripción para continuar dilucidando los mecanismos moleculares involucrados en la memoria. Así fue como, muchos años más tarde, se describió la implicación de varios factores de transcripción en distintos niveles del procesamiento mnésico. Los primeros factores de transcripción identificados de este modo fueron CREB (Dash et al., 1990) y c-Fos (Anokhin y Rose, 1991). Los estudios siguientes sobre CREB en *Aplysia*, *Drosophila* y roedores apoyaron la participación de este factor de transcripción en un mecanismo molecular evolutivamente conservado implicado en la plasticidad neuronal asociado a la formación de la memoria (Bourtchouladze et al., 1993; Yin et al., 1994). En los años siguientes a estos estudios se identificaron tres factores de transcripción más involucrados

en la memoria. Estos nuevos jugadores en el procesamiento de la memoria a nivel molecular son C/EBP (Alberini et al., 1994), Zif268 (Okuno y Miyashita, 1996, Jones et al., 2001) y NF-kappa B (Freudenthal et al., 1998, Freudenthal y Romano, 2000). Hoy en día abunda la evidencia que apoya la función esencial de estos 5 factores de transcripción en procesos de la memoria (Alberini, 2009).

Aunque el rol de los factores de transcripción es uno de los mecanismos moleculares que están involucrados en los procesos de memoria más estudiados cabe destacar la gran cantidad de interacciones moleculares que ocurren más allá de la síntesis proteica que son sumamente importantes para la consolidación, reconsolidación y persistencia de la memoria de largo término. Entre ellos se destacan las modificaciones post-traduccionales como la acetilación (Sharma, 2010) o la fosforilación (Sunyer et al., 2008), la función del proteasoma (Firovante y Bryne, 2011) y mecanismos epigenéticos de rearreglo de la cromatina (Federman et al. 2014; Jarome et al. 2014). A su vez, no menos importante, podemos mencionar a la polimerización y despolimerización de actina que permite los rearreglos del citoesqueleto (Rudy, 2015); y dinámica de los receptores y otras proteínas de la densidad post sináptica (Specht y Triller, 2008) que conjuntamente dan lugar al desarmado o creación de espinas dendríticas (Kasai, 2010; Hanley, 2014). De allí se desencadenan un sin fin de interacciones moleculares y cascadas de señalización entrelazadas que dan lugar a la formación de las memorias y sobre las cuales se continúa la investigación.

Al examinar en detalle todos estos mecanismos y vías moleculares se encontraron determinadas particularidades asociadas a cada tipo de aprendizaje o memoria. Esto permite evaluar desde los mecanismos más ampliamente involucrados en la memoria en general hasta los mecanismos particulares que subyacen a cada tipo de memoria. Un ejemplo de esto es el de los receptores de glutamato tipo NMDA; los fármacos que bloquean estos receptores impiden ciertos tipos de aprendizaje, incluyendo tareas que

dependen de la función del hipocampo (Morris et al., 1986). Sin embargo, algunas versiones de estas tareas no se ven afectadas (Bannerman et al., 1995).

Se ha encontrado que los mecanismos moleculares generales necesarios para la formación de la memoria tienen lugar en varias áreas del cerebro de los mamíferos. El hipocampo en particular ha sido un área extensamente estudiada y donde se realizaron varios de los primeros estudios moleculares mencionados anteriormente (Squire et al., 2015; Calabresi et al. 2016). Sin embargo, como se mencionó en la sección anterior, el hipocampo no es la única área involucrada en el procesamiento de información que dará lugar a memorias de largo término. Se han identificado factores moleculares clave que contribuyen a la plasticidad neural en la amígdala involucradas en la consolidación de la memoria (Stork y Pape, 2002). En lo que se refiere a mecanismos moleculares generales en la amígdala involucrados en procesos mnésicos, estudios recientes han abierto interesantes perspectivas en la investigación sobre la memoria del miedo. La reconsolidación de las memorias del miedo requiere síntesis de proteínas en la amígdala (Nader et al., 2000), induce la activación de CREB y c-fos (Hall et al., 2001) y se bloquea mediante la inhibición de la función CREB después de la recuperación (Kida et al., 2002). Más recientemente, se ha demostrado que las modificaciones epigenéticas en la amígdala también son necesarias para la consolidación y la reconsolidación de la memoria (Maddox et al., 2013). En lo referido al papel de los receptores glutamatérgicos (AMPA y NMDAR) en la amígdala se vió que tienen distinta participación en la recuperación y la reconsolidación de la memoria (García-Delatorre et al., 2014). Por otra parte, también se han estudiado mecanismos moleculares involucrados en la memoria que resultan específicos para la amígdala. Un ejemplo es el rol de los receptores dopaminérgicos D1 en dicha área en la desestabilización de memorias apetitivas durante la reconsolidación (Merlo et al. 2015).

En el núcleo accumbens, otro área importante en los procesos mnésicos, las inyecciones de la anisomicina inmediatamente después del condicionamiento de alivio

bloquean la consolidación de la memoria de largo término (Bruning et al., 2016). En éste área, el bloqueo de los receptores de glutamato tipo NMDA inhibe la adquisición tanto del condicionamiento de alivio como del condicionamiento apetitivo (Di Ciano et al., 2001; Mohammadi y Fendt, 2015). Más estudios son necesarios para identificar mecanismos moleculares particulares de este área involucrados en los procesos de memoria. En el presente trabajo se profundiza en el rol de la vía de NF-kappa B en estas tres áreas del cerebro de ratón (hipocampo, amígdala y núcleo accumbens) con el objetivo de explorar uno de los mecanismos generales involucrados en la consolidación de la memoria en áreas donde su participación no se ha descrito aún.

## f. El factor de transcripción NF-kappa B

El factor de transcripción NF-kappa B no es una proteína única, sino un pequeño grupo de proteínas íntimamente relacionadas que se unen a un dominio común en el ADN conocido como el sitio  $\kappa$ B (Senftelben y Karin, 2002). La familia del factor de transcripción NF-kappa B es un dímero que puede estar compuesto en vertebrados por siete proteínas: Rel A/p65, c-Rel, RelB, p100, p52, p105 y p50 (Baldwin, 1996; Ghosh et al. , 1998) y en invertebrados por tres: Dorsal, Dif y Relish (Hetru y Hoffmann, 2009). Dentro de la familia se distinguen dos clases de proteínas debido a su modo de síntesis y transactivación. Las proteínas denominadas Rel (RelA/p65, RelB, cRel) que se sintetizan directamente en su forma madura y contienen el dominio RHD en el extremo carboxi-terminal que les permite la dimerización, unión al ADN y modulación de la transcripción. Por otro lado están los productos de los genes NF-kappa B1 y NF-kappa B2 (p105 y p100), que precisan ser posteriormente procesados para dar las proteínas p50 y p52, respectivamente (Senftelben y Karin, 2002). Estas subunidades tienen el dominio RHD en el extremo amino-terminal pero no poseen el dominio de modulación de la transcripción (Karin, 2006). El dímero prototípico está formado por dos subunidades; p65 y p50 (May y Ghosh 1997) y su actividad es

regulada principalmente a través de modificaciones post-traduccionales. En los vertebrados, NF-kappa B se encuentra principalmente en el citoplasma unido a una proteína reguladora que inhibe NF-kappa B denominada IκB (sus distintas versiones siendo IκBα, IκBβ, IκBε y Bcl-3) (Whiteside y Israël, 1997), y en invertebrados, la proteína Cactus (Belvin y Anderson, 1996). Frente a un estímulo, IκB es fosforilado por la quinasa de IκB (IKK, compuesta por IKK α, β y γ, también llamada IKK1, IKK2 y NEMO, respectivamente), para luego ser ubiquitinada y degradada por el proteasoma 26S dejando libre el dímero restante (Kanarek et al., 2009). Esto expone la señal de localización nuclear (NLS) y el sitio de unión al ADN del factor de transcripción. Cuando esto sucede se considera generalmente a NF-kappa B activo, porque es capaz de unirse al ADN y promover la transcripción (Baeuerle y Baltimore, 1988). Las evidencias recientes indican que la regulación de la vía es aún más compleja, por ejemplo p65 y p50 son objeto de diversas modificaciones postraduccionales tales como ubiquitinación, acetilación, metilación, fosforilación, oxidación/reducción y isomerización de prolina (Toledano et al. 1993, Schmitz et al., 2004, Huang et al., 2010).

La familia NF-kappa B fue originalmente identificada como un proto-oncogen ya que uno de sus miembros (Rel-v) es una oncoproteína del retrovirus REL (Karin et al., 2002). Por este motivo, su rol en varios tipos de cáncer y en la inflamación ha sido ampliamente estudiado (Xia et al., 2014; Hoesel y Schmid, 2013). En este escenario, NF-kappa B generalmente responde a señales inflamatorias de las citoquinas, TNFα, IL-β1, LPS y luz UV entre otras, mediadas en su mayoría por el receptor tipo "toll" (TLR)-MyD88 (Karin, 2006).

Como se introdujo anteriormente, la consolidación de la memoria de largo término es dependiente de la síntesis de novo de proteínas regulada por los factores de transcripción (Alberini y Kandel 2015). Entre los factores de transcripción implicados en la regulación de la expresión génica durante la consolidación, se ha encontrado que NF-kappa B es activado y necesario durante la consolidación de recuerdos apetitivos y aversivos en varios

paradigmas (Meffert et al., 2003, de la Fuente et al 2015). El rol de NF-kappa B en la memoria se desarrollará en profundidad en secciones posteriores pero un punto a destacar es que en nuestro laboratorio se ha trabajado sobre el rol de este factor de transcripción en memoria por muchos años. En particular se ha descrito la activación nuclear de NF-kappa B durante la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria en el hipocampo de ratón y a su vez se probó que esta activación es específica para la asociación entre el choque y el contexto (Freudenthal et al., 2005; Boccia et al., 2007). La inhibición de la activación del NF-kappa B en el hipocampo mediante la infusión de un oligonucleótido con la secuencia de consenso de kb o mediante el uso de la droga Sulfasalazina, induce amnesia sólo cuando se administra durante la ventana de consolidación (Merlo et al., 2005; Freudenthal et al., 2005). La sulfasalazina impide específicamente la activación de NF-kappa B, inhibiendo la actividad de la quinasa IKK, bloqueando su sitio de unión a ATP y no permitiendo que ésta fosforile a IκB a su vez, impidiendo que NF-kappa B se transloque al núcleo (Wahl et al., 1998). El efecto de la sulfasalazina sobre NF-kappa B no está mediado por su efecto sobre la ciclooxigenasa (Merlo et al., 2002). Esta droga se utiliza en el presente trabajo para evaluar el efecto de la inhibición de la vía de NF-kappa B en las tres áreas del cerebro indicadas previamente.

## g. NF-kappa B en el sistema nervioso

En el sistema nervioso, NF-kappa B se expresa tanto en neuronas como en células no neuronales como la glía y las subunidades más comúnmente expresadas en neuronas son heterodímeros p50-p65 y homodímeros p50 (De la Fuente et al., 2015). En mamíferos, el factor de transcripción se expresa extensamente en el cerebro y tiene una fuerte presencia en áreas relacionadas con la memoria, incluyendo el hipocampo (Kaltschmidt y Kaltschmidt, 2001).

En las neuronas, el factor de transcripción está en equilibrio entre su forma inactiva ligado al inhibidor (I $\kappa$ B), y el dímero libre que es capaz de trasladarse al núcleo y unirse al ADN para facilitar la transcripción de determinados genes. El dímero se activa a través de la transmisión sináptica excitatoria glutamatérgica (NMDAR) por señales implicadas en la plasticidad neural como la despolarización y el incremento transitorio de Ca<sup>2+</sup> intracelular a través de la señalización dependiente de Ca<sup>2+</sup> y la activación de CaMKII (Meffert et al., 2003). NF-kappa B también se activa en respuesta a la dopamina y por neuropéptidos tales como angiotensina II (Frenkel et al., 2002) y por NCAM (Krushel et al., 1999). Una vez activado, el factor facilita la transcripción génica. Se han encontrado una serie de genes objetivo del factor de transcripción NF-kappa B en las neuronas, y muchos de ellos están relacionados con la plasticidad neuronal y la memoria. Estos incluyen los genes que codifican para las siguientes proteínas: CaMKII $\delta$  (Federman et al., 2013), IGF2 (Schmeisser et al., 2012; Zhou et al., 2003), C/EBP $\delta$  (Liu et al., 2007), BDNF (Saha et al., 2006), PKA (Kaltschmidt et al., 2006), PKC $\delta$  (Suh et al., 2003), y APP (Song y Lahiri, 1998).

NF-kappa B en la sinapsis se describió por primera vez por el grupo Kaltschmidt en 1993 en el sistema nervioso de ratas y se ha encontrado en sitios pre y postsinápticos (Kaltschmidt et al., 1993, Meberg et al., 1996, Freudenthal y Romano, 2000, Suzuki et al., 1998; Meffert et al., 2003). Específicamente, p50 y su precursor p105 mostraron tinción en las sinapsis de retina, corteza y estriado, y la forma inducible de NF-kappa B fue detectable por EMSA en los sinaptosomas de corteza. A su vez, cultivos de cerebelo mostraron una inmunotinción fuerte para p65 en los contactos sinápticos (Guerrini et al., 1995). Otro componente de la vía de NF-kappa B, I $\kappa$ B, se detectó primero en fibras neuronales de rata (Joseph et al., 1996). No mucho después, este hallazgo fue corroborado en las sinapsis hipocámpales y corticales de la rata y se observó la presencia de I $\kappa$ B $\alpha$  y p50 en la densidad post-sináptica mediante microscopía electrónica y EMSA (Suzuki et al., 1997). También se encontró I $\kappa$ B $\beta$ , en sinaptosomas de ratón (Meffert et al., 2003).

El factor de transcripción se encontró en la post-sinapsis de las uniones neuromusculares de humanas (p65)(Yang et al., 1998) y de mosca (dorsal y cactus)(Cantera et al., 1999). El hallazgo en estas dos especies sugiere que la presencia en la sinapsis se conserva a través de la evolución. Recientemente se ha detectado a IKK (IKK  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) en el contenido sinaptosomal y densidades postsinápticas, en conjunto con Rel B y c-Rel (Schmeisser et al., 2012). Varios informes indican también una localización axonal para los componentes de la vía de NF-kappa B. Las proteínas p65 e IKK han sido reportadas en el segmento inicial del axón (AIS), e IKK fue identificado unido a microtúbulos (Schultz et al., 2006; Sánchez-Ponce et al., 2008). Hubo cierta controversia sobre la presencia de I $\kappa$ B en el AIS ya que se vió un fuerte reconocimiento a un epítipo no identificado en ratones knockout I $\kappa$ B, e I $\kappa$ B parece no ser necesario para el montaje del AIS (Buffington et al., 2012). También se encontró actividad de unión a ADN de NF-kappa B en el axoplasma de *Aplysia* (Povelones et al 1997).

La presencia de una forma inducible de NF-kappa B en las sinapsis llevó a la hipótesis de que el factor de transcripción es activado localmente por la actividad sináptica y luego, en este estado activado, es transportado retrógradamente al núcleo para regular la expresión génica. Este hecho confiere a este factor de transcripción una función dual como detector de actividad sináptica y como regulador transcripcional (Meffert et al., 2003; Salles et al., 2014). Desde el descubrimiento de la presencia de NF-kappa B en las dendritas, la hipótesis principal fue que el factor de transcripción es capaz de ser transportado de la sinapsis al núcleo, para transducir la actividad sináptica en la actividad transcripcional. Varios de estos pasos demostraron ser correctos; en cultivos de hipocampo de rata, la estimulación con glutamato o despolarización, resultó en la redistribución de p65 de las neuritas hacia el núcleo. Esta redistribución fue dependiente en un NLS funcional, lo que sugiere que fue la subpoblación de NF-kappa B activo la que fue transportada al núcleo (Wellmann et al., 2001). El complejo motor dineína/dinactina, junto con los microtúbulos,

media el transporte de NF-kappa B al núcleo y este transporte depende de la interacción de p65 vía su NLS con importinas  $\alpha/\beta$  (Fagerlund et al., 2005; Mikenberg et al., 2007). Tomados en conjunto, estos datos indican que luego de activado, NF-kappa B sináptico es capaz de translocar al núcleo, donde transduce la actividad sináptica en la inducción transcripcional de genes específicos. Una hipótesis diferente, que podría coexistir con la anterior, es que NF-kappa B además puede modular la función sináptica localmente (Heckscher et al., 2007; Salles et al., 2014). Esta hipótesis se discute en este trabajo de tesis donde se construye una importante base para el futuro estudio de este rol de NF-kappa B en la memoria.

## h. Rol de NF-kappa B en la memoria

El descubrimiento de NF-kappa B en el sistema nervioso y de la necesidad de la transcripción génica para la consolidación de memorias de largo término proveyó el escenario para que poco después se identificara a NF-kappa B como una pieza clave en estos procesos. La potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) son modelos de plasticidad sináptica que aumentan o disminuyen, respectivamente, la eficacia sináptica y se cree que son un correlato de los mecanismos celulares de la memoria. La inducción de LTP in vivo en hipocampo aumentó la expresión y la activación de NF-kappa B (Meberg et al., 1996, Freudenthal et al., 2004). A su vez, la inhibición de NF-kappa B redujo la magnitud del LTP e impidió la inducción de LTD (Albensi y Mattson, 2000). Por lo tanto, el factor de transcripción es necesario en estos procesos experimentales de plasticidad sináptica que se consideran buenos correlatos de los cambios sinápticos que se producen durante el almacenamiento de la memoria. A su vez, NF-kappa B está directamente implicado en el control de la densidad de espinas dendríticas, su regulación a lo largo de la activación de IKK aumenta la densidad de espinas y la inhibición la disminuye (Boersma et al., 2011; Russo et al., 2009). El cambio en la densidad de espinas es otro correlato celular

de la memoria que podría considerarse como uno de los mecanismos que subyacen a estos procesos.

La primera evidencia de la participación de NF-kappa B en la memoria *in-vivo* se obtuvo en invertebrados, en la memoria de contexto-señal en el cangrejo *Neohelice granulata* (antes *Chasmagnathus granulatus*). En este modelo, en el cual las señales contextuales están asociadas con un estímulo de peligro, la activación de NF-kappa B se correlaciona altamente con la formación de memorias de largo término (Freudenthal et al., 1998; Freudenthal y Romano, 2000) mientras que la inhibición de este factor de transcripción impide la formación de memoria (Merlo et al., 2002). Otros estudios encontraron que NF-kappa B está involucrado en procesos de memoria en roedores, en diferentes tareas de aprendizaje como el condicionamiento de sobresalto en respuesta al miedo (Yeh et al., 2002), el laberinto de brazos radiales (Meffert et al., 2003), la evitación inhibitoria (Freudenthal et al., 2005), el condicionamiento contextual de miedo (Lubin y Sweatt, 2007), la preferencia condicionada de lugar (Yang et al., 2011) y el reconocimiento de objetos novedosos (Federman et al., 2013). La inhibición de la vía de NF-kappa B en el hipocampo, durante la consolidación y reconsolidación resulta ser amnésica para la tarea de memoria de evitación inhibitoria (Boccia et al., 2007).

En el condicionamiento de sobresalto en respuesta al miedo, las ratas entrenadas recibieron 10 estímulos de luz pareados con un choque eléctrico, y las ratas control recibieron una presentación pseudoaleatoria del mismo número de estímulos de luz y choques. En una sesión de evaluación, se presentó el estímulo condicionado junto con un ruido blanco y se evaluó el sobresalto potenciado por el miedo. Utilizando este modelo, se encontró un incremento de la actividad de unión a ADN de NF-kappa B mediante EMSA a las 2-6 h después de un entrenamiento en amígdala pero no en hipocampo o cerebelo. También se evidenció la activación de IKK a los 10 y 30 minutos después del entrenamiento, retornando a los niveles basales a los 90 min. La inhibición intra-amígdala

de NF-kappa B antes del entrenamiento redujo significativamente el sobresalto en la evaluación de la memoria de largo término, apoyando la idea de que la activación de NF-kappa B en la amígdala es necesaria para el almacenamiento de este tipo de memoria (Yeh et al., 2002).

En el hipocampo, la primera evidencia del papel de NF-kappa B en la memoria se encontró en una tarea de evitación inhibitoria en ratones. Como se desarrolló anteriormente, el hipocampo es una estructura clave para las memorias contextuales porque está involucrada en el procesamiento y la identificación de las características de diferentes lugares; y en la codificación del estímulo incondicionado asociado con un lugar particular. En esta tarea, los animales fueron colocados en una plataforma abierta, elevada e iluminada con libre acceso a un compartimiento oscuro. Una vez que los animales entraron en el compartimiento oscuro, recibieron un choque eléctrico. Los animales entrenados típicamente muestran latencias altas de entrada al compartimiento oscuro durante la sesión de evaluación. Además, se encontró que la inhibición de este factor de transcripción mediante la administración intra-cerebro ventricular de sulfasalazina inmediatamente después del entrenamiento indujo un déficit de retención de la memoria de una manera dependiente de la dosis (Freudenthal et al., 2005). Por el contrario, las inyecciones de sulfasalazina fuera de la ventana de consolidación no afectaron la retención. Este mismo efecto se observó cuando se estudió la inhibición directa de NF-kappa B con un oligonucleótido de secuencia kB. El oligonucleótido kB consiste en ADN de doble hebra que contiene la secuencia consenso que une al factor de transcripción, compitiendo con el ADN en el núcleo y de este modo secuestrando al factor de transcripción e impidiendo su acción. Los animales mostraron un impedimento en la retención de la memoria cuando se inyectó el oligonucleótido de manera intra-cerebro ventricular, 2 horas previo al entrenamiento. Por el contrario, la inyección de un oligonucleótido con una única mutación de base en la secuencia consenso no afectó la memoria de largo término. Utilizando la misma tarea se

estudió la activación de NF-kappa B en el hipocampo mediante EMSA y se observó que la misma aumentó a los 45 minutos después del entrenamiento en los animales entrenados, habiendo regresado a los niveles basales a las 2 hs luego del entrenamiento. Estos resultados apoyan la idea de que la activación del NF-kappa B en el hipocampo es necesaria para la consolidación de las características contextuales y la asociación con el estímulo condicionado (Freudenthal et al., 2005).

También se estudió la dinámica de la activación NF-kappa B en el hipocampo en la consolidación de la memoria miedo contextual. En esta tarea, los ratones asocian características contextuales de la cámara de entrenamiento con un choque eléctrico. Durante la evaluación, se determina el porcentaje de respuesta observando el tiempo de inmovilidad (también conocido como respuesta estereotipada de *freezing*). Similar a los resultados obtenidos en evitación inhibitoria, se observó una activación del NF-kappa B hipocampal a los 45 minutos después de la adquisición de tres ensayos (de la Fuente et al., 2014). La administración intra-hipocampal de sulfasalazina indujo efectos amnésicos, evidenciados en nuevas sesiones de evaluación a las 24 horas y 2 semanas después del entrenamiento, lo que sugiere un efecto amnésico permanente. Estos hallazgos apoyan que NF-kappa B en el hipocampo está involucrado en la consolidación de memorias aversivas contextuales .

Estas tareas descritas anteriormente implican la presencia de un estímulo aversivo. Con esta información, una posible interpretación es que NF-kappa B está específicamente involucrado en las memorias asociadas con estímulos aversivos. La tarea de reconocimiento de objetos novedosos es ampliamente utilizada para la investigación de memorias declarativas y evalúa la capacidad de determinar si un elemento u objeto recientemente encontrado se ha encontrado previamente. En la variante clásica de la tarea, el animal es expuesto durante el entrenamiento a dos objetos idénticos y se le permite explorarlos durante un período de tiempo definido. Durante la sesión de evaluación, los

animales están expuestos a dos objetos distintos entre sí, uno de ellos es uno de los objetos presentados durante el entrenamiento y el otro es un objeto nuevo. Se contabiliza el tiempo de exploración de los dos objetos y se determina un índice de discriminación que indica que objeto se exploró más, esta tarea aprovecha la predisposición natural del roedor a explorar más en detalle objetos nuevos por sobre aquellos conocidos. En la tarea de reconocimiento de objeto novedoso, no existen estímulos aversivos, pero tampoco se puede clasificar como una tarea con valencia apetitiva. Se encontró que NF-kappa B se activa en el núcleo de las células del hipocampo a los 45 y 60 min después de la adquisición. Nuevamente, la infusión de oligonucleótido kB en el hipocampo después del entrenamiento impide la consolidación de la memoria de reconocimiento cuando se evalúa 24 hs post-entrenamiento (Federman et al., 2013; Zalzman et al., 2015). Estos experimentos apoyan la participación de NF-kappa B en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objeto novedoso y conjuntamente con los experimentos anteriores plantean un rol más general del factor de transcripción en la consolidación de la memoria, independiente de la valencia de la misma.

Los factores de transcripción como NF-kappa B están involucrados en el primer paso de la regulación de la expresión génica. Es decir, estos factores son aquellos que ya están presentes en el momento de la actividad neuronal inducida por el entrenamiento. La activación de este tipo de factores de transcripción permite un segundo paso en la regulación de genes mediante la inducción de genes de respuesta temprana cuyos productos proteicos son, a su vez, factores de transcripción. Entre estos, se ha encontrado que zif268 desempeña un papel crítico en la formación de la memoria de largo término y la reconsolidación. Se sabe que NF-kappa B es capaz de unirse a la región promotora del gen que codifica para zif268 (Thyss et al., 2005), implicando a NF-kappa B en la regulación de su expresión. Recientemente se encontró que la expresión de la proteína zif268 se induce en el hipocampo a los 45 min después del entrenamiento de la tarea de reconocimiento de objeto novedoso. A su vez, la administración intrahippocampal post-entrenamiento de un

oligonucleótido antisentido al mRNA zif268 produce un deterioro de la memoria de reconocimiento. Además, se encontró que la inhibición de NF-kappa B mediante la utilización del oligonucleótido con la secuencia consenso kB redujo significativamente el incremento en los niveles de proteína zif268 inducidos por el entrenamiento. Esto indica que zif268 es necesario para la consolidación de la memoria de largo término de reconocimiento de objeto novedoso y que NF-kappa B participa en la regulación de su expresión en el hipocampo durante estos procesos (Zalcman et al., 2015).

Todos estos estudios previos se focalizan en la activación nuclear del factor de transcripción. Sin embargo, su presencia en la sinapsis dio lugar a la hipótesis de su posible rol local en la memoria. La activación de NF-kappa B en la sinapsis se observó en primer lugar en células de hipocampo en cultivo (Mikenberg et al.; 2007). In-vivo e investigando su rol en memoria, la activación de NF-kappa B en sinaptosomas se observó por primera vez durante la consolidación de la memoria a largo plazo en el cangrejo *Neohelice granulata* (Freudenthal y Romano, 2000). En este trabajo se explora la activación del factor de transcripción en sinaptosomas de ratones durante dos tareas contextuales de valencia opuesta basadas en la tarea de evitación inhibitoria.

## i. NF-kappa B y proteínas sinápticas

Estudios recientes han proporcionado evidencia de que el aprendizaje involucra procesos específicos de ganancia y eliminación de sinapsis, que conducen a la traza mnésica (Caroni et al., 2012). NF-kappa B, cuya activación ya se confirmó como parte del proceso de consolidación de la memoria, es un candidato para ejercer control en estos reordenamientos. Su localización en la sinapsis le confiere una característica ideal para ejercer una función mediante cascadas de señalización *in-situ* (Salles et al., 2014).

NF-kappa B puede ser modificado post-traduccionalmente y estas modificaciones tienen la capacidad de cambiar su actividad transcripcional afectando directamente su capacidad de interactuar con el ADN o indirectamente afectando sus interacciones proteína-proteína (Zhong et al 1998; Chen y Greene, 2005; Huang et al., 2010; Hochrainer et al., 2013). Entre la regulación de las interacciones proteína-proteína ejercida por modificaciones postraduccionales sobre NF-kappa B se encuentra la capacidad del factor de transcripción de reclutar enzimas a localizaciones particulares. Esta capacidad se activa cuando NF-kappa B es fosforilado por la quinasa PKA, promoviendo de este modo el reclutamiento de acetiltransferasas a promotores particulares en la cromatina (Zhong et al., 1998). Estos resultados le confieren a NF-kappa B un rol nuclear más allá de su rol canónico directo como factor de transcripción. Se cree que esta capacidad de interactuar con otras proteínas puede ser la clave del rol del factor de transcripción en la sinapsis. Informes de diferentes modelos animales y paradigmas de plasticidad sináptica indican que NF-kappa B desempeña un papel en la definición de la composición post-sináptica, y que esta regulación es la base de la fuerza sináptica (Salles et al., 2014).

Un indicio de que el rol de NF-kappa B en la sinapsis está relacionado íntimamente con su capacidad de interactuar con otras proteínas está dado por la función de dorsal y cactus (homólogos de NF-kappa B e IκB respectivamente) en la placa neuromuscular de *Drosophila*. En la placa neuromuscular, dorsal y cactus rodean los grupos de receptores de glutamato de las post-sinapsis. La movilización de dorsal y cactus de después de la activación de la unión neuromuscular mediante estimulación eléctrica o del glutamato está mediada por el calcio (Bolatto et al., 2003). A su vez, se sabe que esta agrupación de receptores de glutamato en la placa neuromuscular de *Drosophila* está mediada por dorsal y cactus. Esta evidencia apoya la idea de que la vía de NF-kappa B regula la inserción de la membrana de los receptores de glutamato en la placa neuromuscular de moscas a nivel post-traducciona (Heckscher et al., 2007).

En la placa neuromuscular de ratón, el agrupamiento de receptores de acetilcolina (AChR) es estimulado por el antígeno y requiere varias proteínas, incluyendo la proteína de andamiaje asociada a AChR, Rapsyn. La deficiencia selectiva de p65 en el músculo esquelético es seguida por una reducción de la densidad de AChR en la placa neuromuscular y un decremento en el nivel de la proteína Rapsyn. Por lo tanto, la agrupación de AChR en ratones se controla, al menos en parte, a través de la regulación transcripcional ejercida por NF-kappa B sobre la proteína sináptica Rapsyn (Wang et al., 2010). A su vez, existen evidencias de que la interferencia en la vía de señalización de NF-kappa B afecta también a otras proteínas post-sinápticas. En particular se ve afectada la densidad de GluA1 (subunidad del receptor de AMPA) y la inclusión de membrana y la presencia de PSD-95 y Sap97. Esto indica que la vía de NF-kappa B está directamente implicada en la regulación de la fuerza sináptica al (O'Mahony et al., 2006, Boersma et al., 2011, Schmeisser et al., 2012, Mihalas et al., 2013). Sin embargo, no hay trabajos aún en roedores que hayan confirmado la capacidad de modular receptores sinápticos localmente.

Como se introdujo anteriormente, NF-kappa B se activa a través de los receptores de glutamato tipo NMDA por señales como la despolarización y el incremento transitorio de  $Ca^{2+}$  intracelular y la activación de CaMKII (Meffert et al., 2003). Se hipotetiza que NF-kappa B puede entonces ser activado mediante dos vías; una en la sinapsis por mecanismos de transducción de señales locales y otra a nivel nuclear activado por la despolarización que viaja al soma. Esto hace que los receptores de NMDA sean un blanco interesante para poder investigar el rol del factor de transcripción sináptico disociado de su rol a nivel nuclear. En este trabajo de tesis se pone a punto comportamentalmente una herramienta cuyo fin es esta disociación para el futuro estudio y profundización del rol sináptico de NF-kappa B. Esta herramienta es un péptido cíclico que impide la unión de PSD95 con la subunidad NR2 del receptor de NMDA (Leblanc et al., 2010) y por lo tanto disrumpe la cascada de señalización local del receptor sin afectar su actividad como canal.

PSD95 es una importante proteína de andamiaje post-sináptica (Cheng et al., 2006; Kim y Sheng, 2004) que promueve la maduración de las sinapsis y ejerce una gran influencia sobre la estabilidad, la fuerza y la plasticidad sináptica (El-Husseini et al. 2000; Elias et al., 2006). Por otra parte, la sobreexpresión de PSD95 influye directamente en la potenciación a largo plazo (LTP) en el cerebro (Beïque y Anderade, 2003; Ehrlich y Malinow, 2004, Mir et al., 2014). Las espinas con niveles bajos de PSD95 son más susceptibles a alteraciones morfológicas dependientes de la actividad (Steiner et al., 2008), y la pérdida de PSD95 conduce a la retracción de las espinas (Cane et al., 2014, Ehrlich et al. 2007), lo cual está implicado en varias enfermedades neurológicas, tales como depresión, adicción, demencia y trastornos de ansiedad. Sin embargo, existen pocos estudios que identifiquen el papel de PSD95 en la consolidación de la memoria y su función no ha sido descrita en detalle. Recientemente se demostró que ratones mutantes *knock-out* (KO) para el gen de la proteína trans-membrana *tmem35*, presentan baja localización sináptica de PSD95 y mostraron deterioro en la memoria espacial y de miedo dependiente del hipocampo (Kennedy et al., 2016). Por otra parte, mutantes KO para *CPEB3* muestran niveles elevados de proteínas PSD95, NMDA y GluA1 y consecuentemente una mejora en el rendimiento en tareas espaciales como el laberinto de agua de Morris (Huang et al., 2014). En ratas expuestas al anestésico sevoflurano se observó un deterioro significativo de la memoria de trabajo y a su vez una expresión disminuida de PSD95 en la corteza prefrontal (Ling et al., 2015). En línea con estos resultados, una tarea de ejercicio que mejora la memoria contextual de miedo también aumenta los niveles de PSD95 en el hipocampo de ratas (Fernandes et al. 2016). Sin embargo, inhibidores de la interacción proteína-proteína entre PSD95 y nNOS no tienen efecto amnésico en dos tareas comportamentales en ratas (Smith et al., 2016). Esto podría implicar que el efecto observado en la memoria se debe a la interrupción de una vía alternativa como podría ser la de NF-kappa B.

PSD95 interactúa mediante sus dominios PDZ 1 y 2 con la subunidad NR2 del receptor de NMDA. Los receptores de glutamato tipo NMDA desempeñan un papel central en la plasticidad sináptica subyacente a procesos como la potenciación a largo plazo (LTP), el aprendizaje y la memoria (Platenik et al, 2000). No obstante, no existen reportes de la importancia de la interacción de NDMAR con PSD95 en procesos mnésicos. En este trabajo se provee la primera evidencia de que la correcta interacción de PSD95 con el receptor de NMDA en células hipocampales de ratón es necesaria para la consolidación de memoria de evitación inhibitoria.

# Hipótesis y Objetivos

---

## Hipótesis:

NF-kappa B tiene una participación crítica en los procesos de consolidación de la memoria de largo término en distintas áreas del cerebro, tanto de memorias aversivas como apetitivas. Por otra parte, la presencia sináptica de NF-kappa B tiene una función independiente de su translocación al núcleo durante la consolidación.

El objetivo general de esta tesis es profundizar el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la consolidación de la memoria.

## En particular los objetivos fueron:

- Definir dos tareas comportamentales que permitan el estudio comparativo de memorias aversivas y apetitivas.
- Estudiar la participación del NF-kappa B en dos tareas comportamentales, una aversiva y otra apetitiva.
- Investigar la participación de distintas áreas del cerebro en la consolidación de memorias apetitivas y aversivas.
- Caracterizar la localización, dinámica y función sináptica de NF-kappa B y en comparación con su rol nuclear.
- Poner a punto una herramienta que permita inhibir interacciones locales mediante los PDZ de PSD95 en la sinapsis para el futuro estudio de esta y otras vías sinápticas de transducción de señales relacionadas con la consolidación de la memoria.

# Materiales y Métodos

---

## a. Animales

Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo la Guía del Instituto Nacional de Estados Unidos de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH publicación no. 80-23 / 96) y nuestros protocolos están aprobados por la Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL FCEyN protocolo # 0071/2016; FFyB protocolo Exp-UBA # 0044975/2016). Se utilizaron ratones CF-1 machos criados en el laboratorio del Dr. Mariano Boccia (*Mus musculus*) (edad 40-50 días; peso de 25-30 g). Los ratones se mantuvieron en una habitación mantenida a 21-23 ° C en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h (luces encendidas a las 06.00 h), con acceso *ad libitum* a alimento seco y agua. Se hicieron todos los esfuerzos para reducir el número de animales utilizados y aliviar el sufrimiento de los animales.

## b. Aparatos y procedimientos para experimentos comportamentales

### i. Aparato de evitación inhibitoria (*Inhibitory Avoidance*)

Se utilizó el aparato para el entrenamiento de evitación inhibitoria en ratón, este entrenamiento utiliza la preferencia natural de los ratones por entornos oscuros. Este consiste de una pequeña (5 X 5 cm) plataforma elevada e iluminada con una abertura de acceso a un compartimiento oscuro (20 X 20 X 15 cm) con un piso de rejilla de acero

inoxidable (Figura M&M.I.D). Los ratones no fueron habituados al contexto previo al entrenamiento. Todos los ratones fueron entrenados entre las 8 a.m. y las 10 a.m.

Se utilizaron durante el trabajo distintos grupos de entrenamiento con un número de entre 8 y 10 animales para cada grupo en cada experimento. Los grupos utilizados fueron S, U, Si y N. El grupo S (*Shock*) consta de animales que durante el entrenamiento son colocados sobre la plataforma y cuando el animal entra al compartimiento oscuro recibe un choque eléctrico de 1.2 mA, 50 Hz, 1s. El grupo U (*Un-Shocked*) son animales que son colocados en la plataforma pero al entrar en el compartimiento oscuro no reciben choque eléctrico. El grupo Si (*Immediate Shock*) consiste de animales que son colocados en el compartimiento oscuro desde la tapa de arriba (la abertura hacia la plataforma se encuentra cerrada) e inmediatamente reciben un choque eléctrico de 1.2 mA, 50 Hz, 1s. Por último, los animales N (*Naïve*) no reciben ningún tipo de entrenamiento, fueron alojados en las mismas condiciones que la de los grupos experimentales, pero no experimentan el entorno experimental. Este grupo se incluyen con el fin de estimar los niveles basales en experimentos bioquímicos (Figura M&M.II.).

Para los grupos entrenados (S, U y Si) la retención de la memoria fue evidenciada por mediana de las latencias al entrar en el compartimiento oscuro durante la sesión de evaluación, 48hs después del entrenamiento. La sesión de evaluación dura un máximo de 5 minutos, tras los cuales los animales son devueltos a su caja de alojamiento. Este diseño hace que las diferencias entre grupos sean analizadas con estadísticos no paramétricos (ver Análisis de datos).

## ii. Plancha caliente

Los ensayos de resistencia al dolor se midieron utilizando una plancha caliente. Esta consiste en una superficie de metal a 56°C. Se coloca a los ratones de a uno sobre la misma y se cuantifica la latencia de estos para levantar y lamer su extremidad anterior.

### iii. Tablero con agujeros (*Hole Board*)

La adquisición de esta tarea involucra una forma de aprendizaje conocida como habituación, que posibilita la expresión de un cambio de comportamiento ante la exposición repetida de un sujeto a un ambiente definido, cuando dicha exposición no está acompañada de refuerzos significativos (Thompson y Spencer, 1966). Se utilizó el ensayo de habituación de una conducta de “hociqueo” (“nose-poke habituation task”) (Voits et al., 1995) el cual, tal como ha sido demostrado previamente, es aplicable a ratones como sujetos experimentales (Boccia y Baratti, 1999).

El aparato utilizado consiste en un tablero (Ugo Basile, Mod. 6650, Italia), construido con un panel gris mate, cuyas dimensiones son 40×40 cm, de 3,5 cm de espesor y que se encuentra elevado a 22 cm de la mesa y que se mantiene tenuemente iluminado. El panel posee 16 orificios cilíndricos regularmente espaciados, de 3 cm de diámetro. En su interior, cada uno de los orificios posee un emisor infrarrojo y un detector conectado a un contador automático que registra el número de veces que cada ratón introduce su hocico en los orificios.

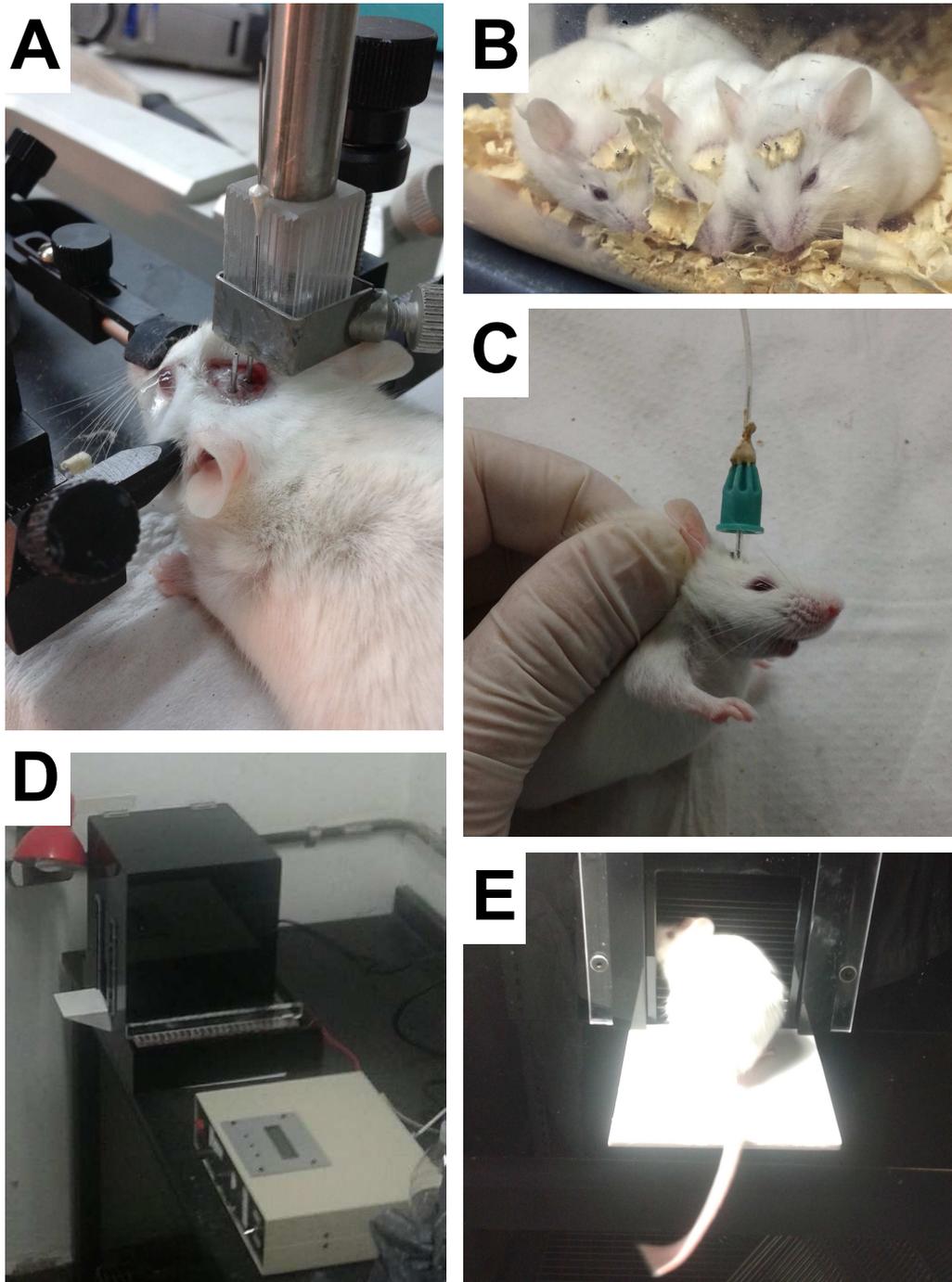
En el entrenamiento, cada ratón fue colocado en el centro del panel y se registró el número de hociqueos durante 5 minutos. Luego de los 5 minutos el ratón fue retirado del panel y devuelto a su jaula y el panel fue cuidadosamente higienizado con agua. Durante el ensayo de retención, realizado 24 horas luego del entrenamiento, cada ratón fue nuevamente colocado en el centro del panel y se registró el número de hociqueos durante 5 minutos. La diferencia entre el número de hociqueos durante la sesión de entrenamiento y durante el ensayo de retención se tomó como índice de memoria.

#### iv. Acicalamiento

El acicalamiento para los ensayos de toxicidad se midió en una arena experimental con viruta. Los animales fueron observados durante 5 minutos en sesiones inmediatamente luego de las inyecciones, 1 hora y 18 horas después de las inyecciones. Se contabilizó el porcentaje de tiempo que los animales empleaban en la tarea estereotipada de acicalamiento (*grooming*). Además se observó si los animales ladeaban la cabeza (*head turning*).

#### c. Cirugías para canulación

Los ratones fueron implantados bajo anestesia (0.1ml de 80% ketamina y 20% xilacina, intra-peritoneal) con cánulas guía de calibre 23, 5 días antes del entrenamiento. Para el hipocampo (HIPO), las coordenadas desde Bregma (de acuerdo con el atlas de Paxinos y Franklin, 2001) usadas fueron las siguientes: eje anterior-posterior (AP), -1,9; eje lateral (L),  $\pm 1,2$ ; y el eje dorso-ventral (DV), -1.2. Para la amígdala (AMY) las coordenadas usadas fueron: AP, -1.5; L,  $\pm 3$ ; y DV, -3,5. Para núcleo accumbens (NAcc) las coordenadas fueron: AP, 1,6; L,  $\pm 1$ ; y DV, -3,1. Para la corteza somatosensorial primaria, región de la extremidad anterior (S1FL) coordenadas fueron: AP, + 0,5; L,  $\pm 2,5$ ; y DV, -1. Las cánulas guía se fijan al cráneo con pegamento instantáneo y acrílico dental (Figura M&M.I.).

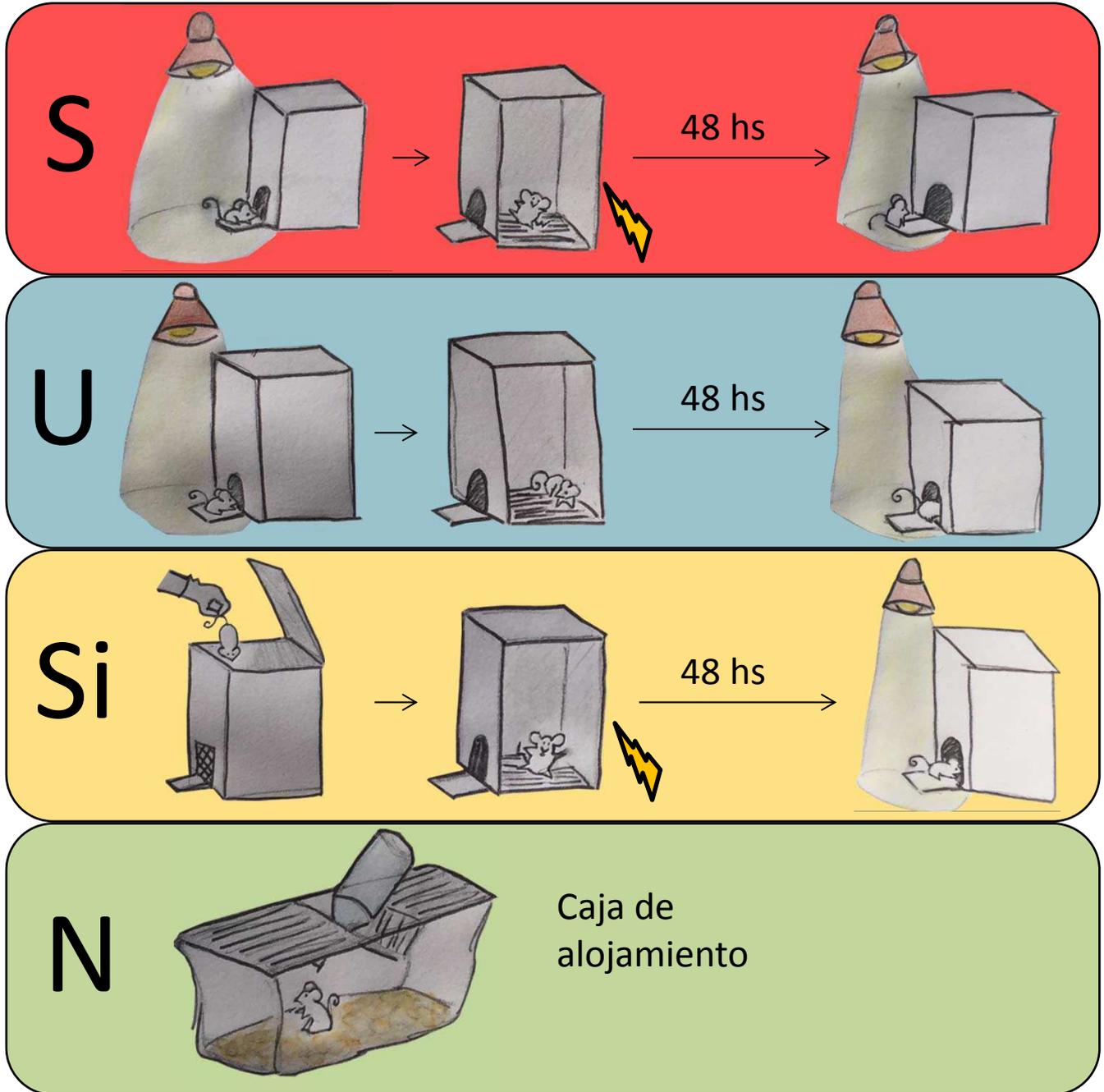


**Figura M&M.I.**

A) cirugía de implante de cánulas con estereotáxico. B) animales recuperados luego de la cirugía alojados de a 4/5 animales por caja. C) Procedimiento de inyección de animales canulados. D) Aparato de evitación inhinitoria, se observa la plataforma blanca con la lámpara que la ilumina, a la derecha del mismo esta el aparato que produce la descarga eléctrica en la rejilla dentro de la caja negra. E) Raton sobre la plataforma iluminada durante un entrenamiento.

# TR

# TS



### Figura M&M.II. Grupos experimentales

Grupos experimentales y procedimiento comportamental. Los ratones adultos CF1 machos se dividen en tres grupos experimentales para experimentos de comportamiento. Estos son los grupos S (recibe un choque eléctrico al entrar al compartimiento oscuro), Si (recibe un choque no asociado al contexto) y U (no reciben choque eléctrico al entrar en el compartimiento oscuro). La retención se evidencia al evaluar las latencias de entrada compartimiento oscuro durante la sesión de evaluación, 48 horas después del entrenamiento. Los animales N (naïve) se utilizan para ensayos moleculares. Para los ensayos moleculares los animales se sacrifican 5, 15 o 45 minutos luego del entrenamiento.

## d. Drogas e inyecciones

### i. Inyecciones

#### 1. Intra-cerebrales

En todos los casos, las inyecciones se realizaron de forma bilateral y el volumen de cada infusión fue de 0,5  $\mu$ l/lado. La cánula de inyección se insertó en la cánula guía para llegar a las áreas blanco. Para HIPPO, AMY y NAcc, la cánula de inyección usada fue 1 mm más larga que la cánula guía; para S1FL la cánula de inyección extiende sólo 0,5 mm más allá de la cánula guía. Las inyecciones se administraron durante 30 s. La cánula de inyección se retiró después de 60 s para evitar el reflujo y para permitir la difusión de los fármacos (Figura M&M.I.). Después de los procedimientos conductuales se realizó el examen histológico para corroborar el sitio de inyección. Para este fin, los animales fueron inyectados con tinta china y decapitados y los cerebros se colocaron en 4% de paraformaldehído durante 1 día seguido de 30% de sacarosa durante otras 24 h para luego ser cortados con un vibratomo. Por último, el sitio de inyección se verificó con una lupa comparando con el atlas de Franklin y Paxinos. En los atlas se marca la posición de la cánula de inyección y el área máxima alcanzada con las tinciones de tinta china. Sólo se incluyeron en el análisis los datos de los animales con cánulas situadas en las zonas blanco.

#### 2. Intra-venosas

Se colocó a los animales de a uno en un tubo de plástico confeccionado a partir de una jeringa de 50 ml para restringir el movimiento, dejando que la cola quede por fuera del mismo. Una vez colocado al animal en el dispositivo se localizaron las venas laterales de la cola y se procedió a inyectar la droga o el vehículo.

### 3. Intra-peritoneales

Se sujetó a los animales para inmovilizarlos y colocándolos con el vientre hacia arriba se inyectó en el peritoneo al lado de la extremidad posterior izquierda. Esta inyección se utilizó para la administración de la anestesia para las cirugías de canulación y para uno de los experimentos con los péptidos PDZ1&2 y PDZ3.

#### ii. Drogas

La sulfasalazina (Ácido 2-hidroxi-5- [ (E)-2-{ 4-[ ( piridin-2-il ) sulfamoil ] fenil } diazen-1-il] benzóico) (Sigma, St. Louis, MO) se inyectó en una solución de 2 µg/µl, el vehículo para esta droga fue una solución de 100% de DMSO. La dosis utilizada inhibe específicamente a NF-kappa B (Freudenthal et al., 2005, Boccia et al., 2007).

Todas las generaciones de los péptidos PDZ1&2 y PDZ3 (Calista Therapeutics) son péptidos cíclicos de alta permeabilidad a las membranas, estables y solubles en agua. Para los ensayos de toxicidad con inyecciones intra-venosas se inyectaron en concentraciones de 5 µM ó 10 µM. Para las inyecciones intra-hipocampales se inyectaron en una concentración de 10 nmoles/ratón. Para el experimento con inyección intra-peritoneal se utilizó una concentración de 1 µmol/ratón. El vehículo usado para los péptidos fue solución salina estéril. *Dado que la patente de los péptidos está aún pendiente no se puede divulgar la secuencia aminoacídica ni la designación oficial de los mismos.*

## e. Extractos

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, los animales N fueron sacrificados al mismo tiempo que los S, U y Si para cada experimento. Los cerebros se retiraron rápidamente, y el hipocampo se diseccionó de acuerdo con el método de Glowinski y Iversen (1966). Posteriormente se realizaron los extractos como se detalla en las sub-secciones siguientes. Luego de realizados los extractos, la concentración de proteína de cada uno se midió por duplicado con el kit de ensayo de proteína BCA (Thermo Scientific) con el protocolo establecido por el fabricante.

### i. Nucleares y Citoplasmáticos

Para obtener los extractos nucleares, cada hipocampo se homogeneizó en 250  $\mu$ l de Buffer A hipotónico (10 mM HEPES, pH 7,9, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, DTT 1 mM, 1 g / ml de pepstatina A, 10 g / ml de leupeptina, 0,5 mM PMSF, y 10 g / ml de aprotinina) con ocho golpes en un homogeneizador Dounce, tipo B estrecho. El extracto homogeneizado se centrifugó durante 15 min a 1000 g. El sobrenadante (extracto citoplasmático) se almacenó a -80 °C hasta su uso. El sedimento se resuspendió en 30  $\mu$ l de Buffer B hipertónico (20 mM HEPES, pH 7,9, KCl 800 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, EDTA 0,4 mM, DTT 0,5 mM, 50% de glicerol, 1 g / ml de pepstatina A, 10 g / ml leupeptina, 0,5 mM PMSF, y 10 g / ml de aprotinina) y se incubaron durante 15 min en hielo. A continuación, se realizó una centrifugación durante 15 min a 10.000 g. El sobrenadante (extracto nuclear) se almacenó a 80 ° C hasta su uso. Todo el protocolo de extracción se realizó a 4 ° C.

## ii. Sinaptosomales (CS, ET y mSDS)

Para obtener los extractos crudos sinaptosomales (P2), los tejidos se homogeneizaron en 250  $\mu$ l de Buffer 1 (Tris-HCl 20 mM, sacarosa 320 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4, 1  $\mu$ g / ml de pepstatina A, 10  $\mu$ g / ml de leupeptina, PMSF 0,5 mM) con quince golpes en un homogeneizador Dounce, tipo B ajustado. El homogeneizado se centrifugó durante 10 minutos a 1000 g. El sobrenadante se separó en un nuevo tubo y el sedimento se resuspendió en 250  $\mu$ l de Buffer 1 y se centrifugó de nuevo durante 10 minutos a 1000 g. El nuevo sobrenadante se combinó con la anterior. Los 500  $\mu$ l de sobrenadante obtenidos previamente se centrifugaron durante 30 minutos a 13000 g. Luego, el sobrenadante se descartó y se utilizó el sedimento (extracto crudo de sinaptosomas, P2) para más extracciones. Se añadieron cuatro volúmenes de buffer hipotónico (Tris-HCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 50  $\mu$ M, pH = 8,1) al P2 y se lo resuspendió vigorosamente. Se centrifugó durante 50 minutos a 15800 g. El sobrenadante (contenido sinaptosomal, CS) se mantuvo a -80°C hasta su utilización. El sedimento se resuspendió en buffer hipotónico con 1% de detergente Tritón y se centrifugó 50 minutos a 15800 g. El sobrenadante (extracto de Tritón, ET) se mantuvo a -20°C hasta su uso. El sedimento se resuspendió en buffer hipotónico de 1% de SDS (membranas tratadas con SDS, mSDS) y se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

Los sinaptosomas purificados por gradiente de Percoll se obtuvieron siguiendo el procedimiento descrito por Nagy y Delgado-Escueta, 1984 con modificaciones de Rodrigues et al., 2005. Brevemente, se obtuvo el P2 como se describió anteriormente y se lo colocó en un gradiente discontinuo de Percoll 2 ml (3%, 10% y 23%). Luego se centrifugó durante 20 minutos a 15000 g. Los sinaptosomas se recuperaron con una pipeta Pasteur de la interfaz formada. Luego de obtener los sinaptosomas puros, se utilizó el mismo protocolo que se describió anteriormente para obtener los extractos CS, ET y mSDS.

## f. Ensayos de Western Blot

Para los ensayos de *Western Blot*, se añadió buffer de carga a las muestras y luego se incubaron a 95 °C durante 5 min. Se sembraron veinte microgramos de cada muestra de proteína en un gel 10% Acrilamida-Bisacrilamida (29:1) en Tris-HCl con SDS. El gel se corrió durante 30 minutos a 80 V y luego durante 90 minutos se incrementó el voltaje a 120 V. posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF durante 45 minutos a 100 V. Cada membrana se bloqueó 1 hora con leche 4% en buffer TBS-tween (50 mM Tris-Cl, pH 7.5; 150 mM NaCl, 0.1% tween) y luego se incubó con los anticuerpos primarios correspondientes (ver sección anticuerpos) durante toda la noche. El siguiente día se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno en TBS-tween y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (ver sección anticuerpos) durante 1 hora.

La detección de las proteínas de interés se realizó con el kit de ECL (Amersham General Electric) como se describe por el fabricante y las señales fueron digitalizadas mediante el aparato II FUJIFILM con lector de imagen de software LAS-1000. La densidad óptica relativa (DOR) se estimó utilizando el software ImageJ 1.45. El tamaño de la proteína se estimó por su movilidad relativa utilizando el software ImageJ 1.45 y correlacionando estas mediciones con los pesos moleculares de las proteínas estándar del marcador de peso molecular (Marcador de Peso Molecular: 12-225 kDa, Amersham). Dada la dificultad para encontrar una proteína cuya cantidad se mantenga estable en los sinaptosomas durante la consolidación, se utilizaron mediciones de proteína total previo al sembrado de la electroforesis por el método de BCA y posteriormente relativización a proteína total medida por el método de Ponceau; y en algunos casos se corroboró estas mediciones con mediciones de  $\beta$ -tubulina.

## g. Ensayos de determinación de actividad de NF-kappa B

La actividad de NF-kappa B se determinó mediante su capacidad de unión al ADN. Esto se evaluó mediante ensayo de retardo electroforético (*EMSA*). Un oligonucleótido de doble cadena que contiene el sitio de unión de NF-kappa B (5' **AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC**-3' sitio de unión en negrita) se preparó por hibridación de dos oligonucleótidos simple cadena de longitud diferente (5'-AGTTGAGGGGACTTT-3' y 5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3' hechos por encargo, Integrated DNA Technologies) y completando el extremo en sobresaliente con el protocolo de la enzima Klenow (Promega). Para esto, 5 mM de cada uno de los nucleótidos dGTP, dATP, dTTP y el nucleótido marcado radiactivamente dCTP32, se incubaron con: 2 picomoles de oligonucleótido de doble cadena con el extremo sobresaliente, 2,5 unidades de enzima de Klenow y el buffer del fabricante por 20 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 2 µl de 200 mM EDTA. El ADN se precipitó durante la noche después de la adición de acetato de sodio y etanol para eliminar el dCTP32 libre, al día siguiente el oligonucleótido se centrifugó y se resuspendió en 150 ml de agua. El ensayo de unión a ADN de NF-kappa B se llevó a cabo en 20 µl de buffer de reacción (Hepes 20 mM, pH 7,9; KCl 120 mM; EDTA 0,4 mM; TDT 0,5 mM; glicerol 25%) con 0,3 µg de poli dIdC y 10 µg de extracto de proteína. Las muestras se incubaron durante 40 min a 0°C y se añadió luego 1 µl de oligonucleótido marcado a cada muestra seguido de una incubación durante 40 min a 0°C. La mezcla de reacción se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida 6% no desnaturalizante en 0,25 X TBE (en mM: Tris, 22,3; ácido bórico, 22,3; y EDTA 0,5) durante 2 horas a 170 V. El gel se secó a vacío y se expuso durante la noche a Hyperfilm-MP (Amersham). Todas las medidas se realizaron con las exposiciones dentro del rango lineal. Las imágenes fueron digitalizados por medio de un escáner transmisor (EPSON). La densidad óptica relativa (DOR) de la banda específica se estimó usando el software Image J 1.45s.

## h. Inmunofluorescencia

La fluorescencia en las muestras de tejido se visualizó usando un microscopio confocal láser de barrido (Olympus FV300, Japón) equipado con un láser de argón de 488 nm (543 nm de HeNe verde), un objetivo UplanFI 10X (NA 0,3), un objetivo UplanFI 20X (NA 0.5), y un SDM cubo dicróico 570 para dividir los canales de adquisición. La especificidad del anticuerpo secundario se evaluó llevando a cabo el protocolo de inmunofluorescencia sin el anticuerpo primario. El procesamiento de imágenes se realizó utilizando el software ImageJ 1.45 (NIH, EE.UU. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

## i. Secciones

Los ratones fueron anestesiados con 0.1ml de 80% ketamina y 20% xilacina, intra-peritoneal. Luego se perfundieron con PFA (paraformaldehído) al 4%. Los cerebros se extrajeron y se mantuvieron en 15 ml PFA al 4% durante 2 horas. A continuación, los cerebros se transfirieron a 15 ml de solución de sacarosa al 30% en buffer de fosfato (PO) pH = 7,4 se mantuvieron a 4°C durante la noche. Los cerebros se congelaron en isopentano mantenido a -80°C. Se cortaron secciones en 25 µm usando un criostato. Se seleccionaron secciones adecuados y fueron lavados en buffer PO con concentraciones crecientes de detergente Triton. Las secciones se mantuvieron 1 hora en solución de bloqueo (PO-triton 0,03%, BSA1%, suero normal de conejo 2%) y después durante la noche con diluciones primarias de anticuerpos en buffer PO-triton 0,03% (ver sección anticuerpos). Los lavados se realizaron en buffer PO con concentraciones crecientes de detergente Tritón. Las secciones se incubaron después con anticuerpos secundarios AlexaFluor durante 1 hora a temperatura ambiente. Los lavados se realizaron en buffer PO con concentraciones crecientes de detergente Tritón y las rebanadas se

montaron en portaobjetos con 20% de PBS, 80% de glicerol. Se cubrieron las muestras con cubreobjetos y se sellaron con esmalte transparente.

## ii. Sinaptosomales

Los vidrios (cubreobjetos) para esta inmunofluorescencia deben ser preparados de la siguiente manera: Se colocaron los vidrios (cubreobjetos redondos de 12mm) en un frasco con HCl 6M por 4 hs, agitando de vez en cuando. Luego se hicieron 20 lavados en agua destilada y se dejaron los vidrios en agua destilada toda la noche. Al día siguiente se hicieron 10 lavados más en agua destilada. A continuación se hicieron 2 lavados en Etanol 70%. Se dejaron en etanol hasta ser usados.

Los sinaptosomas se prepararon como se describió anteriormente en la sección "Extractos". El P2 se resuspendió en 100  $\mu$ l de Buffer HSE de baja fuerza iónica (Heppes 5mM, Sacarosa 0.32M, EDTA 1 mM, DTT 1mM) para evitar agregado. Se fijaron los sinaptosomas 10 minutos en PFA 4% y luego se hicieron 3 lavados en PBS.

Para la adherencia de los sinaptosomas a los cubreobjetos previamente preparados se utilizó el siguiente protocolo. Se flamearon los vidrios de a muchos para no romperlos. Los vidrios se colocaron de a uno en los pocillos una placa de 24 pocillos y se agregó 50  $\mu$ l en cada uno de Poly D lisina 40  $\mu$ g/ml. Se incubó 1 hr a 37°C en cámara húmeda y luego se hicieron 3 lavados en agua destilada. Se hizo un lavado más en buffer HSE de baja fuerza iónica. Se retiró el líquido y se agregó sobre cada vidrio en los pocillos una gota (40  $\mu$ l) de resuspensión de P2. La placa se centrifugó en centrífuga de placas a 1000 g por 30 minutos. Luego se realizó un lavado más en buffer HSE de baja fuerza iónica.

Por último se prosiguió con el protocolo de inmunofluorescencia para sinaptosomas que se describe a continuación. Se cubrió la superficie del vidrio con solución de bloqueo (0,5% de tritón para permeabilizar, 2% de BSA, 0,5% de suero normal de conejo, en PBS) (50  $\mu$ l / diapositiva) y se dejó en cámara húmeda durante 30-60 minutos. Luego se realizó

un enjuague brevemente con PBS y se añadieron los anticuerpos (Tabla 1) (50  $\mu$ l / diapositiva) en solución de bloqueo y se dejaron a 4°C durante la noche en cámara húmeda. Se recuperó el anticuerpo primario y se lavó tres veces en PBS. Se añadió el anticuerpo secundario (Tabla 1) (50  $\mu$ l / diapositiva) en PBS, 0,5% de BSA, 0,5% de tritón y se incubó 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda en la oscuridad. Al finalizar la incubación se recuperó el anticuerpo y se realizó un lavado con PBS. Finalmente se añadió una solución de montaje en gotas (80% de glicerol, 20% de PBS) y se montó los cubreobjetos sobre los potra objetos evitando burbujas. Posteriormente se sellaron los vidrios con esmalte de uñas transparente para su posterior análisis en el microscopio confocal.

## i. Análisis de datos

Los valores de densidad óptica relativa (DOR) para cada grupo fueron relativizados los los valores de la media del grupo N para cada experimento y dentro de cada gel. Se calculó luego el porcentaje para cada grupo tomando los N como 100%. Luego se verificaron los supuestos de homocedacea y normalidad de los datos y se utilizó ANOVA de una sola vía. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante la prueba post-hoc LSD de Fisher. Para los experimentos comportamentales se utilizaron test no paramétricos ya que los datos no presentan una distribución normal porque los animales son removidos de la plataforma al cumplirse 5 minutos (300 segundos). Por lo tanto se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para estimar la significancia general. Las diferencias entre pares de grupos se evaluaron con comparaciones de Mann-Whitney. Se utilizó la corrección de Bonferroni para determinar la significancia estadística (e.g. para hipocampo figura I.III.C  $p < 0,0033$ ). El test de Wilcoxon se utilizó para evaluar diferencias entre medidas repetidas en días consecutivos. Para evaluar co-localización en las inmunofluorescencias se utilizó la correlación de Pearsons y de Manders.

## j. Anticuerpos

Tabla 1.

Anticuerpo	Fabricante	Nro. de catálogo	Dilución para ensayos WB	Dilución para inmunofluorescencia	Especie de origen
p65	Santa Cruz Biotechnology	Sc-372 c20	1:1000	1:100	conejo
I $\kappa$ B $\alpha$	Santa Cruz Biotechnology	sc-847	1:500	1:100	conejo
p65 NLS	Chemicon	Mab3026	---	1:50	conejo
NMDA NR1	Sigma-Aldrich	G8913	1:500	---	conejo
PSD95	Cell Signaling	2507	1:1000	1:100	conejo
p65	Santa Cruz Biotechnology	sc-8008	1:1000	1:100	ratón
Lamin B1	Santa Cruz Biotechnology	sc-13036	1:1000	---	ratón
$\beta$ -tubulina	Millipore	CP07	1:1000	---	ratón
tom20	Santa Cruz Biotechnology	sc-11415	1:200	1:100	ratón
Ratón IgG HRP	Santa Cruz Biotechnology	sc-2005	1:5000	---	cabra
Conejo IgG HRP	Santa Cruz Biotechnology	sc-2030	1:5000	---	cabra
Ratón IgG Alexa488	Invitrogen	A11008	---	1:500	cabra
Conejo IgG 680RD	Licor	926-68073	---	1:20000	burro
Ratón IgG 800CW	Licor	926-32201	---	1:20000	cabra

# Resultados Capítulo I - NF-kappa B en memorias apetitivas y aversivas

Como se introdujo anteriormente, el factor de transcripción NF-kappa B está involucrado en la consolidación y reconsolidación de la memoria. Esto se ha evidenciado utilizando diversos paradigmas de aprendizaje tanto de memorias aversivas como apetitivas (Yeh et al., 2002; Meffert et al., 2003; Freudenthal et al., 2005; Lubin y Sweatt, 2007; Yang et al., 2011; Federman et al., 2013; Zalcman et al. 2015). El requerimiento de NF-kappa B durante la consolidación de la memoria en ratón se ha estudiado enfocándose principalmente en el hipocampo, sin prestar particular atención a la necesidad de activación sistémica de otras áreas. En este capítulo se explora la participación de NF-kappa B en distintas regiones del cerebro de ratón durante la consolidación de memorias apetitivas o aversivas que comparten un mismo entorno contextual y dinámica temporal. Con este fin se utilizó el aparato de evitación inhibitoria y se entrenó a tres grupos de animales (S, Si y U) de manera diferencial. Los animales S (*Shock*) fueron colocados en la plataforma de entrada al compartimiento oscuro y recibieron un choque eléctrico al entrar al mismo. Estos animales por lo tanto recibieron durante el entrenamiento un refuerzo aversivo que asocian al contexto. Los animales Si (*immediate shock*) fueron colocados directamente en el compartimiento oscuro a través de la tapa superior del mismo y la abertura lateral que conecta con la plataforma, cerrada. Inmediatamente después de colocar a estos animales en el compartimiento oscuro se les administró un choque eléctrico y se los devolvió a su caja. Estos animales no tienen una respuesta operante durante el entrenamiento y no forman asociación al contexto (Wiltgen et al 2001). Los animales U (*Un-shocked*) son colocados en la plataforma al igual que los animales del grupo S, pero al entrar al

compartimiento oscuro no recibieron un choque eléctrico. Los ratones tienden a preferir lugares oscuros y cerrados (fototaxia negativa y tigmotaxia) por lo que prontamente abandonan la plataforma iluminada ingresando al compartimiento oscuro. Se considera que se trata de un aprendizaje apetitivo ya que los animales una vez experimentado el contexto reducen su latencia de entrada. Una interpretación es que durante el entrenamiento la entrada al compartimiento oscuro provee alivio para el animal y por lo tanto se lo considera un aprendizaje apetitivo (relief training). Esta tarea tiene similitudes con una versión modificada del laberinto de Barnes para ratones (Koopmans et al., 2003), con la diferencia de que el protocolo presentado aquí requiere de un solo ensayo de entrenamiento. En la versión modificada del laberinto Barnes los ratones pasan por una de las 12 entradas en un muro que rodea una arena iluminada. Tanto el laberinto de Barnes como la tarea que realizan los animales U tienen el beneficio de que no se deben usar fuertes estímulos aversivos o procedimientos de privación para que el animal responda. Por último se incluyó un grupo de animales N (Naïve) que no tiene ninguna experiencia con el contexto, estos animales se utilizaron como valor basal en los experimentos bioquímicos (Figura M&M.II.).

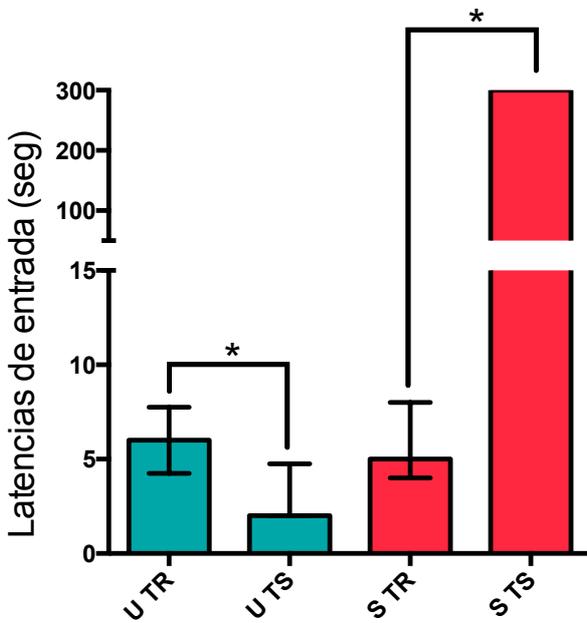
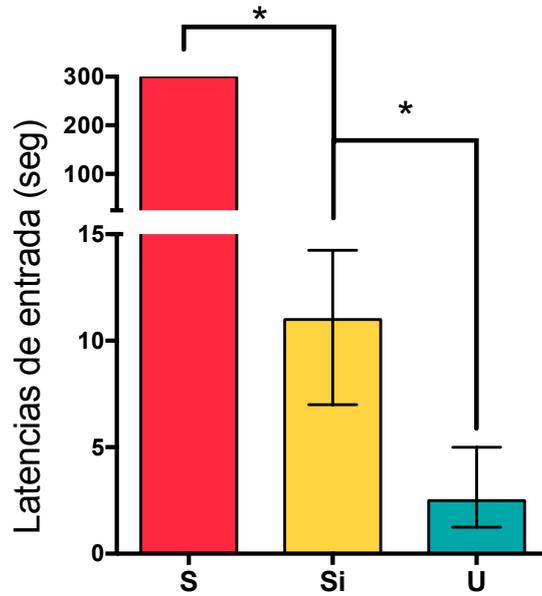
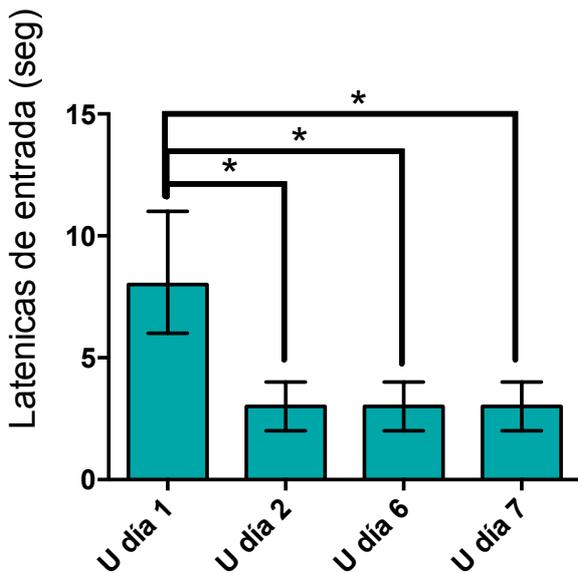
Teniendo en cuenta los tipos de aprendizaje previamente descritos se exploró la participación de NF-kappa B en tres áreas involucradas con la formación de estas memorias. Estas áreas fueron el hipocampo, la amígdala y el núcleo accumbens. En primer lugar se estudió el hipocampo dada su extensiva participación en procesos mnésicos y en particular por su requerimiento para la formación de memorias contextuales. Luego se estudió la vía de NF-kappa B en la amígdala y en el núcleo accumbens. Aunque existe bibliografía donde se describe la participación de ambos en la consolidación de memorias aversivas y apetitivas, tradicionalmente hay una mayor asociación de la amígdala como un centro de procesamiento de memorias de miedo y del núcleo accumbens como un núcleo de procesamiento de alivio y recompensa. Por este motivo se decidió estudiar la participación de NF-kappa B en la consolidación en cada una de estas áreas. Como control

se utilizó una cuarta área, la corteza somatosensorial primaria de la extremidad delantera ya que es un área que no estaría involucrada en procesos de consolidación (Boccia et al., 2007).

## a. Tanto animales S como U muestran retención 48 horas después de un entrenamiento

El primer experimento mostró que tanto los animales que recibieron el choque eléctrico al entrar al compartimiento oscuro (S, n=15) como los que no lo recibieron (U, n=16) cambiaron su respuesta comportamental en la sesión de evaluación (48 horas después del entrenamiento) con respecto a la sesión de entrenamiento (Wilcoxon  $W= 120$   $p<0.01$  S; Wilcoxon  $W= -101.0$   $p<0.01$  U vs. día de entrenamiento para cada grupo) (Figura I.I.A). Los cambios comportamentales observados para cada grupo difieren entre sí en el hecho de que las latencias de entrada al compartimiento oscuro durante la evaluación aumentaron para el grupo S, mientras que disminuyeron en los animales U. Durante la sesión de evaluación, los animales que recibieron el choque inmediato y no fueron colocados en la plataforma durante el entrenamiento (Si), mostraron latencias similares a las de los animales *naïve* (N) cuando se colocaron en la plataforma iluminada (Mediana = 11 s, n=8). En comparación con los animales Si, los animales del grupo S mostraron latencias significativamente mayores de entrada al compartimiento oscuro, lo que evidencia la retención de la memoria aversiva (Mann-Whitney  $U=0.0$ ;  $p<0.01$ ; Mediana = 300 s; n=8), mientras que los animales U mostraron latencias significativamente más cortas al entrar en el compartimiento oscuro (Mann Whitney  $U=0.0$ ;  $p<0.01$ ; Mediana=2,5 s; n=8) (Figura I.I.B). Este experimento muestra que mientras que los animales Si tienen latencias en el rango de animales *Naïve*, los animales S aprenden a evitar entrar en el compartimiento oscuro y los animales U aprenden a entrar aún más rápido que en el día de entrenamiento. Es

interesante notar que los animales U continúan mostrando latencias bajas de entrada cuando se ensayan durante seis días consecutivos, evidenciando que con una sola instancia de este entrenamiento se obtiene un desempeño cercano al máximo (ANOVA Estadístico de Friedman=21.86;  $p < 0.01$ ; Mediana para día de TR= 8 s; Mediana para día 1 = 3 s; Mediana para día 5 = 3 s; Mediana para día 6 = 3 s;  $n=20$ )(Figura I.I.C). Se considera que las diferencias Si y U en las latencias de entrada están limitadas por el efecto piso. Estos datos apoyan la idea de que ambos grupos de animales están formando memorias contextuales.

**A****B****C**

**Figura I.I. Tanto animales S como U muestran retención 48 horas después de un entrenamiento.**

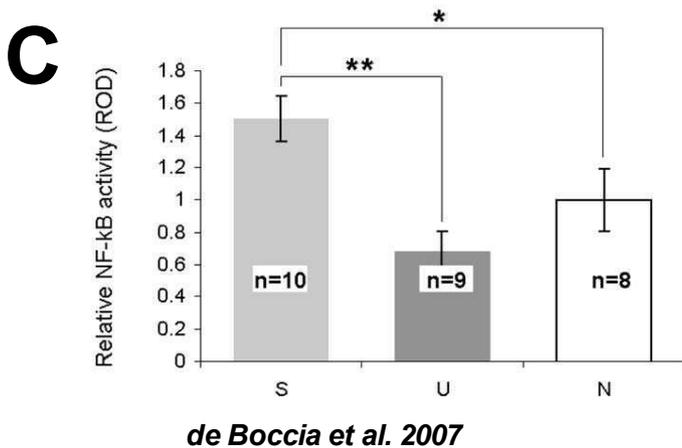
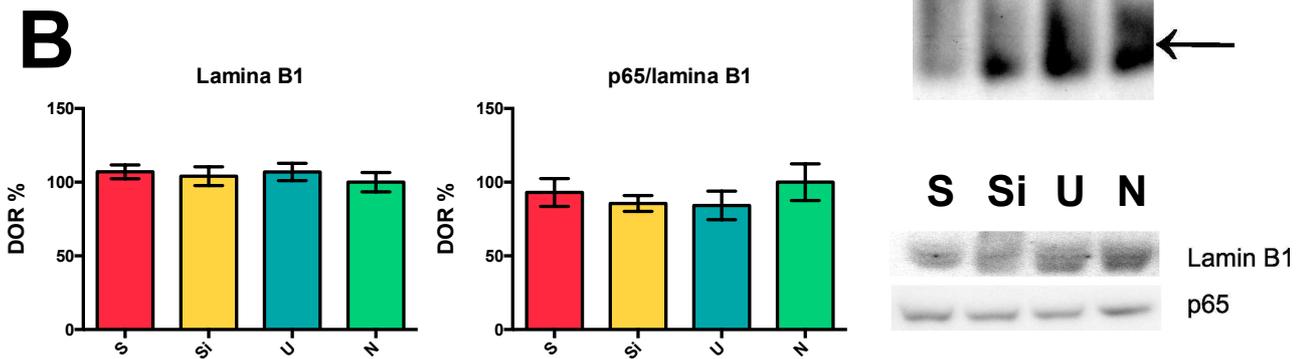
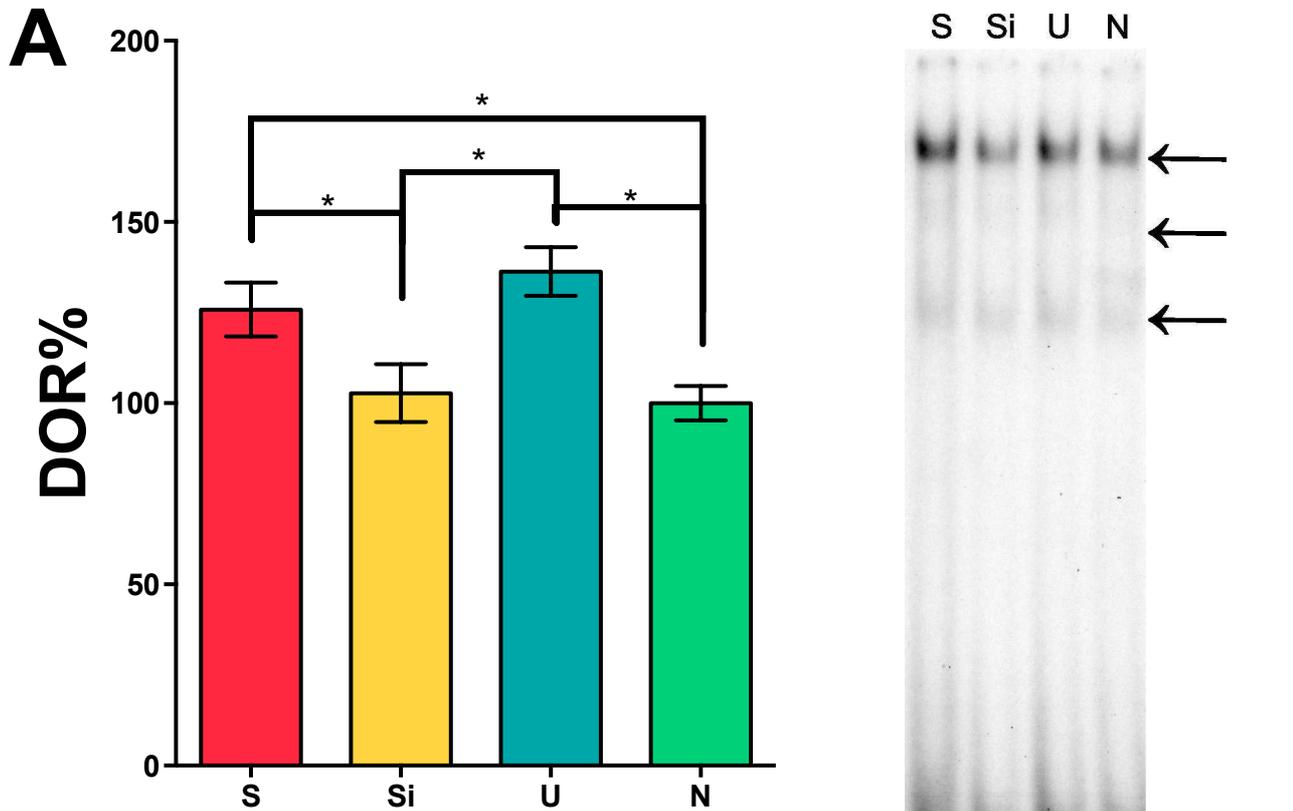
A) La retención se evidencia en los grupos S y U comparando las latencias de entrada al compartimiento oscuro durante el entrenamiento (TR) para los grupos U y S en comparación con las latencias de entrada para los mismos grupos de animales durante la evaluación. B) Latencias de entrada al compartimiento oscuro durante la sesión de evaluación para los grupos S, U y Si, las comparaciones estadísticas se hacen frente al grupo Si. C) Latencias de entrada de los animales U durante el entrenamiento (día 1) y días consecutivos de reexposición (días 2-7). Las barras muestran medianas con rangos intercuartiles.  $P < 0,01$ .

## b. Nf-kappa B se activa luego del entrenamiento tanto para animales S como para animales U pero no para animales Si

Los animales S y U presentan una activación nuclear de NF-kappa B en el hipocampo 45 minutos después del entrenamiento cuando se los compara con animales naive, según lo informado previamente por nuestro laboratorio (Freudenthal et al., 2005). Esta activación del factor de transcripción durante la ventana de consolidación está de acuerdo con los experimentos comportamentales mostrados en la sección anterior; donde ambos grupos S y U muestran retención de dos tareas diferentes aprendidas en un mismo entorno contextual. En el presente trabajo, el experimento para evaluar los niveles de activación de NF-kappa B en el núcleo de las células del hipocampo se controló incluyendo el grupo de animales Si y N. Se encontró que para el grupo Si, el factor de transcripción nuclear no se activa en el núcleo de las células del hipocampo 45 minutos después de recibir el choque eléctrico cuando se lo compara con el grupo N (ANOVA  $F(3,58) = 6.694$ ; LSD test MS = 726,34, df = 58,000; Media Si =  $102.8 \pm 7.997$  SEM, n= 15; Media N =  $100 \pm 4.765$  SEM, n=15). Tanto S y U mostraron la activación previamente descrita a los 45 minutos de la adquisición, durante la consolidación, en comparación con el grupo N y Si (ANOVA  $F(3, 58) = 6.694$ ; LSD test MS = 726,34, df = 58,000;  $p < 0.01$ ; Media S =  $125.8 \pm 7.402$  SEM, n= 16; Media U =  $136.3 \pm 6.702$  SEM, n=16) (Figura I.II.A). En la figura I.II.A, panel derecho, se muestra una sección de un EMSA representativo para cada grupo. El marcador nuclear Lamin B1 se usó como control de la cantidad de proteína de extracto nuclear en SDS-PAGE. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos, lo que indica que las diferencias observadas en la EMSA son específicas a los niveles de activación de NF-kappa B (Figura I.II.B panel izquierdo). La cantidad de la subunidad p65 en

el núcleo 45 minutos después del entrenamiento permanece constante dentro de los grupos con relación al Lamin B1 (Figura I.II.B panel central). Se muestran calles de *Western Blot* representativas para Lamin B1 y p65 (Figura I.II.B panel derecho). Este resultado apoya la idea de que los grupos S y U están consolidando la memoria formada por tarea de aprendizaje asociativo contextual donde NF-kappa B está jugando un papel crítico. Por el contrario, puesto que no se observó activación de NF-kappa B en el grupo Si, podríamos especular que este grupo podría no forma memorias asociativas de contexto dependiente del hipocampo.

Un antecedente que vale la pena mencionar es el experimento publicado en 2007 por nuestro laboratorio. En ese caso todos los animales fueron preexpuestos al contexto por 6 días consecutivos sin el choque eléctrico (ídem al entrenamiento apetitivo), como en el experimento de la figura I.I.C. En el séptimo día se dividió a los animales en dos grupos; un grupo recibió el mismo entrenamiento sin choque eléctrico (apetitivo) y el otro grupo recibió un choque eléctrico al entrar al compartimento (aversivo). En este experimento se ve que NF-kappa B nuclear solo se activa 45 minutos después de esta sesión en los animales que recibieron el choque eléctrico, comparando con animales *naïve*, y no en los animales que continuaron con el entrenamiento apetitivo (Figura I.II.C, Boccia et al., 2007). Esto apoya la idea de que solo los animales que están formando una nueva asociación al contexto presentan activación de NF-kappa B, en este caso el grupo con entrenamiento aversivo.



**Figura I.II. Actividad NF-kappa B en el hipocampo durante la consolidación de la memoria de tareas aversivas y apetitivas.**

A) El panel izquierdo muestra la densidad óptica relativa (DOR%) para la actividad de NF-kappa B 45 minutos después del entrenamiento para los animales S, Si, U y N relativos al grupo N. El panel derecho muestra una sección representativa de EMSA para todos los grupos. La flecha superior indica el complejo NF-kappa B, las flechas centrales indican otras bandas específicas y la flecha inferior indica la sonda libre.

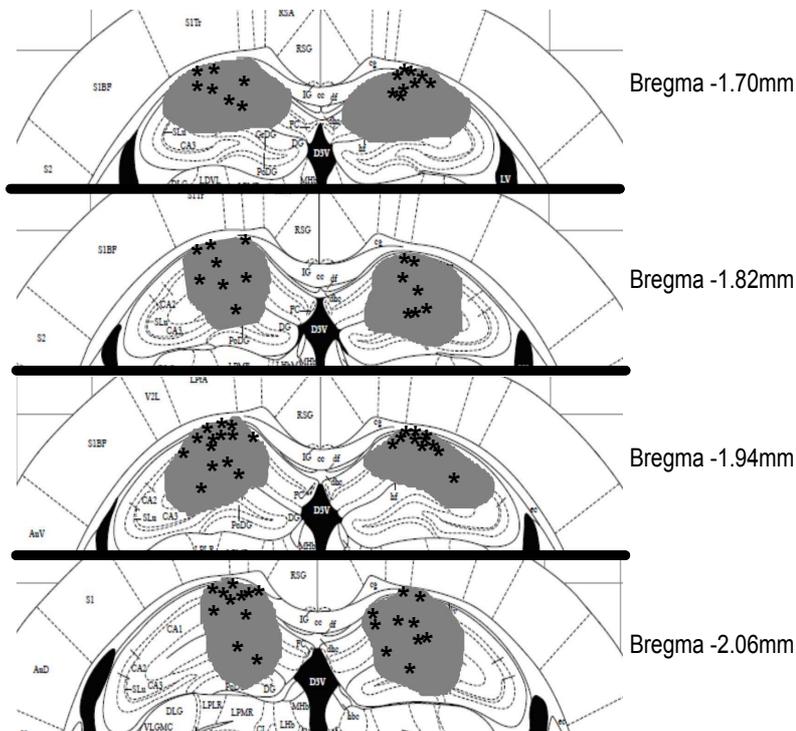
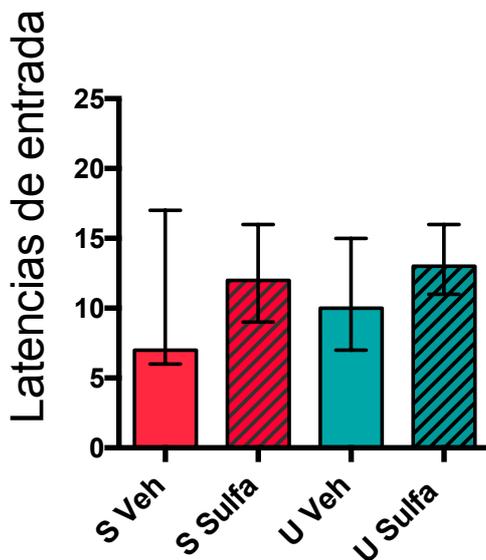
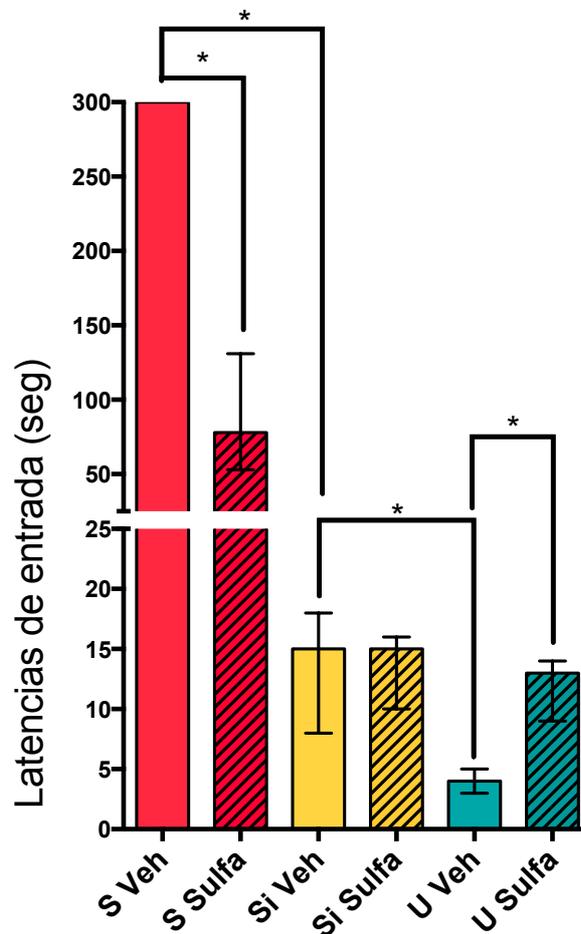
B) El panel izquierdo muestra DOR% de la cantidad de Lamina B1 para las mismas muestras utilizadas en A. El panel central muestra DOR% para la relación p65 / Lamina B1 para las mismas muestras. El panel derecho muestra secciones representativas de Western blot para todos los grupos. C) Figura de Boccia et al. 2007 donde se muestra la actividad de NF-kappa B en animales que han tenido 7 días de preexposición al contexto.

Las barras indican media  $\pm$  error estándar.  $P < 0,01$ .

### c. Inyecciones intra-hipocampales de Sulfasalazina son amnésicas para ambos grupos S y U

Como se reportó anteriormente por nuestro laboratorio NF-kappa B en el hipocampo no sólo se activa durante la consolidación de la memoria sino que también es necesaria para la misma (Freudenthal et al. 2005). Esto se evidencia utilizando el inhibidor de la vía de NF-kappa B, Sulfasalazina (SULFA), que permite evaluar los efectos comportamentales sobre la retención cuando la activación de NF-kappa B está impedida. Para comparar el papel de la vía de NF-kappa B en el hipocampo en los dos tipos de aprendizaje que se describieron anteriormente, utilizó este mismo inhibidor. Con este fin los animales fueron canulados bilateralmente en el hipocampo e inmediatamente después del entrenamiento, se inyectó DMSO puro (vehículo) o 1 µg/hipocampo de Sulfasalazina en solución de DMSO (Figura I.III.A). Los grupos de animales no mostraron diferencias en sus latencias de entrada al compartimiento oscuro durante el entrenamiento, antes de la inyección de fármaco o del vehículo (Figura I.III.B). Cuando se compararon solamente animales inyectados con vehículo, se observó el mismo patrón que se evidencia en la Figura I.I.A, los animales S Veh muestran mayores latencias que los animales Si Veh (Mann-Whitney U= 0.0;  $p < 0.01$ ; Mediana S Veh = 300 s,  $n=7$ ; Mediana Si Veh = 15 s,  $n=7$ ). Por otra parte los animales U Veh muestran latencias más bajas de entrada en comparación con los animales Si Veh (Mann-Whitney U=1.0;  $p < 0.01$ , Mediana Si Veh = 15,  $n=7$ ; Mediana U Veh = 4 s,  $n=7$ ). Esto evidencia la retención en ambos grupos S Veh y U Veh (Figura I.II.C). El grupo de animales Si inyectados con Sulfasalazina (Si Sulfa) no mostró diferencias significativas en las latencias de entrada durante la evaluación en comparación con los animales Si inyectados con vehículo (Si Veh) (Mann-Whitney U= 22.5;  $p=0.845$ , Mediana Si Veh = 15 s,  $n=7$ ; Mediana Si Sulfa = 15 s,  $n=7$ ). Como se ha descrito anteriormente en nuestro

laboratorio (Boccia et al., 2007), los animales S inyectados con sulfasalazina (S Sulfa) mostraron latencias más bajas que los animales S inyectados con vehículo (S Veh) (Mann-Whitney  $U = 0.0$ ;  $p < 0.01$ ; Mediana S Veh = 300 s,  $n = 7$ ; Mediana S Sulfa = 78 s,  $n = 7$ ). Esto demuestra que la Sulfasalazina inyectada intra-hipocampo post-entrenamiento afecta la consolidación de la memoria para los animales con el entrenamiento aversivo, grupo S (Figura I.III.C). Curiosamente, los animales del grupo U inyectados con sulfasalazina (U Sulfa) mostraron mayores latencias de entrada que los animales U inyectados con vehículo (U Veh) (Mann-Whitney  $U = 0.5$ ;  $p < 0.01$ ; Mediana U Veh = 4 s,  $n = 7$ ; Mediana U Sulfa = 13 s,  $n = 7$ ); lo que indica que Sulfasalazina está causando un deterioro de la memoria en los animales entrenados de manera apetitiva, grupo U (Figura I.III.C). Este experimento muestra que tanto los animales S como los U forman memorias dependientes del hipocampo que pueden ser afectadas por un inhibidor de la vía B de NF-kappa tal como lo es la Sulfasalazina. Por lo tanto, la vía NF-kappa B en el hipocampo es necesaria para la consolidación de memorias asociativas contextuales tanto para tareas aversivas (S) como apetitivas (U). Es importante notar que la expresión de la memoria para ambos grupos es opuesta ya que el entrenamiento produce mayores latencias para los animales con entrenamiento aversivo (S) y menores para los animales con entrenamiento apetitivo (U). De esta manera el comportamiento observado es opuesto en ambos grupos ya que en cualquier caso la Sulfasalazina revierte el efecto del entrenamiento, el grupo U Sulfa presenta mayores latencias que su contraparte inyectado con vehículo y el grupo S presenta menores latencias que el S Veh.

**A****B****C**

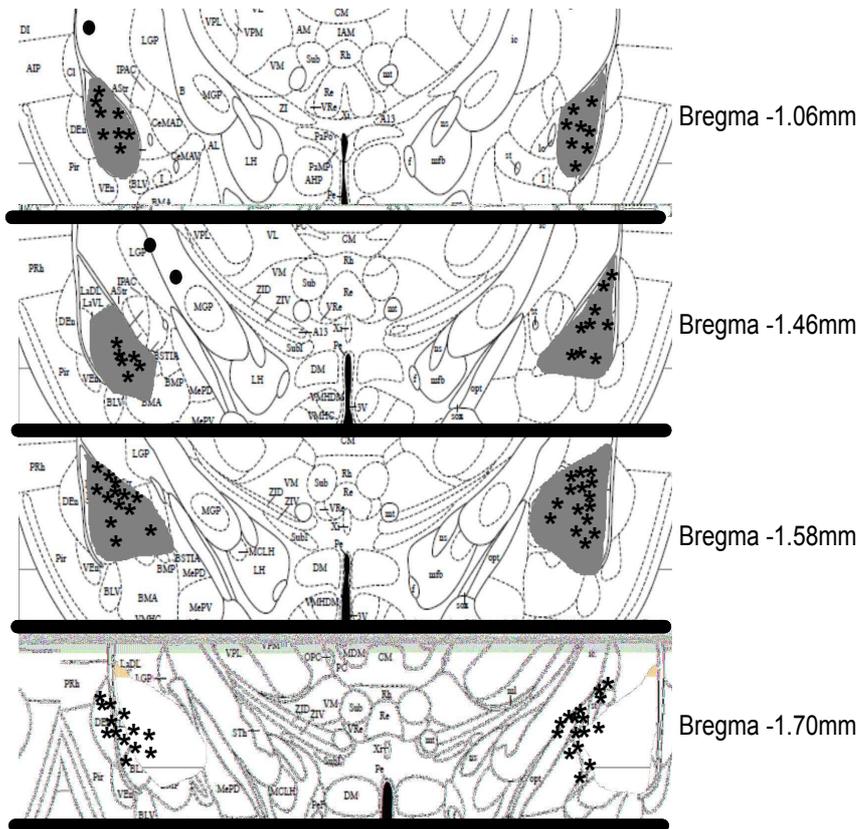
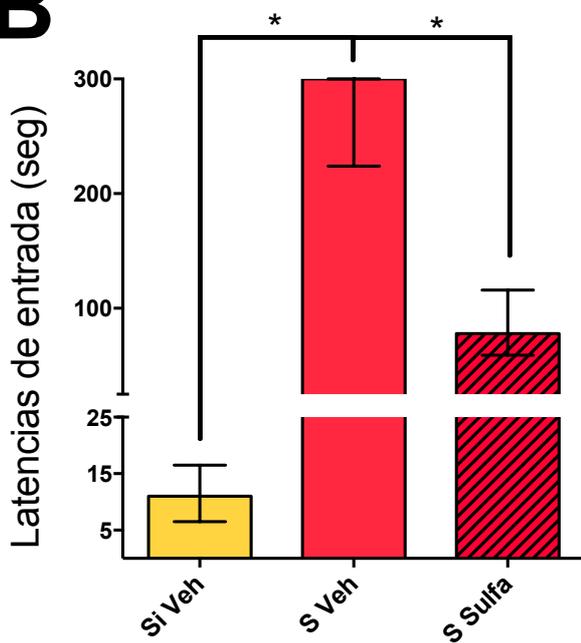
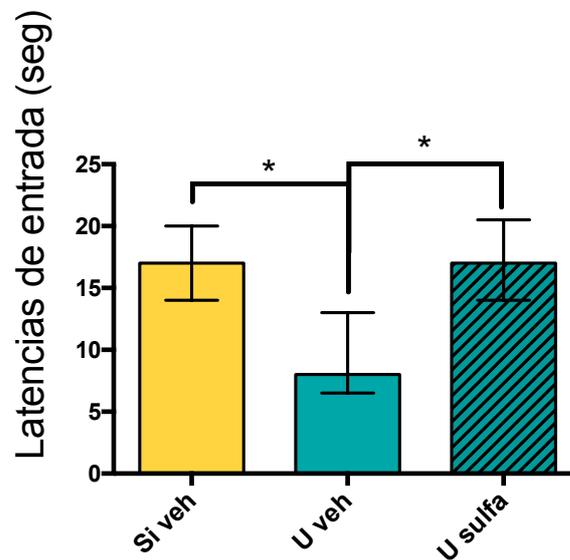
**Figura I.III. Las inyecciones intra-hipocampales de sulfasalazina son amnésicas para memorias aversivas y apetitivas.**

A) Se muestran las secciones del atlas de ratón a la distancia de Bregma correspondiente. El sombreado gris representa el área máxima alcanzada por las inyecciones. Los asteriscos indican la punta de la canula de inyección. B) Latencias de entrada al compartimiento oscuro durante el entrenamiento para animales en los grupos S y U antes de la inyección de Sulfasalazina (Sulfa) o Vehículo (Veh). C) Latencias de entrada durante la sesión de evaluación 48 horas después del entrenamiento de los grupos S, Si y U inyectados con Sulfa o Veh inmediatamente después de la adquisición. Las barras muestran medianas con rangos intercuartiles.  $P < 0,01$ .

#### d. Inyecciones intra-amygdala de Sulfasalazina son amnésicas para ambos grupos S y U

Para estudiar en profundidad los mecanismos implicados en la consolidación de memorias contextuales-asociativa tanto apetitivas como aversivas se eligió a la amígdala como un área de interés en estos procesos. La amígdala en la literatura tradicionalmente se asocia con un área involucrada en procesos de memoria de miedo, sin embargo artículos recientes implican a la misma también en el procesamiento de memorias de valencia positiva. Con este fin, todos los animales fueron canulados bilateralmente para llegar a la amígdala y se inyectó vehículo o 1 µg/Amygdala de sulfasalazina inmediatamente después del entrenamiento (Figura I.IV.A). Los animales Si inyectados con vehículo se utilizaron como grupo de control conductual. Los animales S Veh mostraron latencias más largas durante la evaluación comparando con el grupo Si Veh (Mann-Whitney U= 0.0;  $p < 0.01$ , Mediana Si Veh = 11 s, n=9; Mediana S Veh = 300 s, n=9) y esta retención se vio impedida en el grupo S Sulfa comparando con el grupo S Veh (Mann-Whitney U= 6.0;  $p < 0.01$ ; Mediana S Veh = 300 s, n=9; Mediana S Sulfa = 78 s, n=7) (Figura I.IV.B). La amígdala juega un papel central en la consolidación de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria (tarea aversiva), y este papel es dependiente de la vía B de NF-kappa. Para la versión sin shock de la tarea (versión apetitiva) la Sulfasalazina también afectó a las latencias de entrada de los animales entrenados. Los animales U Veh mostraron retención de la tarea apetitiva evidenciada por latencias más bajas que los animales Si Veh (Mann-Whitney U= 10.0;  $p < 0.01$ ; Mediana Si Veh = 17 s, n=11; Mediana U Veh = 8 s, n=9). Al igual que en la versión aversiva de la tarea, esta memoria también se vio impedida cuando los animales fueron inyectados con sulfasalazina. Los animales U Veh muestran latencias más bajas de entrada que los animales U Sulfa (Mann-Whitney U= 7.5;  $p < 0.01$ , Mediana U Veh = 8 s,

n=9; Mediana U Sulfa = 17 s, n=9) (Figura I.IV.C). En los ratones, la consolidación de la memoria tanto apetitiva como aversiva parece ser dependiente de la vía NF-kappa B de la amígdala. Esta evidencia apoya que la amígdala juega un papel central en la consolidación de la memoria independientemente de la valencia del estímulo. Y aún más, la activación de NF-kappa B en este área es necesaria para que ocurra la consolidación.

**A****B****C**

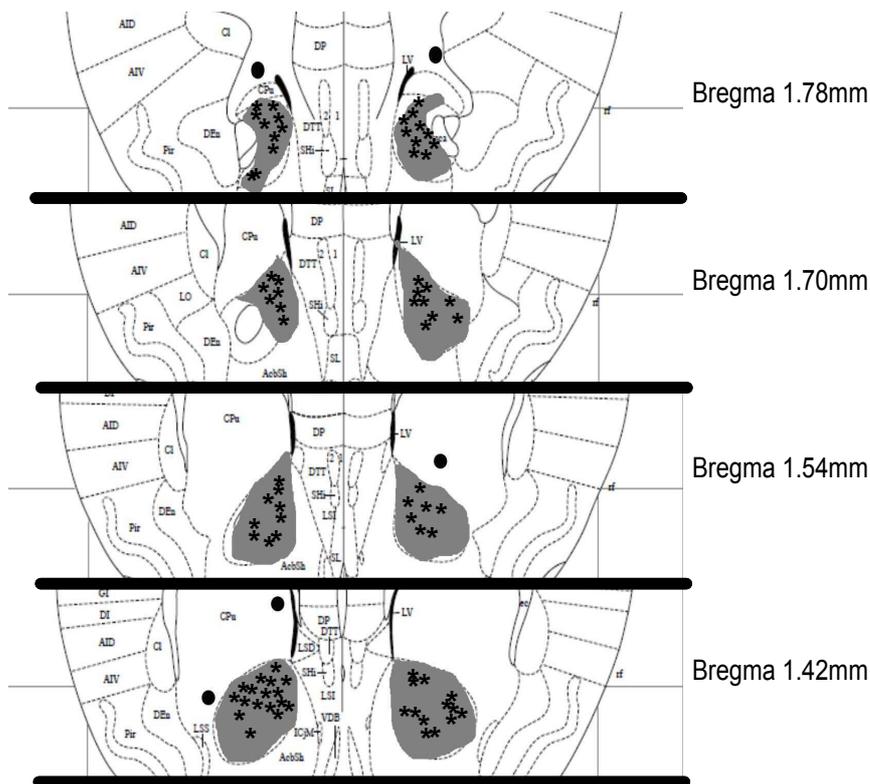
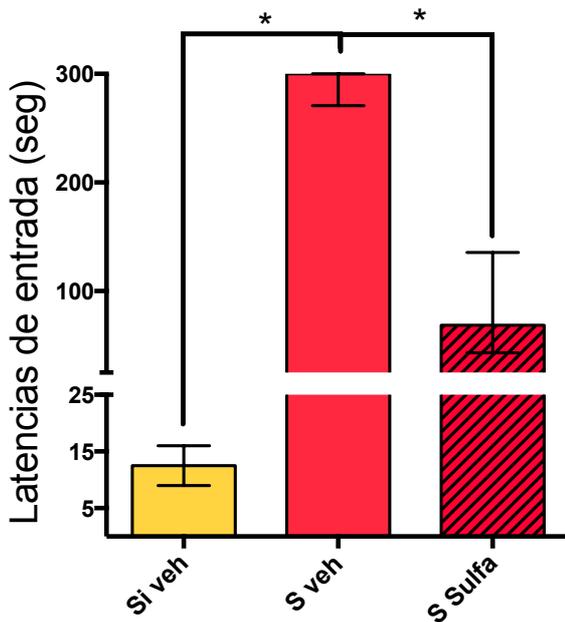
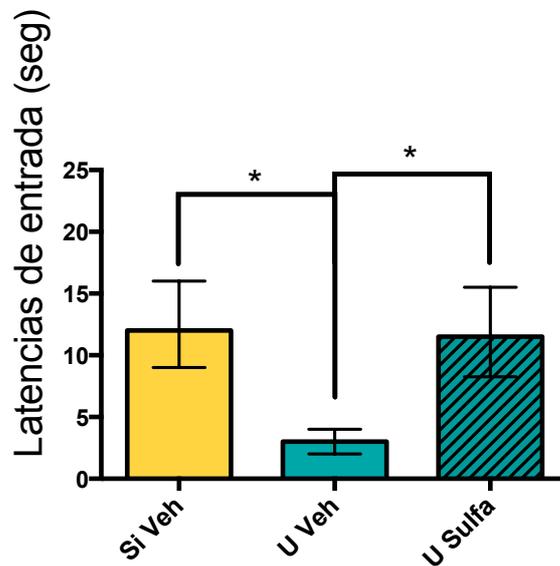
**Figura I.IV. Las inyecciones intra-amígdala de sulfasalazina son amnésicas para memorias aversivas y apetitivas.**

A) Se muestran las secciones del atlas de ratón a la distancia de Bregma correspondiente. El sombreado gris representa el área máxima alcanzada por las inyecciones. Los asteriscos indican la punta de la canula de inyección. Los puntos negros indican inyecciones que no alcanzaron el área objetivo; esos animales se descartaron del análisis. B) Latencias de entrada durante la evaluación para los grupos Si Veh, S Veh y S Sulfa. C) Latencias de entrada durante la evaluación para los grupos Si Veh, U Veh y U Sulfa. Las barras muestran medianas con rangos intercuartiles.  $P < 0,01$ .

## e. Inyecciones intra-núcleo accumbens de Sulfasalazina son amnésicas para ambos grupos S y U

En búsqueda de comprender qué áreas están implicadas en la formación de estas memorias de valencia opuestas decidimos estudiar el núcleo accumbens. El núcleo accumbens tiene un rol descrito en el procesamiento de memorias de alivio, pero al igual que la amígdala, hay una creciente bibliografía que describe una participación más general en memorias aversivas. Los animales fueron canulados bilateralmente para alcanzar el núcleo accumbens como se describe en la sección materiales y métodos y luego se inyectó 1 µg/nucleus accumbens de sulfasalazina o vehículo en cada lado inmediatamente después del entrenamiento (Figura I.V.A). Los animales S Veh mostraron latencias significativamente más altas que los animales Si Veh (Mann-Whitney U= 0.0;  $p < 0.01$ ; Mediana Si Veh = 12.5 s, n=10; Mediana S Veh = 300 s, n=10), lo cual nuevamente indica retención para el grupo entrenado con el choque eléctrico. Los animales S Sulfa mostraron latencias menores que los animales S Veh, sugiriendo un deterioro de la memoria por la inyección del fármaco en este área (Mann-Whitney U= 9.0;  $p < 0.01$ ; Mediana S Veh = 300 s, n=10; Mediana S Sulfa = 68.5 s, n=10) (Figura I.V.B). Este resultado implica que la vía NF-kappa B en el núcleo accumbens es necesaria para la consolidación en memorias aversivas a largo término. Por otra parte, se demostró que la vía NF-kappa B en el núcleo accumbens es también necesaria para la consolidación a largo plazo de las memorias apetitivas. Los animales U Veh mostraron latencias de entrada menores que los animales Si Veh (Mann-Whitney U= 1.0;  $p < 0.01$ ; Mediana U Veh = 3 s, n=7; Mediana Si Veh = 12 s, n=7), nuevamente evidenciando retención de la tarea apetitiva. Por otro lado los animales U Sulfa mostraron latencias mayores que los U Veh dado el impedimento de la memoria por parte de la droga (Mann-Whitney U=0.0;  $p < 0.01$ ; Mediana U Veh = 3 s, n=7; Mediana U Sulfa = 11.5 s, n=8)

(Figura I.V.C). Por lo tanto, la sulfasalazina impide la consolidación de la memoria de largo término tanto aversivas como apetitivas cuando se inyecta intra-núcleo accumbens. La vía NF-kappa B en el núcleo accumbens está involucrada en la consolidación de la memoria independientemente de la valencia del estímulo.

**A****B****C**

**Figura I.V. Intra-nucleo accumbens inyecciones de sulfasalazina son amnésicas para las memorias aversivas y apetitivas.**

A) Se muestran las secciones del atlas de ratón a la distancia de Bregma correspondiente. El sombreado gris representa el área máxima alcanzada por las inyecciones. Los asteriscos indican la punta de la canula de inyección. Los puntos negros indican inyecciones en animales que no alcanzaron el área diana y por lo tanto se descartaron del análisis. Los puntos negros indican inyecciones que no alcanzaron el área objetivo; esos animales se descartaron del análisis. B)

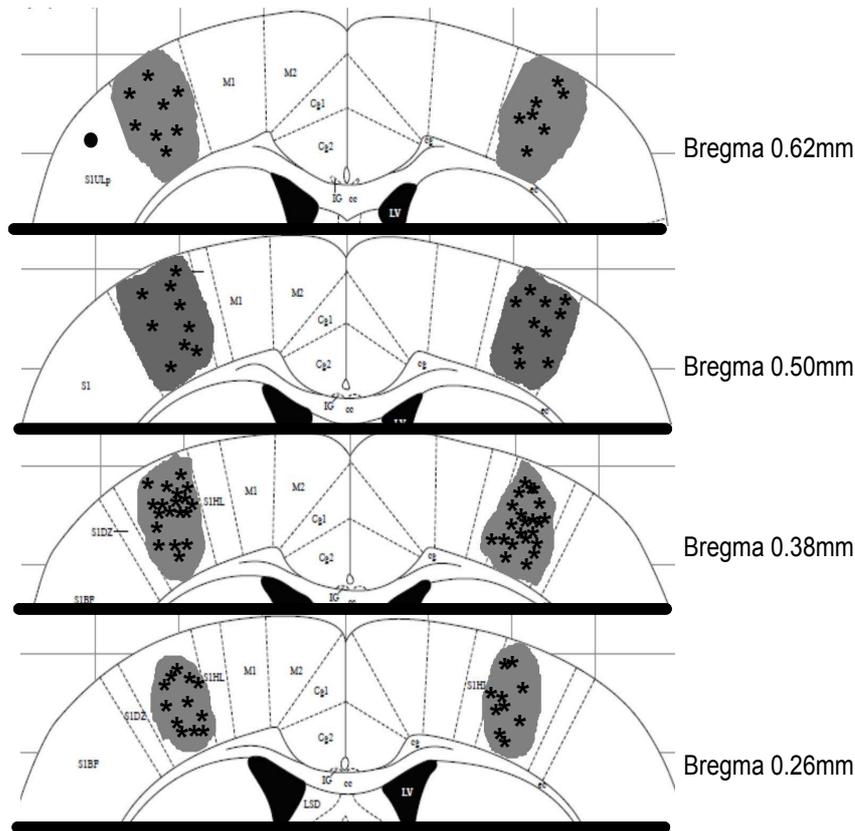
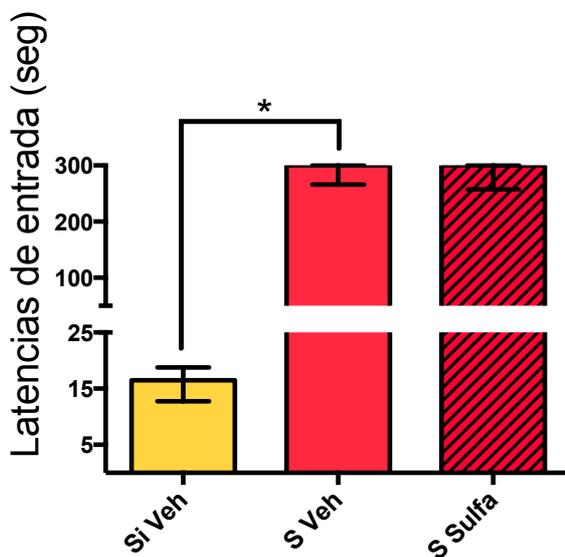
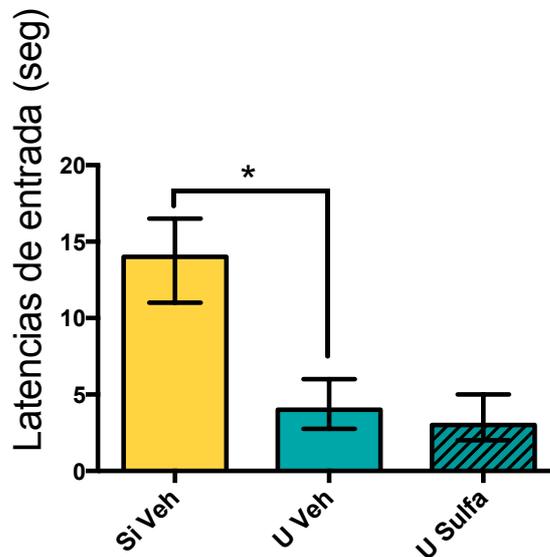
Latencias de entrada durante la evaluación para los grupos Si Veh, U Veh y S Sulfa. C) Latencias de entrada durante la evaluación para los grupos Si Veh, U Veh y U Sulfa.

Las barras muestran medianas con rangos intercuartiles.  $P < 0,01$ .

## f. La Sulfasalazina solo impide la memoria cuando es inyectada en áreas involucradas en la retención del entrenamiento

Dado el efecto de sulfasalazina en el hipocampo, amígdala y núcleo accumbens, se llevó a cabo un experimento para evaluar la especificidad de región de las inyecciones de la droga. Se eligió la corteza somatosensorial primaria, región de la extremidad anterior (S1FL) como un área que no se espera esté relacionada con la consolidación de la memoria de estas tareas. Los animales se canularon bilateralmente como se describe en la sección materiales y métodos, y se inyectó vehículo o sulfasalazina (1  $\mu\text{g}$ /corteza) (Figura I.VI.A). Los animales S Veh mostraron retención de memoria en comparación con los animales Si Veh (Mann-Whitney  $U=0.0$ ;  $p<0.01$ ; Mediana Si Veh = 16.5 s,  $n=8$ ; Mediana S Veh = 300 s,  $n=9$ ) y los animales del grupo S Sulfa no mostraron deterioro de la memoria en comparación con el grupo S Veh (Mann-Whitney  $U=35.0$ ;  $p=0.9294$ ; Mediana S Veh = 300 s,  $n=9$ ; Mediana S Sulfa = 300 s,  $n=8$ ) (Figura I.VI.B). Esto demuestra que para la tarea aversiva, la inyección de sulfasalazina en la corteza no afectaría la consolidación de la memoria. Los animales del grupo U Veh mostraron latencias menores de entrada en comparación con los animales Si Veh nuevamente evidenciando la retención de la tarea (Mann-Whitney  $U=2.0$ ;  $p<0.01$ ; Mediana Si Veh = 14 s,  $n=9$ ; Mediana U Veh = 4 s,  $n=10$ ). Los animales de U Sulfa mostraron latencias similares de entrada al compartimiento oscuro a las del grupo U Veh, lo que implica que no hubo ningún efecto de deterioro de la memoria por parte de la inyección de sulfasalazina en la corteza (Mann-Whitney  $U=36.5$ ;  $p=0.5081$ ; Mediana U Veh = 4 s,  $n=10$ ; Mediana U Sulfa = 3 s,  $n=9$ ) (Figura I.VI.C). Esto apoya la idea de que la inhibición de la vía de NF-kappa B afecta la retención de memoria sólo en áreas que son relevantes para la consolidación de las tareas de apetitivas y aversivas.

Los resultados presentados en este capítulo conllevan a la idea que la inhibición de NF-kappa B por la sulfasalazina inyectada en el hipocampo, amígdala o núcleo accumbens inmediatamente después del entrenamiento es capaz de impedir la retención en ambas versiones de entrenamiento. Estos resultados sugieren que NF-kappa B es un paso molecular crítico, en diferentes áreas del cerebro en la consolidación de la memoria. Estudios futuros apuntan a estudiar dentro de estas áreas como es la activación de la población neuronal durante una u otra tarea utilizando técnicas de inmunofluorescencia y electrofisiología.

**A****B****C**

**Figura I.VI. Inyecciones intra-S1FL de sulfasalazina no afectan a la memoria aversiva o apetitiva.**

A) Se muestran las secciones del atlas de ratón a la distancia de Bregma correspondiente. El sombreado gris representa el área máxima alcanzada por las inyecciones. Los asteriscos indican la punta de la canula de inyección. Los puntos negros indican inyecciones en animales que no alcanzaron el área diana y por lo tanto se descartaron del análisis. Los puntos negros indican inyecciones que no alcanzaron el área objetivo; esos animales se descartaron del análisis. B) Latencias de entrada durante la evaluación para los grupos Si Veh, S Veh y S Sulfa. C) Latencias de entrada durante la evaluación para los grupos Si Veh, U Veh y U Sulfa.

Las barras muestran medianas con rangos intercuartiles.  $P < 0,01$ .

# Discusión Capítulo I - NF-kappa B en memorias apetitivas y aversivas

## a. Tarea de aprendizaje contextual de un solo ensayo para el estudio del condicionamiento apetitivo y aversivo

Como se elaboró anteriormente en el presente trabajo, la tarea de evitación inhibitoria en ratón implica entrenar a un grupo de animales con un estímulo aversivo (un choque eléctrico, grupo S, *Shocked*) cuando estos entran a un compartimiento oscuro. Los ratones poseen tigmotaxia y fototaxia negativa lo que genera que estos entren al compartimiento oscuro voluntariamente, teniendo entonces este aprendizaje un componente operante. Clásicamente, se suele considerar al grupo entrenado a aquel que recibe el estímulo aversivo al entrar en el compartimiento oscuro, entrenando al ratón de esta manera a evitar el comportamiento natural. Se considera que el animal retuvo la memoria de este entrenamiento cuando en una sesión posterior de evaluación su respuesta comportamental de entrada al compartimiento oscuro se ve retardada o inhibida, es decir, el animal presenta mayores latencias de entrada. Por otra parte, un buen control experimental para dicho entrenamiento es animales que no reciben un choque eléctrico al entrar, grupo denominado U (*Un-shocked*). Estos animales poseen latencias de entrada al compartimiento oscuro durante la sesión de evaluación claramente menores a los animales S. Esto permite comparar las latencias durante la sesión de evaluación de los animales S con otros que experimentan el mismo contexto y realizan el mismo comportamiento operante pero sin recibir el estímulo aversivo.

El grupo U no está recibiendo una descarga eléctrica y por lo tanto no está generando una asociación entre el contexto y el refuerzo negativo. Sin embargo, en esta tesis por primera vez, se evidencia que de hecho se está formando una memoria contextual asociativa, pero la asociación es a un refuerzo positivo. Esta idea se basa en el valor que puede tener para el animal una respuesta comportamental desencadenada por la tigmotaxia y fototaxia negativa natural del animal. Los ratones tienden a moverse hacia las paredes y esquinas (tigmotaxia) y lejos de áreas iluminadas (fototaxia negativa). Estas son respuestas adaptativas para evitar depredadores o ambientes peligrosos (Bonsignore et al., 2008, Pompl et al., 1999). Teniendo en cuenta esta noción, la plataforma iluminada donde se coloca al animal durante el entrenamiento puede ser percibida por los ratones como una situación incómoda. A su vez, el compartimiento oscuro se presenta como un alivio de esta situación. Cuando el animal entra a este compartimiento oscuro pueden suceder dos cosas: a) el animal recibe un choque eléctrico que es lo suficientemente aversivo para hacer que el ratón evite repetir el comportamiento durante una sesión posterior de evaluación ya que el valor negativo de esta experiencia se coloca por encima de el valor positivo que ofrece la oscuridad del ambiente cerrado, o b) el animal no recibe ningún estímulo aversivo con lo cual el valor positivo del alivio tras la entrada al compartimiento oscuro queda intacto.

Por este motivo, este trabajo argumenta que ambos grupos S y U están formando memorias asociativas al contexto con estímulos de valencia opuesta. Por lo tanto se describe otro control que se considera necesario para la confirmación de la aseveración anterior. Este control fue descrito por el grupo de Michael Fanselow (Wiltgen et al. 2001) y se denomina Si (*Immediate Shock*). Este grupo consiste en animales que se colocan directamente en el interior del compartimiento oscuro desde la tapa superior del mismo y no tienen acceso a la plataforma iluminada. Apenas son depositados sobre la rejilla reciben inmediatamente un choque eléctrico, luego son rápidamente devueltos a su jaula de alojamiento. Estos animales no tienen experiencia con la plataforma iluminada y tampoco

realizan el comportamiento de entrada al compartimiento oscuro. Además, no tienen suficiente tiempo entre el reconocimiento del compartimiento oscuro y la descarga eléctrica para formar una asociación de este contexto con el estímulo. Por lo tanto, a pesar de que estos animales reciben un estímulo aversivo no forman una memoria contextual asociativa.

Se encontró que tanto los animales S y U muestran diferentes respuestas durante la sesión de evaluación en comparación con el entrenamiento, y que la respuesta de los animales S es comparable a las latencias durante la adquisición de los grupos S o U (Figura 1.1). Una característica interesante de este experimento es que la información contextual espacial percibida por todos los grupos durante la evaluación es la misma, sin embargo las asociaciones hechas durante el entrenamiento dan forma distinta a la respuesta comportamental: aumentando las latencias de entrada en animales de S y disminuyéndolas en animales del grupo U. Ya que la expresión de la memoria se puede definir como un cambio en el comportamiento a causa de una experiencia previa, se puede decir por lo tanto que ambos grupos S y U están mostrando retención durante la evaluación. Efectivamente esta retención evidenciada se debe al aprendizaje de dos tareas distintas, una con un componente aversivo y otra con un componente apetitivo. Pero sin embargo estas tareas comparten un mismo entorno contextual y un mismo requerimiento operante durante el entrenamiento. Además vale la pena recalcar que ambas tareas se adquieren y muestran retención de largo término con un solo ensayo. Estas características hacen de estas tareas herramientas ideales para el estudio comparativo del procesamiento de tareas y formación de la memoria de valencia opuesta.

## b. NF-kappa B en el hipocampo durante la consolidación de tareas aversivas y apetitivas

Se ha descrito que el hipocampo está implicado en memorias asociativas contextuales (Smith y Bulkin, 2014) y la dinámica de la activación de NF-kappa B durante la consolidación de memoria en este y otros paradigmas ha sido ampliamente reportada (Freudenthal et al., 2005; Salles et al. 2015, Zalcmán et al., 2015, de la Fuente et al., 2014, de la Fuente et al., 2015). Específicamente, se ha descrito que el factor de transcripción NF-kappa B es necesario para la consolidación de memoria en varias especies tales como cangrejos y ratones (Freudenthal et al., 2005, Freudenthal y Romano 2000). Nuestro laboratorio demostró que en la tarea de evitación inhibitoria en ratones, tanto los animales S como U presentan una activación nuclear hipocampal del factor de transcripción 45 minutos después del entrenamiento en comparación con los animales Naïve (Freudenthal et al., 2005). Esta activación del factor de transcripción durante la ventana de consolidación está de acuerdo con los experimentos comportamentales mostrados en la Figura I.I, donde tanto los animales S y U muestran la retención de dos tareas diferentes aprendidas en un mismo entorno contextual. En el presente trabajo se pudo volver a evidenciar este aumento en la activación del factor de transcripción para los animales de los grupos S y U y se incluyó en el estudio el grupo de animales Si. Se encontró que el factor de transcripción no se activa en el núcleo de las células del hipocampo 45 minutos después del entrenamiento en los extractos de animales del grupo Si en comparación con el grupo naïve (Figura I.II). Esto es esperable ya que como se elaboró anteriormente, a diferencia de los grupos S y U, los animales del grupo Si no están formando memorias asociativas dependientes del hipocampo. La cantidad de proteína de la subunidad p65 del factor de transcripción NF-kappa B permanece constante dentro de los grupos, lo que implica que las diferencias

observadas en los grupos S y U (Figura I.II.A) se deben a la activación del dímero de NF-kappa B y no a un aumento de la cantidad total de proteína p65. Los animales U mostraron latencias de entrada reducidas en el primer día de reexposición al contexto y estas continúan iguales en el séptimo día consecutivo de re-entrenamiento. Se ha publicado previamente que los animales U que son previamente expuestos al contexto durante 7 días consecutivos (como se hizo en el experimento de la Figura I.I.C) no presentan activación de NF-kappa B 45 minutos después del último día consecutivo de re-entrenamiento. Por otra parte, si los animales reciben una descarga eléctrica el día 7 de reexposición (y, por lo tanto, se forma una nueva asociación), muestran activación nuclear NF-kappa B 45 minutos después del entrenamiento (Figura I.II.C, Boccia et al., 2007). Estos resultados sugieren que para ambos grupos S y U, la activación de NF-kappa B en el hipocampo está involucrada en la consolidación de memorias asociativas contextuales. La falta de la activación de NF-kappa B 45 minutos luego del entrenamiento en el grupo S apoya aún más la idea de que este grupo no está formando una asociación contextual a la descarga eléctrica, mientras tanto S y U animales están formando memorias contextuales de valencia opuesta.

NF-kappa B en el hipocampo no sólo está implicado en la consolidación y reconsolidación de la memoria, sino que además se ha descrito que su activación es necesaria para que estos procesos ocurran correctamente (Boccia et al., 2007; Freudenthal et al., 2005). Sin embargo, el papel de NF-kappa B en el hipocampo para las memorias apetitivas en este tipo de contexto aún no se ha descrito en detalle. Por lo tanto, usamos inyecciones de sulfasalazina intra-hipocampo para estudiar la naturaleza de la memoria de alivio de los animales U y compararlo con el requerimiento de NF-kappa B para la memoria aversiva de los animales S. La sulfasalazina es un inhibidor de la kinasa IKK que fosforila a I $\kappa$ B, permitiendo que este libere al factor de transcripción y de este modo interfiriendo con su activación. Utilizando esta herramienta se ve que la vía de NF-kappa B en el hipocampo es necesaria tanto para las tareas contextuales aversivas como apetitivas (Figura I.III). Esto

no es un resultado inesperado ya que la información contextual recibida por ambos grupos es la misma, y como se expuso en la introducción, una de las funciones más relevantes del hipocampo es procesar esta información contextual. Los datos presentados en este trabajo demuestran que en el hipocampo, la vía NF-kappa B es necesaria para la consolidación de ambas memorias contextuales.

### c. Implicación de la vía de NF-kappa B en la amígdala y el núcleo accumbens durante la consolidación de tareas aversivas y apetitivas

Estas tareas contextuales que inicialmente, durante el entrenamiento, requieren la misma acción comportamental pero dan lugar a comportamientos opuestos durante la evaluación, permitieron el estudio de la implicación de NF-kappa B en el hipocampo durante la consolidación de memorias aversivas o apetitivas. Por este motivo se decidió utilizarlas para evaluar la participación de NF-kappa B en otras áreas del cerebro en la consolidación de dichas tareas.

La amígdala ha sido ampliamente sugerida como un área involucrada en el procesamiento del valor emocional de las memorias. Históricamente se la ha asociado principalmente con el procesamiento de recuerdos aversivos (Namburi et al., 2016; Hermans et al., 2014). De hecho, se sabe que NF-kappa B se activa en la amígdala durante la consolidación del condicionamiento de sobresalto en respuesta al miedo (Yeh et al., 2002). Sin embargo, existen informes recientes que sugieren un papel de esta área en el procesamiento de recuerdos apetitivos (Fernando et al., 2013). En este trabajo se muestra que tanto para los grupos U como S, la vía de NF-kappa B en la amígdala es necesaria para la consolidación de la memoria. Ambos aprendizajes requieren la funcionalidad de la vía de NF-kappa B en este área para ser consolidados y a su vez expresados posteriormente

durante la sesión de evaluación. La sulfasalazina tiene un efecto amnésico en los grupos S y U cuando es inyectada localmente en la amígdala inmediatamente luego del entrenamiento (Figura I.IV). Esto se suma a la evidencia de que la amígdala no sólo está involucrada en el procesamiento de recuerdos aversivos, sino que también está involucrada en el procesamiento de otros eventos biológicamente relevantes para el animal, aunque estos sean de valencia variada. El compartimento oscuro se convierte en un estímulo positivo para el animal, ya que proporciona un alivio de la plataforma iluminada (Niewalda et al., 2015; Pompl et al., 1999).

Por otra parte, el núcleo accumbens es un área ampliamente descrita como participante clave en formación de memorias apetitivas y de alivio (Namburi et al., 2016; Kahl y Fendt, 2016). A su vez, hay estudios que muestran el requisito de síntesis de proteínas durante estos procesos en el núcleo accumbens (Bruning et al., 2016). Sin embargo, existen algunos informes recientes que sugieren un papel de esta área en la formación de memorias aversivas (Martínez et al., 2008, Manago et al. 2008). Por lo tanto, se pensó que sería interesante estudiar ambas versiones de la tarea de inhibir la vía NF-kappa B en esta área. Curiosamente, nuestros resultados muestran que la consolidación de la memoria también depende de la vía de NF-kappa B en el núcleo accumbens tanto para la versión aversiva como para la versión apetitiva de la tarea (Figura I.V). Es interesante notar que mientras la situación de los animales del grupo U puede tener un componente de alivio durante el entrenamiento, la situación aversiva no posee tal componente. Los resultados de estos experimentos sugieren que el núcleo accumbens es necesario para ambos tipos de memorias, ya sea aversivas como apetitivas. Más aún, estos resultados también demuestran que la vía NF-kappa B en esta área es necesaria para la consolidación de la memoria en ambas tareas.

Teniendo en cuenta que cuando se inyectó sulfasalazina en distintas áreas del cerebro la misma resultó amnésica, fue importante descartar la posibilidad de un efecto

generalizado de la droga. Esta idea dio lugar al experimento para controlar que la inhibición de la vía NF-kappa B sólo afecta la consolidación de la memoria en las áreas involucradas en los procesos de memoria. Una inyección de Sulfasalazina en la región S1FL de la corteza somatosensorial (que no ha sido relacionada con procesos de consolidación de memoria, Boccia et al., 2007), no alteró la retención en animales S o U (Figura I.VI).

Todos los datos mostrados en el presente trabajo se suman a las evidencias que sugieren que áreas como el núcleo accumbens y la amígdala están involucrados en el procesamiento de memorias de diferente valencia. Estas tareas con los grupos S, U y Si surgen como un excelente modelo para el estudio comparativo de las vías y mecanismos involucrados en los procesos mnésicos de valencias opuestas. Si bien hay alguna evidencia de la participación de la vía NF-kappa B en la consolidación de memorias de miedo en la amígdala (Si et al., 2012), es la primera vez que se demuestra que esta vía es necesaria en esta área para la consolidación de una memoria de alivio. Aunque hay un estudio que encontró la vía NF-kappa B se activa durante la reactivación de la memoria de condicionamiento de preferencia de lugar en el núcleo accumbens (Ye et al., 2014), no ha habido estudios de la participación de la NF-Kappa B durante la consolidación de la memoria en esta área. Sin embargo, si se ha descrito que NF-kappa B está implicado en los cambios estructurales en el núcleo accumbens después del consumo crónico de cocaína (Russo et al., 2009). Por lo tanto, esta también es la primera vez que se describe la participación de la vía NF-kappa B durante la consolidación de la memoria en el núcleo accumbens. Se propone que estas mismas áreas cerebrales y la vía NF-kappa B están implicadas en la consolidación de las memorias de alivio y miedo en estas tareas. Se necesitan más estudios para encontrar los mecanismos de consolidación específicos que conducen a estos diferentes resultados comportamentales. Una idea que se propone es que esta información (la valencia del estímulo) se encuentra dentro de la identidad de la

población de neuronas en cada área involucrada en la consolidación de memorias de valencia diferente (Namburi et al., 2015), y no así del área en si misma.

# Resultados Capítulo II - NF-kappa B en la sinapsis

Dada la importancia de NF-kappa B en la memoria, es fundamental estudiar los mecanismos moleculares mediante los cuales el factor de transcripción ejerce su rol en la consolidación. En este y otros laboratorios se ha estudiado y se continúa estudiando en detalle los efectos río abajo de la activación de NF-kappa B perinuclear. Como se detalló en la introducción, la vía canónica de NF-kappa B implica la activación y translocación al núcleo del factor de transcripción y la subsiguiente elevación en la transcripción de genes blanco. Este mecanismo suele implicar al factor de transcripción que previo a la activación se encuentra localizado en el citoplasma perinuclear. Sin embargo ésta no es la única localización de NF-kappa B en el sistema nervioso. Desde el descubrimiento de la presencia de NF-kappa B en las sinapsis se ha especulado acerca de sus posibles funciones a nivel local. Varias evidencias apuntan a una actividad nuclear del factor de transcripción sináptico ya que se observó que luego de activado en las terminales, viaja retrógradamente hacia el soma (Wellmann et al., 2001; Meffert et al., 2003). Sin embargo, algunas circunstancias sugieren también un posible papel local del factor de transcripción sináptico. Experimentos en placa neuromuscular de *Drosophila* muestran que la presencia de NF-kappa B y su inhibidor IκB, en la post sinapsis, correlaciona con una mayor densidad de receptores glutamatérgicos. Esta regulación se da sin afectar la expresión del propio receptor (Heckscher et al., 2007), indicando que ésta es mediante una vía post transcripcional. Además, si la única función de la activación del factor de transcripción de localización sináptica fuera viajar al núcleo, se estaría perdiendo la información espacial que identifica a

cada sinapsis involucrada en el proceso de plasticidad. Parece entonces parsimonioso proponer una función de señalización sináptica para el factor de transcripción en la propia terminal en la que se activó.

En este capítulo se explora la localización sináptica de NF-kappa B, su dinámica de activación durante la consolidación de la memoria en ratón y los posibles mecanismos moleculares locales de transducción de señales que involucran a NF-kappa B durante éste proceso mnésico.

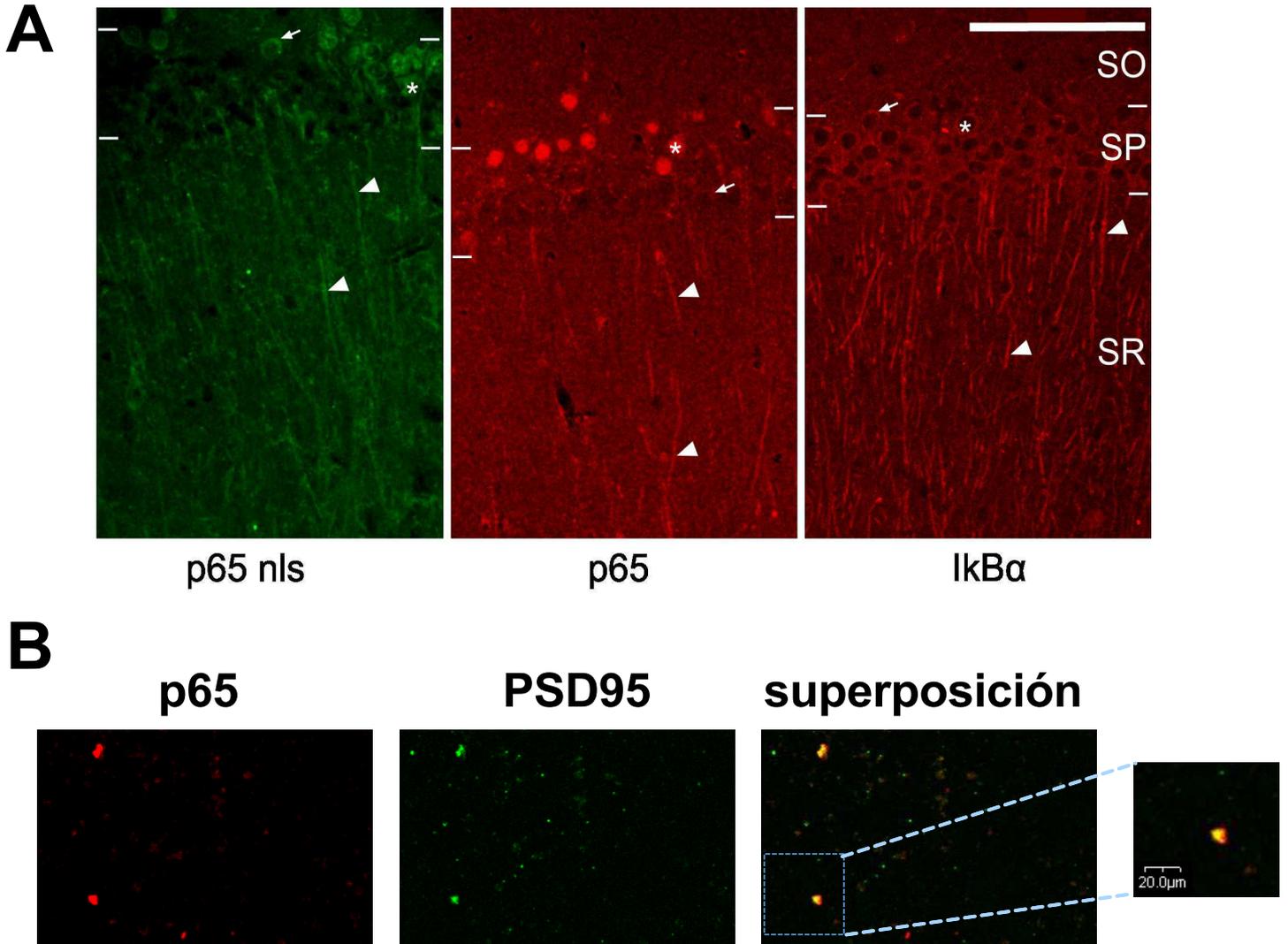
## a. NF-kappa B está presente en núcleo, citoplasma perinuclear, dendritas y sinaptosomas

Inicialmente, se realizó una inmunofluorescencia para detectar los componentes de la vía de NF-kappa B, p65 e IκB α, en hipocampo de ratón. Se usaron tres anticuerpos diferentes, uno para IκBα y dos para la subunidad p65 de NF-kappa B, uno de ellos para p65 total y el otro para p65 con el NLS expuesto (forma activada). La subunidad p65 e IκB mostraron una distribución somática y neuropilar en las dos partes principales del hipocampo: el giro dentado y el cuerno de Ammon.

La distribución subcelular de NF-kappa B es evidente en la disposición celular compacta de la capa de células piramidales CA1 del hipocampo, y su neuropilo adyacente, el *stratum radiatum* (Figura II.1.A). Esto mismo se evidencia en el giro dentado y CA3.

En CA1, p65 está presente en el núcleo, el citoplasma perinuclear y las dendritas, donde se detecta con anticuerpos para la proteína total y la forma de p65 que tiene su NLS expuesto. La mayor parte de la p65 visualizada está en estos tres compartimentos celulares, en proporciones variables para cada célula. IκBα se observa claramente en las dendritas del *stratum radiatum* y en el citoplasma perinuclear de las células del *stratum pyramidale*, su presencia en el núcleo es casi indetectable en animales naïve (Figura II.1.A).

A continuación se realizó una inmunofluorescencia de sinaptosomas para corroborar la presencia de NF-kappa B en la sinapsis. Se estudió la correlación de p65 con la proteína de andamiaje post-sináptico PSD95. Se utilizó el coeficiente de Pearsons y de Manders para medir el grado de relación entre p65 y PSD95 se pudo confirmar significativamente la presencia de NF-kappa B en los sinaptosomas (Pearsons p65-PDS95 = 0.51; Pearsons control = 0.0017; Coeficiencte de Manders, fracción de p65 solapado con PSD95 M1= 0.61; fracción de PSD95 solapado con p65 M2= 0.50) (Figura II.I.B).



**Figura II.I. Localización y caracterización neuronal de NF-kappa B.**

A) La inmunofluorescencia de cortes coronales muestra el área CA1 del hipocampo marcada con los anticuerpos para p65 nls, p65 total e Ikbα (izquierda, centro y derecha). Las flechas indican el citoplasma perinuclear, las puntas de flecha indican la ubicación en las dendritas y el asterisco indica el núcleo. Las diferentes capas se marcan para cada panel, *stratum oriens* (SO), *stratum pyramidale* (SP), *stratum radiatum* (SR), White bar represents 200μm. B) Inmunofluorescencia de sinaptosomas marcados con anticuerpos para p65 y PSD95 (izquierda y centro) y la superposición de las imágenes (derecha). En el recuadro se puede ver una ampliación de la imagen donde se evidencia la colocalización de p65 con PSD95.

## b. NF-kappa B en la sinapsis está presente el sinaptoplasma y en la membrana

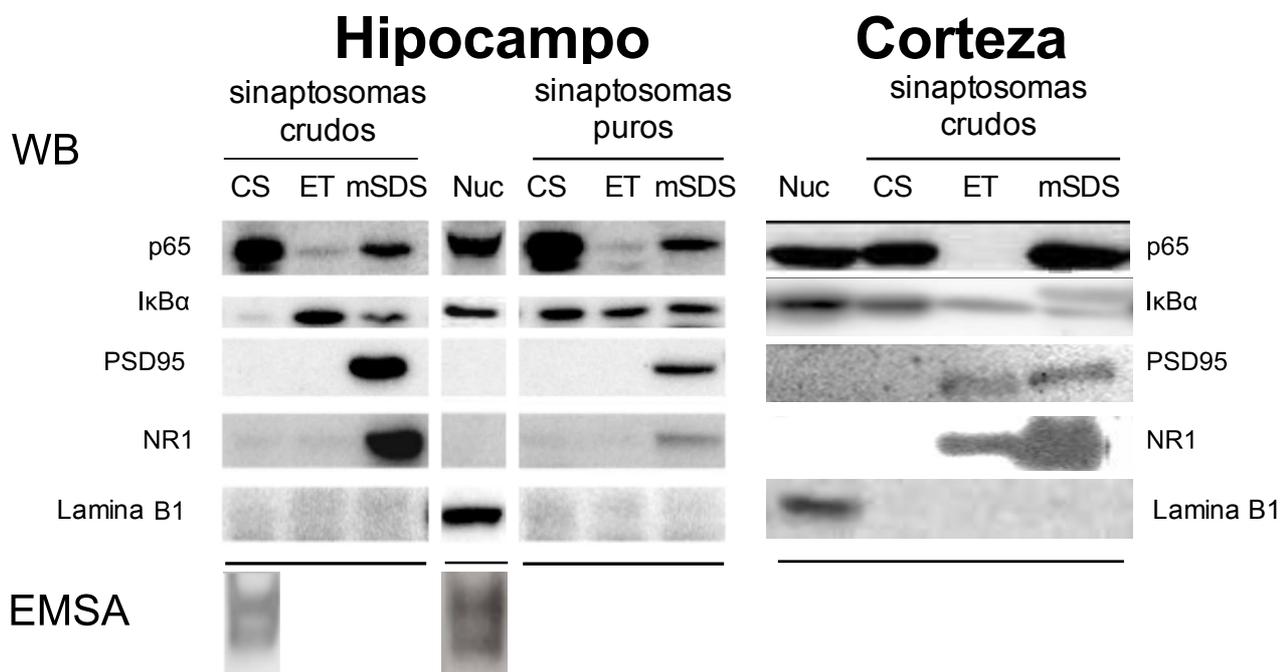
La localización subcelular de NF-kappa B observada en los estudios de inmunofluorescencia se corroboró por los resultados de *Western Blot* (WB). La presencia nuclear de p65 e Ikb $\alpha$  se detecta claramente, y Lamin B1 confirma el origen del extracto (Figura II.II). Se evidencian claramente dos localizaciones de p65 en los sinaptosomas; una localización de p65 soluble encontrado en el contenido sinaptosomal (CS) y otra distinta que se encuentra fuertemente ligado a las membranas. La proteína p65 se encuentra en el extracto de membranas tratadas con SDS (SDSm), que también muestran la presencia de los marcadores de membrana sináptica PSD95 y la subunidad del receptor de NMDA, NR1. Casi no se detecta p65 en el extracto de las membranas tratadas con el detergente suave tritón (ET), no obstante Ikb es claramente visible en este extracto (Figura II.II). Este patrón de distribución se encuentra tanto en el hipocampo como en extractos de corteza.

El método de purificación con gradiente discontinuo de percoll es una etapa de purificación adicional en el protocolo de preparación de sinaptosomas que produce sinaptosomas más puros que los sinaptosomas crudos (P2). Los extractos obtenidos de sinaptosomas crudos (P2) y los de los sinaptosomas purificados muestran una distribución similar para p65, Ikb $\alpha$  y los marcadores de membrana sináptica PSD-95 y NR1(Figura II.II).

En el núcleo y en extractos de contenido sinaptosomal, la actividad de unión a ADN de NF-kappa B puede ser evidenciada por EMSA (Figura II.II). Esto apoya los resultados vistos en la (Figura II.I). con el anticuerpo p65 NLS, lo que confirma la presencia de la forma activada de NF-kappa B en estos mismos sitios. Las fracciones sinaptosomales (CS, ET, SDSm) se extraen secuencialmente de cada preparación de sinaptosomas (extractos

crudos o purificados con percoll) y, por tanto, cada serie de fracciones procede de un animal diferente.

De esta sección se pueden resumir los dos siguientes puntos: en primer lugar, NF-kappa B se encuentra libre en el contenido sinaptosomal y fuertemente ligado a las membranas sinápticas tanto en el hipocampo y la corteza. En segundo lugar, los extractos crudos muestran una distribución de proteínas similar a la de los sinaptosomas purificados percoll, lo que permitió utilizar este protocolo más rápido para los experimentos destinados a evaluar la dinámica de NF-kappa B durante la consolidación de la memoria.



**Figura II.II. Western blot de fracciones sinaptosomales.**

Western blots (WB) de hipocampo (panel izquierdo) y corteza (panel derecho) para extractos de núcleo (Nuc), contenido sinaptosomal (CS), extracto de Triton (ET) y membranas extraídas con SDS (mSDS). Estos tres últimos tanto de preparaciones de sinaptosomas puros (sinaptosomas obtenidos con gradiente de percoll) y crudos (P2). Los anticuerpos utilizados fueron el componente NF-kappa B (p65), el inhibidor de NF-kappa B (IκBα), el marcador de densidad post-sináptica (PSD-95), el marcador de densidad post-sináptica (NMDA NR1) y el marcador nuclear (Lamina B1). El subrayado representa la misma extracción de tejido. Una ejemplo de EMSAs muestra la presencia de actividad de NF-kappa B en el núcleo y en el contenido sinaptosomal.

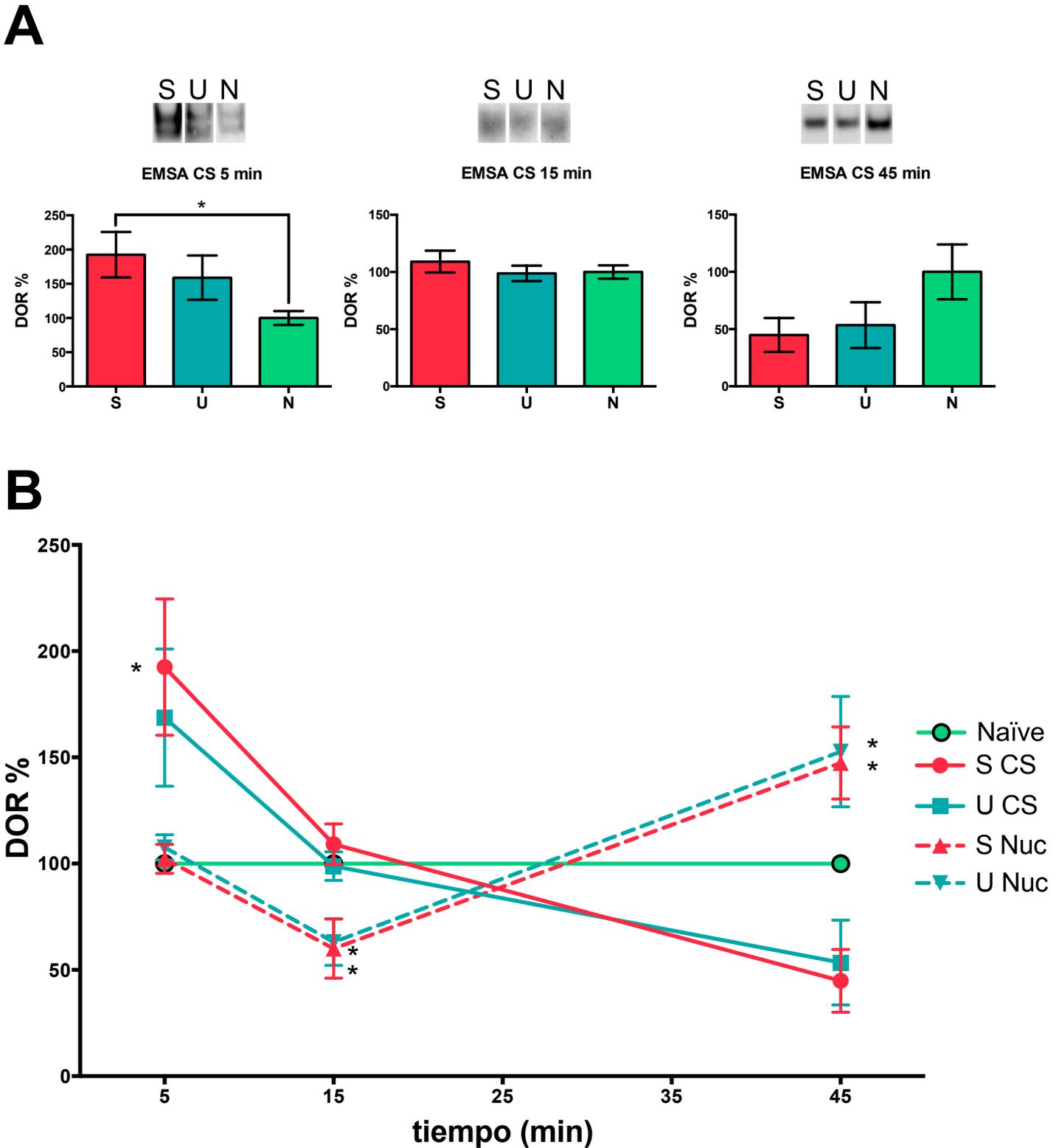
### c. La activación de NF-kappa B sinaptosomal ocurre a un tiempo distinto que la activación nuclear

Una vez determinada la presencia de NF-kappa B en los sinaptosomas, y con el objetivo de comprender un posible rol local, se estudió la dinámica de activación durante la consolidación. Como se describió en el capítulo anterior, se puede utilizar el entorno contextual de la tarea de evitación inhibitoria para una tarea apetitiva (U) y una tarea aversiva (S). Teniendo en cuenta la dinámica de activación nuclear de NF-kappa B descrita previamente en el laboratorio (Freudenthal et al., 2005) se diseñó este experimento para estudiar el curso temporal de la activación sináptica de NF-kappa B para ambas tareas.

Para evaluar la dinámica de activación de NF-kappa B en la sinapsis se utilizaron tres grupos de animales descritos anteriormente S, U y N. Brevemente, los animales S recibieron una descarga eléctrica cuando entraron en el compartimiento oscuro desde la plataforma, los animales U no recibieron la descarga eléctrica al entrar al compartimiento oscuro y por último el grupo N de animales *naïve*.

El extracto de CS del hipocampo se extrajo 5, 15 y 45 minutos después del entrenamiento y la actividad de unión al ADN fue ensayada por EMSA. Cinco minutos después del entrenamiento hay un incremento significativo en la actividad de unión a ADN de NF-kappa B en los ratones S (ANOVA  $F(2, 41) = 3.274$ ; LSD test  $MS = 10118$ ,  $df = 41,000$ ;  $S = 192,5\%$ ,  $n=14$ ,  $p < 0,05$ ,  $N, n=16$ ) cuando se compara con los ratones N (Figura II.III.A, panel izquierdo). Se observa una tendencia leve en la misma dirección para los animales del grupo U, aunque no se ve significancia estadística ( $U = 159\%$ ,  $n=14$ ,  $p=0,22$ ). No se observó diferencia significativa 15 minutos después del entrenamiento dentro de los grupos experimentales (Figura II.III.A, panel central  $S, n=10, U, n=10, N, n= 10$ ). Existe una tendencia decreciente para la actividad de unión al ADN de NF-kappa B tanto para ratones

S como U 45 minutos después del entrenamiento aunque no es estadísticamente significativa (S= 44,85%, n=5, p=0.137; U= 53,5%, n=5, p=0.133, N, n= 5; Figura II.III.A, panel derecho). Teniendo en cuenta la activación de NF-kappa B a las 5 minutos en la sinapsis se estudió este mismo tiempo en extractos nucleares. No se encontraron diferencias significativas entre grupos en extractos nucleares a las 5 minutos después del entrenamiento. La Figura II.III.B compara la actividad de unión a ADN de NF-kappa B en extractos nucleares (5 minutos visto en este trabajo y 15 y 45 minutos publicados en Freudenthal et al., 2005) y en extractos CS. La activación sinaptosomal de NF-kappa B ocurre 5 minutos después del entrenamiento mientras que la activación nuclear de NF-kappa B ocurre primero a los 45 minutos después del entrenamiento con una inhibición previa a los 15 minutos después del entrenamiento. Esto indica una diferente cinética temporal de activación de la vía de NF-kappa B en estas localizaciones subcelulares; una 5 minutos después del entrenamiento en la sinapsis, visto en este estudio, y otros 45 minutos después del entrenamiento en el núcleo (Freudenthal et al., 2005).



**Figura II.III. Actividad de unión al ADN de NF-kappa B durante la consolidación.**

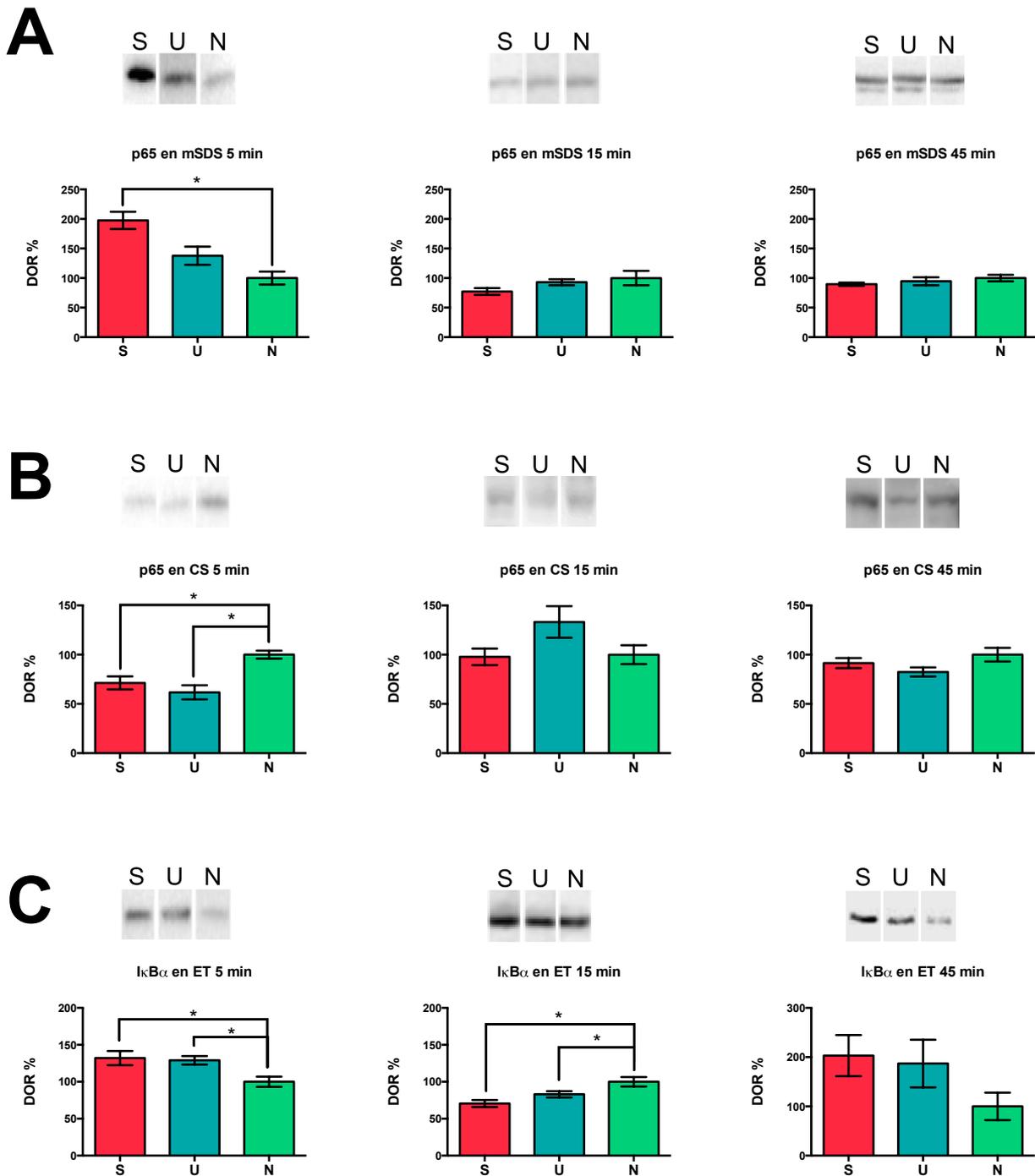
A) Los gráficos de barras muestran la densidad óptica relativa (DOR%) representando la actividad de unión al ADN de NF-kappa B en el contenido sinaptosomal (CS) con respecto a los ratones naïve (N) a los 5 (izquierda), 15 (centro) y 45 (derecha) minutos después del entrenamiento. Los recuadros muestran EMSA representativos para cada momento y grupo. B) Curva temporal de la actividad de NF-kappa B en contenido sinaptosomal y extractos nucleares (Nuc), con respecto a N. Se muestran medias con error estándar. \*  $P < 0,05$ .

#### d. Los componentes de la vía de NF-kappa B translocan a membrana después de un entrenamiento de evitación inhibitoria

Con el fin de profundizar en el estudio del rol local de NF-kappa B durante la consolidación de la memoria y dada la distribución de NF-kappa B dentro del sinaptosoma en dos localizaciones diferentes (libre en el sinaptoplasma y fuertemente unido a membrana), se realizaron ensayos de WB de las distintas fracciones obtenidas a distintos tiempos durante la consolidación de la memoria.

Los cambios en la distribución de NF-kappa B sináptico durante la consolidación de la memoria se estudiaron mediante análisis de WB de extractos sinaptosomas de hipocampo para los tres grupos (S, U y N). Las cantidades de p65 en CS son significativamente más bajas 5 minutos después del entrenamiento para ratones S y U en comparación con los animales N (ANOVA general  $p < 0,001$ ,  $F(2, 37) = 11.11$ ,  $df = 37$ ; LSD test;  $MS = 486,08$ ,  $df = 37,000$ ;  $S = 71,3\%$ ,  $n=13$   $p < 0,01$ ;  $U = 61,7\%$   $n=13$ ,  $p < 0,01$ ;  $N$ ,  $n=14$ ). No se encontraron diferencias entre los grupos para p65 en este extracto a los 15 y 45 min después de la adquisición (Figura II.IV.A). Hay un aumento significativo de p65 en la fracción SDSm 5 minutos después del entrenamiento para ratones S cuando se compara con el grupo N (ANOVA general  $p < 0,01$ ,  $F(2, 43) = 12.83$ ; LSD test;  $MS = 2939,1$ ,  $df = 43,000$ ;  $S = 197,6\%$ ,  $n=15$ ,  $p < 0,01$ ;  $N$ ,  $n=15$ ). Aunque no es estadísticamente significativa, se observa una tendencia similar para el grupo U ( $U = 137,7\%$ ,  $n=15$ ,  $p=0,06$ ). No se observó ninguna diferencia entre los grupos en la cantidad de p65 en SDSm a los 15 y 45 minutos después de la adquisición (Figura II.IV.B). La cantidad de Ikb $\alpha$  obtenida en ET aumenta en las muestras de los ratones de los grupos S y U a los 5 minutos después del entrenamiento (ANOVA general  $F(2, 42) = 5.297$ ; LSD test;  $MS = 852,13$ ,  $df = 42,000$ ;  $S =$

132%, n=15, p <0,05; U = 129%, n=15, p <0,05; N, n=14). A los 15 minutos post-entrenamiento, I $\kappa$ B $\alpha$  disminuye significativamente en los grupos de ratones S y U en comparación con N (ANOVA general p <0,01, F (2, 27) = 7.912; LSD test; MS = 276,67, df = 27,000; S = 70,5%, n= 10, p <0,01; U = 83%, n=10, p <0,05; N, n=10). A los 45 minutos luego del entrenamiento no hay diferencia significativa entre grupos para los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  (Figura II.IV.C). Estos resultados sugieren que NF-kappa B sináptico es dinámico y cambia su localización durante la consolidación, pasando del sinaptoplasma a las membranas.



**Figura II.IV. Dinámica de los componentes de la vía de NF-kappa B sinaptosomal durante la consolidación de la memoria.**

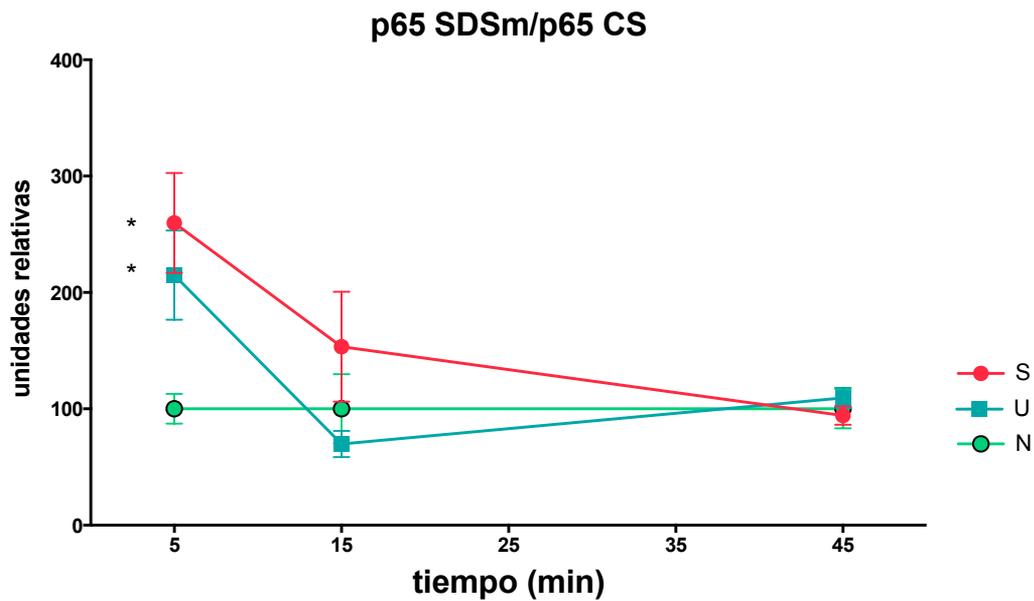
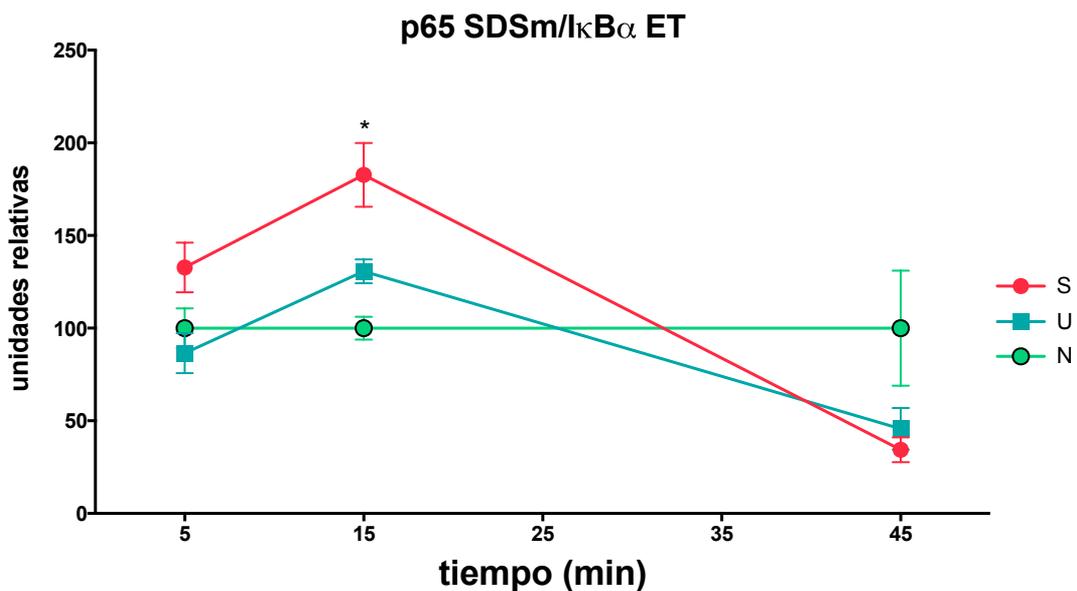
Cantidad de p65 en A) contenido sinaptosomal (CS) y B) membranas tratadas con SDS (mSDS) y C) IκBα en extractos de tritón (ET), para animales con choque (S), sin choque (U) y naïve (N) 5, 15 y 45 minutos después del entrenamiento (izquierda, centro y derecha en consecuencia). Los recuadros muestran bandas representativas para cada extracto. Las barras son media con error estándar. \* P < 0,05.

## e. La relación en membrana de los componentes de NF-kappa B cambia luego de un entrenamiento

Una manera de evidenciar los cambios ocurridos en la sinapsis durante la consolidación es estudiar la relación entre los componentes de la vía del factor de transcripción en los tiempos estudiados. La cantidad de p65 asociado a membranas (p65 SDSm) en relación con la cantidad de p65 soluble (p65 CS) es mayor para los animales S y U cuando se compara con los ratones N a los 5 minutos después del entrenamiento (ANOVA general  $p < 0,01$ ,  $F = 6,05626$ ; S = 259%,  $n=13$ ,  $p < 0,01$ ; U = 214%,  $n=13$ ,  $p < 0,05$ ; N,  $n=16$ ) (Figura II.V.A). Esta relación regresa a niveles similares a los del grupo N a los 15 minutos después del entrenamiento. Este resultado es el que los grupos S y U tienen una dinámica similar de NF-kappa B concuerda con los resultados del capítulo anterior donde ambos grupos establecen memorias asociativas al contexto y también se condicen con los resultados observados en la Figura II.III y en Freudenthal et al., 2005. La relación sugiere que p65 de membrana aumenta a expensas del p65 soluble. La relación de p65 de membrana e I $\kappa$ B $\alpha$  obtenida en ET es mayor 15 minutos después del entrenamiento para ratones S comparado con animales N y existe la misma tendencia para U (ANOVA general  $p < 0,01$ ,  $F = 13,9220$ , S = 182%,  $n=10$ ,  $p < 0,01$ ; U = 130%,  $n=10$ ,  $p=0,06$ ; N,  $n=10$ ) (Figura II.V.B). Esta relación no es significativamente diferente a los 5 y 45 minutos después del entrenamiento. Este resultado, sumado a los datos de activación obtenidos por EMSA, sugiere que la activación de NF-kappa B asociado a membrana es diferente de la nuclear (interpretando la unión al ADN como un cambio en p65/I $\kappa$ B) y posterior al cambio observado en el contenido sinaptosomal.

La dinámica sináptica de NF-kappa B, diferente a la nuclear, y los cambios de localización en la misma observados en los resultados aquí descritos, sugieren que

NF-kappa B en la sinapsis podría estar cumpliendo un rol local en el que interactuaría con sitios de anclaje a la membrana sinaptosomal, estos siendo probablemente otras proteínas sinápticas.

**A****B**

**Figura II.V. Relación de p65 anclado con p65 libre y con I $\kappa$ B $\alpha$  en ET durante la consolidación.**

A) Relación de p65 en las membranas tratadas con SDS (mSDS) sobre p65 en el contenido sinaptosomal (CS) para los animales con choque (S) y sin choque (U), en relación con los naïve (N), 5, 15 y 45 minutos después del entrenamiento. B) Relación de p65 en las membranas tratadas con SDS (mSDS) sobre I $\kappa$ B en el extracto de tritón (ET) para los animales con choque (S) y sin choque (U), en relación con los naïve (N), 5, 15 y 45 minutos después del entrenamiento. Se muestran medias con error estándar. \* P <0,05.

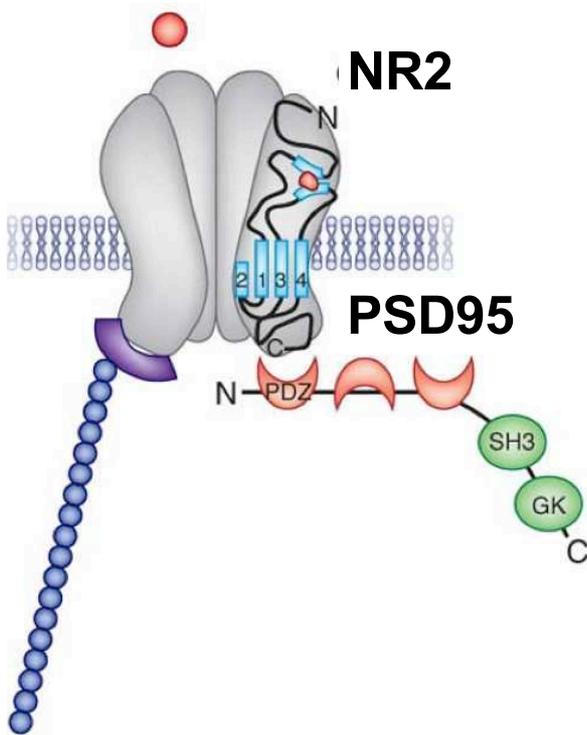
## f. Un péptido que impide la interacción de PSD95 con NMDA impide la consolidación de la memoria

Teniendo en cuenta los resultados anteriores de la dinámica de NF-kappa B en la sinapsis durante la consolidación de la memoria, se volvió un objetivo principal conseguir una herramienta que permita estudiar el rol local de NF-kappa B en la sinapsis y disociarlo del rol nuclear. Dados los antecedentes de un posible rol local de NF-kappa B en la sinapsis involucrando receptores de NMDA (Heckscher et al., 2007) y los antecedentes implicando la necesidad de este receptor para la activación de NF-kappa B (Guerrini et al., 1995; Meffert, 2003); NMDA se volvió un blanco para la búsqueda de esta herramienta.

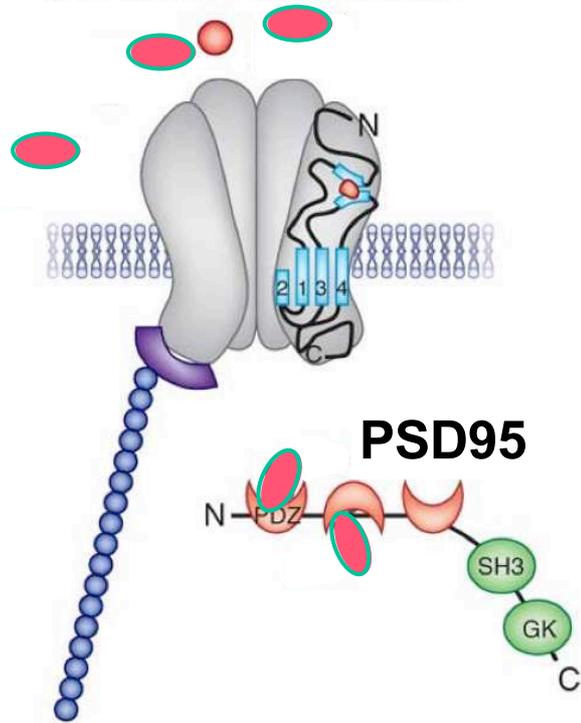
Con el objetivo de impedir la transducción de señales mediante interacciones proteína-proteína del receptor de NMDA localmente en la sinapsis sin afectar su actividad como canal (y por lo tanto señales eléctricas que puedan llegar al soma luego de su activación) se estableció una colaboración con el Dr. Andrew Mallon de Calista Therapeutics (USA) quién desarrolla péptidos que interfieren con distintos dominios proteicos. En particular se utilizaron distintas generaciones de un péptido que impide la unión de la subunidad NR2 del receptor NMDA con la proteína de andamiaje PSD95 mediante sus sitios PDZ 1 y 2 (Figura II.VI).

Como control se utilizó un péptido que une PDZ 3 y se realizaron todos los experimentos comportamentales para la puesta a punto de esta herramienta que permitiría estudiar y dilucidar la función local o nuclear de NF-kappa B en los procesos de consolidación de la memoria . Para todos los experimentos de puesta a punto de ésta herramienta se utilizó la versión aversiva de la tarea comportamental (S) y al grupo Si como control.

unión entre NMDAR y PSD95



Tratamiento con un agente que perturba las interacciones de PSD95



cascada de señalización molecular de PSD95 interrumpida

**Figura II.VI. Mecanismo de acción del péptido**

Figura adaptada de “Emerging mechanisms of disrupted cellular signaling in brain ischemia” Michael Tymianski, Nature Neuroscience. 2011. El péptido se une a PDZ 1 y 2; Interfiriendo con las interacciones protéicas de PSD95 mediante estos dominios. En particular el bloqueo de estos dominios causa una interferencia con la subunidad NR2 del receptor de NMDA. Los péptidos fueron diseñados y sintetizados sobre la base de un fundamento bioquímico.

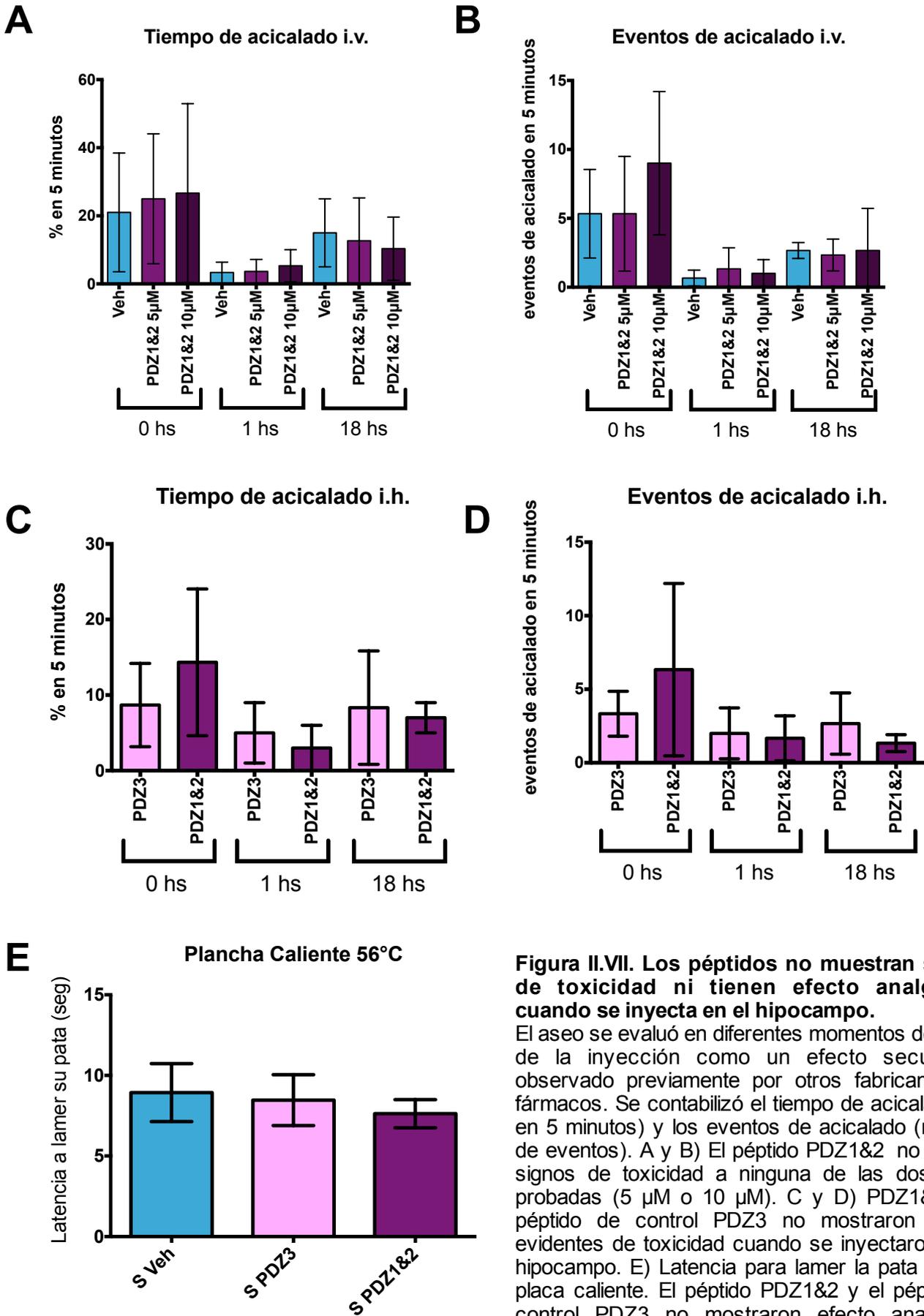
## i. Estudio de toxicidad del péptido

Se realizaron experimentos con inyecciones intra-venosas e intra-hipocampales para evaluar la toxicidad de los péptidos en ratón. Para determinar si los péptidos poseen efectos tóxicos se observó a los animales a distintos tiempos luego de la administración de los péptidos. En particularidad se prestó especial atención a ciertos comportamientos estereotipados que han sido descritos como síntomas de toxicidad (Malley et al., 2000). En especial el efecto “*head turning*” donde los animales ladean la cabeza de lado a lado repetidamente y a los eventos de acicalamiento (*grooming*). En primer lugar se realizaron inyecciones intra-venosas en ratón con dos dosis distintas del péptido PDZ1&2 (5 y 10  $\mu$ M) y vehículo. Se observó a los ratones durante 5 minutos en una arena experimental con viruta a distintos tiempos luego de la inyección (0, 1 y 18 hs). No hubo eventos de “*head turning*” y tampoco existieron diferencias significativas en el tiempo en el que los animales ocupaban acicalándose o en el número de eventos de acicalamiento para las dosis evaluadas en todos los tiempos observados en comparación con el grupo vehículo (n=3 por grupo, Figura II.VII.A y B).

A continuación se inyectó el péptido PDZ1&2 y el péptido control PDZ3 en el hipocampo de animales canulados bilateralmente en el hipocampo. La dosis de 10 nmoles/ratón inyectada fue sacada de bibliografía (Leblanc et al 2010). Ninguno de los dos péptidos provocó eventos de “*head turning*”. A su vez no hubo diferencias significativas en el tiempo de acicalamiento o el número de eventos de acicalamiento entre grupos en ninguna de las sesiones de evaluación (n=3 por grupo, Figura II.VII.C y D). De esta manera se decidió continuar con esta dosis de los péptidos para los estudios siguientes.

## ii. El péptido no es analgésico cuando se inyecta en hipocampo

Teniendo en cuenta que: a) Los antecedentes de estudios con el péptido PDZ1&2 donde se inyectó el péptido intra-tecalmente, mostraron que el péptido fue capaz de producir analgesia en las extremidades (Leblanc et al 2010), y que b) el protocolo de aprendizaje utilizado en los experimentos de éste trabajo de tesis requiere que los animales sientan un choque eléctrico en las extremidades; se quiso evaluar la nocicepción en animales inyectados con los péptidos intra-hipocampalmente. Con este fin se utilizó el protocolo de plancha caliente donde se coloca a los animales en una plancha a 56 °C, 30 minutos después de la inyección de los péptidos y se mide la latencia de los animales a lamer su extremidad anterior. Se inyectó a los animales canulados bilateralmente en el hipocampo con el péptido PDZ1&2 (dosis 10 nmoles/ratón), el péptido control PDZ3 (dosis 10 nmoles/ratón) y solución salina (vehículo). No se observaron diferencias significativas en la latencia de los animales a lamer su extremidad anterior entre los grupos (Figura II.VII.E). Estos resultados sugieren que la inyección intra-hipocampal de los péptidos en esta dosis no produce analgesia en las extremidades, lo cual permitió el uso de la tarea asociativa contextual aversiva (con choque eléctrico, S) para los estudios del efecto del péptido en la consolidación de la memoria.



**Figura II.VII. Los péptidos no muestran signos de toxicidad ni tienen efecto analgésico cuando se inyecta en el hipocampo.**

El aseo se evaluó en diferentes momentos después de la inyección como un efecto secundario observado previamente por otros fabricantes de fármacos. Se contabilizó el tiempo de acicalado (% en 5 minutos) y los eventos de acicalado (número de eventos). A y B) El péptido PDZ1&2 no mostró signos de toxicidad a ninguna de las dos dosis probadas (5 µM o 10 µM). C y D) PDZ1&2 y el péptido de control PDZ3 no mostraron signos evidentes de toxicidad cuando se inyectaron en el hipocampo. E) Latencia para lamer la pata en una placa caliente. El péptido PDZ1&2 y el péptido de control PDZ3 no mostraron efecto analgésico cuando se inyectaron en el hipocampo. Las barras representan medias con error estándar.

### iii. El péptido afecta la consolidación de la memoria

Como se pretende estudiar el efecto de estos péptidos en la activación tanto nuclear como sinaptosomal de NF-kappa B y de esta manera poder profundizar el estudio del rol de NF-kappa B sináptico, se realizaron los experimentos comportamentales para evaluar el efecto de los péptidos sobre la consolidación de la memoria. Dado que para medir la activación de NF-kappa B se deben hacer extractos a distintos tiempos luego del entrenamiento (5 minutos para sinapsis y 45 minutos para núcleo) es necesario poder inyectar los péptidos antes del entrenamiento. Por este motivo en el primero de estos experimentos se inyectó a los ratones canulados bilateralmente en el hipocampo 30 minutos antes del experimento con vehículo, péptido PDZ1&2 y péptido PDZ3. Los animales cuyas inyecciones no alcanzaron el hipocampo se descartaron del análisis. Se utilizó la tarea contextual aversiva (S) y como control comportamental se utilizó al grupo de animales que recibe el choque eléctrico pero sin asociación al contexto (Si). Estos animales presentan latencias de entrada al compartimiento oscuro comparables a las de un animal *naïve*. Se utilizaron, por lo tanto, cuatro grupos experimentales, grupo Si inyectado con vehículo (Si Veh), grupo S inyectado con vehículo (S Veh), grupo S inyectado con el péptido PDZ1&2 (S PDZ1&2) y el grupo S inyectado con el péptido PDZ3 (S PDZ3). Se observaron latencias de entrada significativamente más altas en el grupo S Veh en comparación con el grupo Si Veh indicando retención de la tarea (Mann-Whitney  $U=0,0$ ,  $p < 0,01$ ; Mediana Si Veh = 14 s,  $n=5$ ; Mediana S Veh = 300 s,  $n=8$ ). A su vez, el grupo S PDZ1&2 mostró latencias de entrada significativamente más cortas que el grupo S Veh (Mann-Whitney  $U=0,0$ ,  $p < 0,01$ , Mediana S PDZ1&2 = 59,5 s,  $n=11$ ; Mediana S Veh = 300 s,  $n=8$ ) y que el grupo S PDZ3 (Mann-Whitney  $U=0,0$ ,  $p < 0,01$ ; Mediana S PDZ1&2 = 59,5 s,  $n=11$ ; Mediana S PDZ3 = 300 s,  $n=12$ ). No hubo diferencias significativas en las latencias entre el grupo S Veh y el grupo S PDZ3 (Figura II.VIII.A). Estos resultados permiten concluir que la interferencia del PDZ1 y

el PDZ2 de PSD95 produce un deterioro en la retención cuando el péptido es administrado 30 minutos antes del entrenamiento.

Sin embargo este resultado no permite asegurar que no se vea afectada también la adquisición de la tarea. Por este motivo y para determinar que el efecto de la interferencia de los PDZ1 y PDZ2 de PSD95 sea sobre la consolidación de la memoria se evaluó el efecto de los péptidos al inyectar intra-hipocampalmente inmediatamente después del entrenamiento. Se utilizaron los mismos grupos experimentales que para el experimento anterior y nuevamente se observó el efecto amnésico del péptido PDZ1&2. Se evidenció retención en el grupo S Veh comparado con el grupo Si Veh dadas las latencias de entrada significativamente mayores del primer grupo durante la evaluación (Mann-Whitney  $U=0,0$ ,  $p < 0,01$ , Mediana Si Veh = 15,5 s,  $n=6$  Mediana S Veh = 300 s,  $n=7$ ). Del mismo modo que en el experimento anterior se vió que el grupo S PDZ1&2 mostró latencias de entrada menores que los grupos S Veh (Mann-Whitney  $U=0,0$ ,  $p < 0,01$ , Mediana S PDZ1&2 = 108,5 s,  $n=6$ ; Mediana S Veh = 300 s,  $n=7$ ) y S PDZ3 (Mann-Whitney  $U=0,0$ ,  $p < 0,01$ , Mediana S PDZ1&2 = 108,5 s,  $n=6$ ; Mediana S PDZ3 = 300 s,  $n=6$ ); y que este último no mostró diferencias significativas en las latencias de entrada con el grupo S Veh (Figura II.VIII.B). Estos resultados sugieren que el péptido que interfiere con los PDZ1 y PDZ2 de PSD95 ocasiona un efecto amnésico cuando es administrado inmediatamente después de un entrenamiento, indicando que el efecto no es sobre la adquisición.

Por último, para demostrar que el efecto observado se debe a una disrupción del proceso de consolidación, se administraron los péptidos fuera de la ventana de consolidación, mostrando que lo observado no se debía a un efecto generalizado en el hipocampo. Para esto se inyectó a los ratones canulados bilateralmente en el hipocampo con los péptidos a las 6 horas de terminado el entrenamiento. Resultados previos estiman que más allá de este tiempo se encuentra por fuera de la ventana temporal de la consolidación (Freudenthal et al. 2005). Utilizando los mismos grupos descritos en el

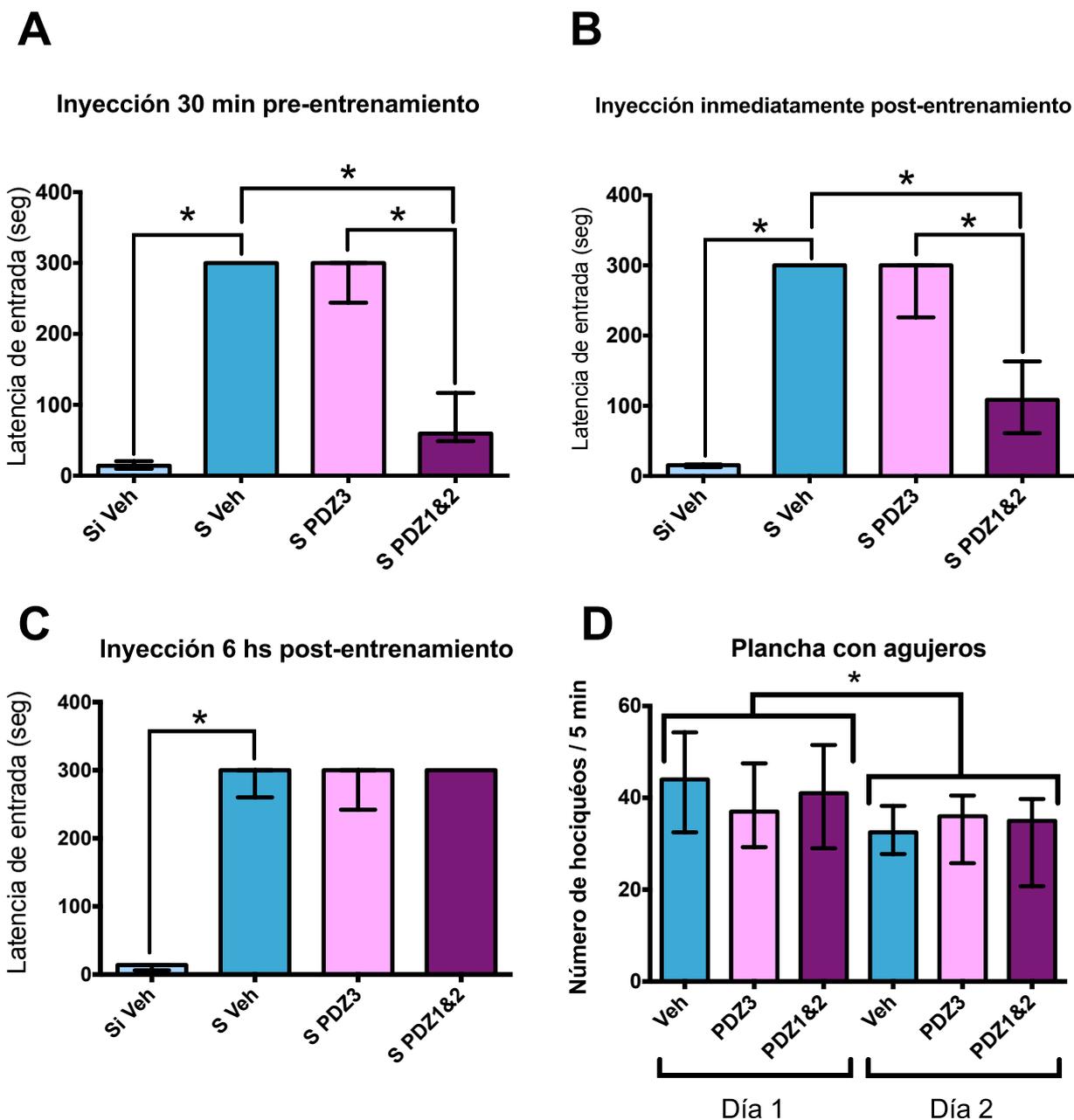
experimento anterior pero retrasando la administración del péptido 6 h luego de haberse entrenado a los sujetos experimentales, se observa que la droga no afecta el desempeño de los mismos. Existen diferencias significativas en las latencias de entrada al compartimiento oscuro entre los grupos Si Veh y S Veh que demuestran la retención de la tarea (Mann-Whitney  $U=0,0$ ,  $p < 0,01$ , Mediana Si Veh = 14 s,  $n=7$ ; Mediana S Veh = 300 s,  $n=8$ ) pero no hay diferencias significativas entre los grupos S Veh, S PDZ1&2 y S PDZ3 (Figura II.VIII.C).

Todos estos resultados sugieren que la disrupción de la interacción de NMDA con PSD95 durante la consolidación de la memoria mediante el uso de un péptido específico dirigido a los PDZ1 y PDZ2 produce un deterioro en la retención.

#### iv. El péptido no causa un daño permanente en el hipocampo

Por último fue importante determinar que el efecto del péptido en la consolidación sea un efecto reversible y no un deterioro del hipocampo que no permita la formación de nuevas memorias. Por este motivo se tomó a los grupos de animales inyectados 30 minutos antes del entrenamiento y luego de la sesión de evaluación se los expuso a un tablero con agujeros. Se contabiliza el número de hociqueos dentro de los agujeros durante esta primera exposición y 24 horas más tarde se los re-expone al tablero con agujeros y se vuelve a medir el número de hociqueos. Por la tendencia natural de los roedores a explorar ambientes nuevos se determina que un menor número de hociqueos indica una retención del contexto al que fueron expuestos previamente. Se observó que todos los grupos mostraron un número de hociqueos menor durante la reexposición (Prueba de t pareada  $t=2.395$   $df=23$ ,  $p<0.05$ ) y no hubo diferencias entre grupos, indicando que todos los grupos retuvieron el contexto al que fueron expuestos el día anterior (Figura II.VIII.D). Esto permite decir que el efecto del péptido PDZ1&2 en el hipocampo sobre la consolidación de la

memoria es un efecto reversible que no impide la formación y retención de futuras memorias contextuales.



**Figura II.VIII. El péptido PDZ1&2 afecta la consolidación de la memoria cuando se inyecta en el hipocampo.**

Se muestran las latencias de entrada durante la sesión de evaluación. A) El péptido que interfiere con PDZ 1 y 2 impide la consolidación de la memoria cuando se inyecta 30 minutos antes del entrenamiento. B) El péptido que interfiere con PDZ 1 & 2 impide la consolidación de la memoria cuando se inyecta inmediatamente después del entrenamiento. C) El péptido no tiene efecto cuando se inyecta 6 horas después del entrenamiento (fuera de la ventana de consolidación). Se muestran medianas con rango intercuartil.  $P < 0.05$ . D) No se observó efecto permanente del péptido. Los animales de (A) se expusieron a la tarea de exploración de agujeros y el número de hociqueos durante el entrenamiento y la sesión de evaluación fue significativamente diferente, pero no hubo diferencia entre los grupos. \*  $P < 0.05$

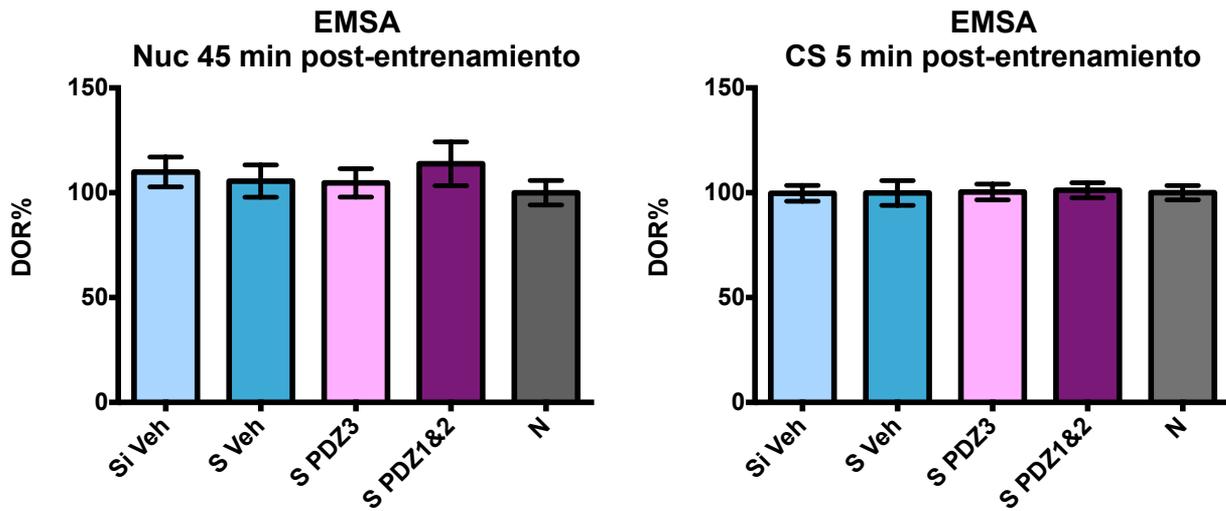
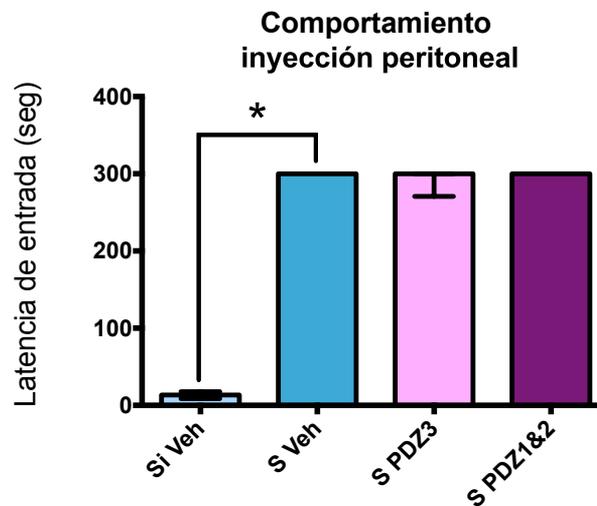
## v. La canulación enmascara la activación nuclear y sináptica de NF-kappa B durante la consolidación

A continuación se propuso estudiar el efecto del péptido en la activación de NF-kappa B nuclear y sináptica luego de un entrenamiento. Con este fin se utilizaron los mismos grupos que para los experimentos comportamentales y un grupo de animales *naïve* (N). Se canuló a todos los animales bilateralmente en el hipocampo 4-5 días previo al entrenamiento, incluyendo a los animales N. Todos los animales fueron inyectados 30 minutos antes del entrenamiento ya sea con los péptidos (grupos S PDZ1&2 y S PDZ3) o con vehículo (grupos S Veh, Si Veh, N Veh). Los animales que se utilizaron para extracto nuclear fueron sacrificados 45 minutos luego del entrenamiento. Los animales que se utilizaron para extractos sinaptosomales fueron sacrificados 5 minutos luego del entrenamiento. Se evaluó la activación de NF-kappa B mediante EMSA para ambos experimentos (nuclear y sinaptosomal). No se encontraron diferencias significativas entre grupos en ninguno de los experimentos (Figura II.IX.A). De hecho no se evidenció en ninguno de los dos experimentos, ni a los 5 minutos en sinapsis ni a los 45 minutos en el núcleo, la activación de NF-kappa B en el grupo S Veh en comparación al Si Veh o N Veh. Este resultado no se condice con los resultados obtenidos previamente en el laboratorio y en este trabajo. Por este motivo se especuló que la cirugía de canulación podría estar teniendo un efecto inflamatorio que active exacerbadamente a NF-kappa B; cuyo papel en la respuesta inflamatoria ha sido ampliamente reportado. Esta respuesta inflamatoria podría estar enmascarando la activación de NF-kappa B dada por el aprendizaje de la tarea. Por lo tanto pareciera que no se puede evaluar el efecto del péptido PDZ1&2 en la activación de NF-kappa B durante la consolidación de la memoria utilizando esta técnica.

## vi. El péptido no tiene efecto comportamental cuando es inyectado intra-peritonealmente

Dado que la inyección intra-hipocampal con cirugía de canulación genera esta respuesta inflamatoria que enmascara cualquier posible activación de NF-kappa B se buscó una manera de administrar el péptido sin provocar esta respuesta. Se inyectó una dosis de 1  $\mu\text{mol}$ /ratón intra-peritonealmente inmediatamente post-entrenamiento de PDZ1&2, PDZ3 o Vehículo y se estudió el efecto en la consolidación. Se evidenció la retención de la tarea por las mayores latencias del grupo S Veh en comparación con el grupo Si Veh (Mann-Whitney  $U=0,0$ ,  $p < 0,01$ , Mediana Si Veh = 13,5 s,  $n=8$ ; Mediana S Veh = 300 s,  $n=8$ ). No se observó un efecto en la consolidación de la memoria cuando los péptidos son inyectados intra-peritonealmente en esta dosis (Figura II.IX.B). Dado este resultado, no se prosiguió con el estudio del efecto estos péptidos en la activación de NF-kappa B durante la consolidación de la memoria. No se ha encontrado una forma de administrar el péptido/vehículo que tenga efecto comportamental y no genere una activación exacerbada de NF-kappa B (que por lo tanto enmascara cualquier posible efecto del péptido). Por lo tanto no se ha podido corroborar aún que el efecto del péptido sobre la consolidación de la memoria esté relacionado con la disrupción de la activación de NF-kappa B sináptico a nivel local.

Aunque no se ha podido utilizar esta herramienta aún para profundizar el estudio del rol de NF-kappa B en la sinapsis, este trabajo provee importantes antecedentes para otras líneas del laboratorio que continúan este estudio. En particular se están estudiando los cambios en la acetilación de proteínas sinápticas. A su vez, estos resultados abren el camino para el estudio de la necesidad de la interacción entre PDS95 y NMDAR durante la consolidación de la memoria.

**A****B**

**Figura II.IX. Efecto de los péptidos sobre la activación de NMDA y exploración de una vía alternativa de administración.**

A) Densidad óptica relativa (DOR%) de EMSAs mostrando los niveles de activación de NF-kappa B en el núcleo 45 minutos luego de un entrenamiento para todos los grupos (panel izquierdo) y en el contenido sinaptosomal 5 minutos luego de un entrenamiento (panel derecho). Las barras muestran media con error estándar. No se observaron diferencias significativas entre grupos. B) Latencias de entrada al compartimiento oscuro durante una sesión de evaluación de animales inyectados con los péptidos o vehículo inmediatamente luego del entrenamiento. Las barras muestran medianas con rango intercuartil. \*  $P < 0.05$ .

# Discusión Capítulo II - NF-kappa B en la sinapsis

## a. Localización de NF-kappa B

La presencia de proteínas p65 e I $\kappa$ B $\alpha$  es indicadora de la existencia de una vía funcional de NF-kappa B. En el hipocampo es posible localizar estas proteínas tanto en los somas neuronales como en los neuropilos adyacentes del hipocampo, es decir, en la capa piramidal y estrato radiatum. Esta localización sugiere no sólo su distribución dicotómica clásica entre el núcleo y el citoplasma peri-nuclear, sino que también muestra una fuerte presencia neuropilar (Figura II.I). Esta localización subcelular se ha informado previamente en varios modelos animales como rata, ratón, cangrejo y mosca. (Boersma et al., 2011, Freudenthal y Romano, 2000, Heckscher et al., 2007, Kaltschmidt et al., 1993, Meberg et al., 1996, Suzuki et al., 1998). En este trabajo se encontró una distribución similar en el hipocampo de ratones y se estudió en detalle esta localización sináptica. Con este fin se hicieron inmunofluorescencias de sinaptosomas y vió una correlación positiva de colocación entre p65 y una proteína de andamiaje post-sináptico. A su vez se estudiaron extractos secuenciales de sinaptosomas para determinar aún más precisamente la localización de estas proteínas.

En este trabajo se describen dos localizaciones sinápticas diferenciables de NF-kappa B. La primera es una fracción del factor de transcripción que se encuentra libre en el sinaptoplasma (extracto CS) y la segunda es una fracción que se encuentra en las membranas sinaptosomales (extracto mSDS). Ambas fracciones poseen los componentes de la vía p65 e I $\kappa$ B $\alpha$ , pero en la fracción membrana p65 sólo se extrae con SDS al 1%

(detergente aniónico fuerte), mientras que I $\kappa$ B se puede extraer de la membrana con tritón al 1% (detergente no iónico suave). Esto implicaría una unión más fuerte de la subunidad p65 a membrana que del inhibidor I $\kappa$ B. La identidad de las fracciones fue corroborada por la presencia de otras proteínas de localización conocida como NMDA y PSD95. Algunos informes sugieren esta asociación particular para p65 e I $\kappa$ B $\alpha$  en neuronas en cultivo (Heckscher et al., 2007; Schmeisser et al., 2012; Suzuki et al., 1997). Sin embargo, esta es la primera vez que se describen estas fracciones en el hipocampo del ratón. La subunidad p65 tiene la capacidad de interactuar con los dominios PDZ de la proteína de membrana X11L en las neuronas que sugieren un posible objetivo de anclaje a la membrana (Tomita et al., 2000).

Los extractos sinaptosomales puros y crudos demostraron tener un patrón de localización de proteínas sinápticas muy similar y por lo tanto se eligió el protocolo más corto para los siguientes estudios de dinámica y activación.

## b. Dinámica de NF-kappa B en la sinapsis

En el sistema nervioso se ha reportado que NF-kappa B tiene un nivel basal de activación en las neuronas cultivadas (Kaltschmidt et al., 1994). Los resultados del presente trabajo muestran la activación sináptica de NF-kappa B durante la consolidación. La localización de esta vía en la sinapsis apoya la idea de que este factor de transcripción desempeña un papel local y específico en la plasticidad y la memoria.

NF-kappa B se activa en el núcleo 45 minutos después del entrenamiento después de una inhibición previa a los 15 minutos post-entrenamiento (Freudenthal et al., 2005). La activación en el contenido sinaptosomal después de una sesión de entrenamiento, ocurre a los 5 minutos (Figura II.III). Para el contenido sinaptosomal vemos que los animales S y U muestran el mismo patrón de activación. Esto está de acuerdo con lo observado para la activación nuclear.

Curiosamente, las dos fracciones de NF-kappa B (anclado en membrana y libre en sinaptoplasma) no son estáticos, sino dinámicos, es decir la cantidad de los componentes de la vía del factor de transcripción pueden variar en cantidad en una u otra fracción. En particular se vió que la cantidad de NF-kappa B en estos sitios varía durante la consolidación (Figura II.IV). Específicamente, 5 minutos después del entrenamiento hay un aumento en la cantidad de p65 asociado a membrana a expensas de la fracción libre. Esto se evidencia claramente en la Figura II.V.A donde se ve que la relación p65 mSDS / p65 SC para ambos grupos S y U muestra un notable aumento en relación con el grupo N en este tiempo. La relación p65 mSDS / p65 SC permanece sin cambios entre los grupos a los 15 y 45 minutos después del entrenamiento, implicando una pequeña ventana temporal donde NF-kappa B cambia su localización. Esta breve ventana de estrecha interacción con las membranas sinápticas postula la posibilidad de un papel de señalización para los cambios locales durante la consolidación.

Por otra parte, cabe destacar la presencia de Ikb $\alpha$  en las membranas de los sinaptosomas. No todo Ikb $\alpha$  está tan fuertemente unido a membranas como p65, dado que una parte puede ser desprendida con tritón 1% en el extracto ET (Figura II.V.B). Sin embargo, su papel en la sinapsis puede ser central en la regulación de la actividad de NF-kappa B. La cantidad de Ikb $\alpha$  en las membranas aumenta junto con p65, lo que sugiere que en este momento el factor de transcripción se asocia a las membranas unido a su inhibidor (Figura II.IV.C). Es sólo a los 15 minutos post-entrenamiento que la cantidad de Ikb $\alpha$  disminuye en las membranas (ET) y en relación con la cantidad de p65 mSDS. Esto podría indicar que NF-kappa B transloca a las membranas a través de la actividad sináptica relacionada con el entrenamiento, pero asociado a su inhibidor. Al mismo tiempo, la reserva de NF-kappa B sináptico que no se transloca a la membrana, se libera de Ikb $\alpha$  y puede estar implicada en la activación o reclutamiento de otras proteínas *in-situ*, o puede prepararse para el transporte retrógrado al núcleo. Posteriormente, 15 minutos después del

entrenamiento en las membranas, la relación p65/I $\kappa$ B $\alpha$  aumenta respecto a N animales, lo que implica una activación de NF-kappa B en membrana (Figura II.V.B).

Las consecuencias de la dinámica de este factor de transcripción probablemente implican el etiquetado y la preparación de la sinapsis para la remodelación y los cambios de plasticidad sináptica, actuando en el proceso de consolidación de la memoria. Teniendo esto en cuenta, se plantea la hipótesis de que durante este período de anclaje se altera el equilibrio de las modificaciones postraduccionales de las proteínas sinápticas. En el núcleo, una forma en la que NF-kappa B es capaz de inducir modificaciones post-traduccionales de las proteínas es reclutando acetiltransferasas (Zhong et al., 1998). La acetiltransferasa ARD1 está presente en las dendritas, regulando su desarrollo (Ohkawa et al., 2008). ARD1 es capaz de asociarse con p65 (Xu et al., 2012). Tal interacción podría ser la clave para el rol local de NF-kappa B en la sinapsis durante la consolidación de la memoria. Sin embargo se ha informado que los cambios de plasticidad sináptica que requieren NF-kappa B no ocurren cuando los dominios de transactivación y de unión al ADN fueron mutados (Boersma et al., 2011). Esto podría sugerir que los cambios sinápticos dependientes de NF-kappa B precisan la función nuclear del factor de transcripción. Una interpretación alternativa es que la función local de NF-kappa B depende de su capacidad de interactuar con otras moléculas distintas del ADN y que esta interacción con sustratos sinápticos se ve afectada cuando los dominios de transactivación y unión al ADN se encuentran alterados (Huxford et al., 1998 y Malek et al., 1998). Los datos presentados en este trabajo proveen un buen punto de partida para continuar con la investigación de esta hipótesis acerca del rol local sináptico de NF-kappa B. Con este objetivo se planteó la búsqueda de una herramienta que permita el estudio del rol de NF-kappa B sináptico desligado del clásico rol a nivel nuclear.

## c. La búsqueda de una herramienta para estudiar el rol sináptico de NF-kappa B

El estudio del rol local de NF-kappa B en la sinapsis se ve entorpecido por la incapacidad de poder distinguir los efectos correspondientes a el rol nuclear y el rol sináptico del factor de transcripción. Por este motivo se comenzó con la búsqueda de una herramienta que permitiera esta distinción. En particular se eligió como blanco la interacción de PSD95 con la subunidad NR2 del receptor de NMDA ya que se ha reportado que la actividad de NMDA es necesaria para la activación de NF-kappa B (Guerrini et al., 1995). La idea de disrumpir esta interacción tuvo como base lógica por un lado permitir que el receptor de NMDA actuando como canal de lugar a la señal eléctrica que se propague al soma y por lo tanto active las cascada de señalización que permitan la actividad NF-kappa B peri-nuclear; y por otro lado impedir la transducción de señales locales en la sinapsis debidas a interacciones proteína-proteína del receptor de NMDA. Se especula que la interacción con otras proteínas sinápticas sería la vía preferencial de acción de NF-kappa B en este sitio.

Dado que p65 puede interactuar con los dominios PDZ de la proteína de membrana X11L (Tomita et al., 2000) confiriéndole un posible medio de anclaje a la membrana; se conjetura que el uso de péptidos dirigidos a este tipo de dominios podría ser otro mecanismo para impedir la actividad y el rol local de NF-kappa B.

Los péptidos usados no muestran signos de toxicidad y/o efectos secundarios tales como un acicalado excesivo ni sacudidas de la cabeza. Además, los péptidos no muestran ningún signo de analgesia cuando se inyectan en el hipocampo (Figura II.VII). En este trabajo se explora como este péptido que interfiere con la PDZ 1 y 2 de PSD95 en el hipocampo impide la consolidación de la memoria, solo cuando es inyectado pre o post

training, es decir cuando el péptido puede actuar en la ventana de consolidación, pero no cuando se inyectan fuera de la ventana de consolidación. Es interesante remarcar que al interferir con el PDZ 3 de PSD95 no se ven estos efectos negativos en la consolidación de la memoria (Figura II.VIII). Estos resultados proveen la primera evidencia de que la interacción de PSD95 con la subunidad NR2 del receptor de NMDA es necesaria para la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria en ratón. Es interesante discutir que se ha reportado que inhibidores de la interacción proteína-proteína entre PSD95 y nNOS no tienen efecto amnésico en memoria espacial y un modelo de memoria de origen en ratas (Smith et al., 2016). Esto apunta a descartar la posibilidad de que el efecto observado en el presente trabajo se deba a una disrupción en la vía de nNOS y abre la puerta a considerar que el efecto está dado sobre otra vía como podría ser la de NF-kappa B.

Dados los resultados discutidos anteriormente se intentó explorar los niveles de activación de NF-kappa B en el núcleo y en la sinapsis bajo el efecto de los péptidos durante la consolidación de una memoria aversiva. Sin embargo, al estudiar los niveles de activación de NF-kappa B en extractos nucleares y de contenido sinaptosomal no se pudieron evidenciar cambios. En particular fue sorprendente no ver una activación para el grupo entrenado tratado con vehículo en ninguno de los dos extractos (nuclear y de contenido sinaptosomal), ya que esta activación en los animales entrenados, en estos extractos y a estos tiempos se observó de forma fiable en repetidas ocasiones anteriores (Figura II.IX). La única diferencia entre estos experimentos y las ocasiones anteriores en las que se había evidenciado la activación fue la presencia de las cánulas implantadas quirúrgicamente en el hipocampo de los ratones. Como se elaboró anteriormente en la introducción, NF-kappa B tiene un importante rol en la respuesta inflamatoria del cerebro (Kopitar-Jerala et al., 2015, Kolmus et al. 2015). Las cirugías y el propio implante de las cánulas posiblemente genere una respuesta inflamatoria exacerbada en el área. En particular existe una importante la respuesta de la glia frente a daños en el tejido (Guido

Stoll et al. 2003). Dado que para las mediciones de la actividad de NF-kappa B se utiliza todo el tejido del hipocampo se piensa que esta respuesta podría estar enmascarando cualquier activación de NF-kappa B debida el entrenamiento en las neuronas piramidales de esta estructura.

Con la idea de encontrar una manera de administrar los péptidos sin generar esta activación de NF-kappa B debida a la inflamación, se probó inyectar los péptidos de manera intra-peritoneal. Se sabe que los péptidos son altamente permeables con lo cual se espera que puedan atravesar la barrera hematoencefálica sin problemas. Se evaluó el efecto a nivel comportamental en la retención de los animales inyectados inmediatamente luego del entrenamiento con dichos péptidos y se vió que con este método de administración no se evidenció un impedimento en la consolidación por parte del péptido PDZ1&2 como se veía con la inyección intra-hipocampal (Figura II.IX). Esto puede deberse a diversos motivos, principalmente se puede suponer que la dosis usada para la inyección intra-peritoneal (1µmol/ratón, 100 veces más que la inyección intra-hipocampal) no fue suficiente para provocar un impedimento en la consolidación de la memoria. El uso de dosis más alta podría tener un efecto analgésico y/o tóxico sobre el animal. Al no encontrar diferencias comportamentales con las inyecciones intra-peritoneales se descartó la posibilidad de evaluar los niveles de activación de NF-kappa B con este método de inyección. Por otro lado se evaluó la posibilidad de realizar inyecciones intra-venosas del péptido como en los experimentos de toxicidad pero el protocolo de estas inyecciones es técnicamente complicado, lo que aporta variabilidad al momento de inyección entre animal y animal y además genera alto estrés en los animales, interfiriendo de esta manera con los protocolos de aprendizaje. Por estos motivos se consideró que este método para administrar el péptido no era el ideal.

Futuros estudios son necesarios para encontrar la forma de administración y dosis adecuada de los péptidos que generen un impedimento en la memoria y a su vez permitan

evidenciar la activación de NF-kappa B debida al aprendizaje. Aunque aún no se haya encontrado una manera de administrar los péptidos que permita el estudio a nivel molecular de la activación de NF-kappa B, se cree que estos péptidos pueden resultar ser una herramienta muy útil para inhibir mecanismos moleculares sinápticos relacionados con la proteína PSD95.

# Conclusiones Generales

Existen evidencias que sugieren una participación crítica del NF-kappa B en la plasticidad neuronal y la memoria. La importancia de este factor de transcripción ha sido ampliamente reportado, particularmente en referencia a la expresión de proteínas involucradas en el almacenamiento de memoria constituyendo un mecanismo conservado evolutivamente (Kaltschmidt y Kaltschmidt, 2009b, Romano et al., 2006).

El presente trabajo de tesis provee novedosas y valiosas evidencias que sugieren una participación determinante de NF-kappa B en la consolidación de memorias apetitivas y aversivas en ratón. Se caracterizan dos tareas con respuestas comportamentales distintas durante la sesión de evaluación, mientras que durante el entrenamiento los animales experimentan un mismo contexto y efectúan un mismo comportamiento (pero obtienen información de valencia opuesta). Dicha caracterización fortalece un modelo para el estudio de los procesos que subyacen a la consolidación de dichas memorias. Se proponen estas tareas que requieren sólo un ensayo de entrenamiento como modelos funcionales para tales estudios. En esta tesis se describe por primera vez la implicación de la vía NF-kappa B en la consolidación de memoria apetitiva y aversiva en el hipocampo, amígdala y núcleo accumbens.

El hipocampo está involucrado en el procesamiento de la información contextual y espacial implicada en el condicionamiento contextual, pero no está involucrado en la representación de choque eléctrico (Sanders et al., 2003). Por lo tanto, ambos grupos de animales pueden tener activación de NF-kappa B debido al aprendizaje del contexto en el que están entrenados. Es interesante notar que en el hipocampo de animales de ambos grupos entrenados se encuentra una activación nuclear de NF-kappa B a los 45 minutos

post-entrenamiento y también, una activación sináptica de NF-kappa B a los 5 minutos post-entrenamiento. A su vez, la dinámica de los componentes de la vía de NF-kappa B en la sinapsis (localización en membrana o en contenido sinaptosomal a distintos tiempos luego del entrenamiento) es la misma para los dos grupos S y U. Los animales S pueden asociar este contexto a un estímulo aversivo (el choque eléctrico), mientras que los animales U pueden asociar el contexto a un estímulo apetitivo (el compartimiento oscuro en el cual pueden esconderse). En ambos casos hay procesos mnésicos evocados al colocar al animal en la plataforma durante la sesión de evaluación. Se conjetura que en el hipocampo la activación nuclear y sináptica de NF-kappa B y su dinámica en esta última localización está involucrada en el almacenamiento de rasgos contextuales y espaciales, y no en la relación con la valencia del estímulo. La naturaleza aversiva o apetitiva del estímulo puede ser procesada en otras áreas cerebrales como el núcleo accumbens y la amígdala (Fanselow y Gale, 2003). En este trabajo de tesis se confirma la necesidad de estas áreas para la consolidación de memorias tanto apetitivas como aversivas. Más interesante aún es la participación de la vía de NF-kappa B en dichas áreas para la correcta consolidación de la memoria, ya sean apetitivas o aversivas.

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que NF-kappa B puede tener un papel sináptico local durante la consolidación. También muestran la primera evidencia de una localización para NF-kappa B ligado a las membranas de los sinaptosomas del hipocampo de ratón y su dinámica durante la consolidación. Además se investiga una nueva herramienta para el estudio de dicho rol y abren nuevas líneas para continuar dilucidando los mecanismos moleculares involucrados en la consolidación de la memoria. Como se detalló en la introducción, tanto el hipocampo, como la amígdala y el núcleo accumbens dependen de la activación de los receptores de glutamato tipo NMDA para su correcto funcionamiento en la memoria. Esto daría sustento a la idea de que la vía de NF-kappa B está estrechamente relacionada con la activación de estos receptores. Por lo tanto la

manipulación de la cascada de señalización de los mismos, utilizando los péptidos que interfieren con los PDZ de PSD95, constituye un blanco de interés en la continuación y profundización del estudio del rol de NF-kappa B en estas áreas, en memorias apetitivas como aversivas.

Todos los datos presentados en este trabajo establecen una base importante para en el futuro contestar diversas preguntas. En particular algunas de las preguntas que se abrieron a partir del presente trabajo son: ¿cómo y dónde se almacena la información que confiere la valencia de una memoria y da lugar *a posteriori* a un determinado comportamiento ? ¿cuál es el rol local de NF-kappa B en la sinapsis y cuales son las proteínas con las que interactúa? ¿Qué papel tiene la proteína de andamiaje PSD95 en la sinapsis durante la consolidación de la memoria?. En el laboratorio existen nuevas líneas que pretenden abordar dichas preguntas. Se hipotetiza que la información de la valencia de una situación puede estar dada por la identidad de las neuronas en cada área involucrada en el procesamiento de estas memorias. Con este fin se planea trabajar con estas tareas haciendo estudios electrofisiológicos e inmunohistoquímicos que permitan identificar patrones en la población neuronal asociada a cada tarea. Por otro lado, simultáneamente con este trabajo, en el laboratorio se evidenció un cambio en los niveles de acetilación proteica en la sinapsis (Tesis de licenciatura Julia Busso, 2014), otra nueva línea del laboratorio tiene como fin estudiar la capacidad de NF-kappa B como reclutador de acetil-transferasas en la sinapsis y evaluar cómo la disrupción de la vía del factor de transcripción tiene un efecto en la acetilación de proteínas sinápticas. A su vez, se pretende estudiar cómo la inhibición de la desacetilación afecta la consolidación de la memoria. Por último se pretende estudiar los mecanismos a través de los cuales PSD95 estaría involucrada en la cascada de señalización sináptica necesaria en la consolidación de la memoria; y continuar con los estudios que permitan determinar cuál es el efecto de la disrupción de la interacción de PSD95 con NMDA sobre el rol de NF-kappa B en la sinapsis.

# Referencias

---

Agranoff, B. W., and P. D. Klinger. "Puromycin Effect on Memory Fixation in the Goldfish." *Science* 146, no. 3646 (11, 1964): 952-53. doi:10.1126/science.146.3646.952.

Alaa El-Din El-Husseini<sup>1,\*</sup>, Eric Schnell<sup>2,\*</sup>, Dane M. Chetkovich<sup>1,3</sup>, Roger A. Nicoll<sup>2</sup>, David S. Bredt<sup>1,†1</sup> Department of Physiology, 2 Department of Cellular and Molecular Pharmacology, and 3 Department of Neurology, University of California, San Francisco 94143, USA., Alaa El-Din El-Husseini, Eric Schnell, Dane M. Chetkovich, Roger A. Nicoll, David S. Bredt, and *Science* 17 Nov 2000 : 1364-1368. "PSD-95 Involvement in Maturation of Excitatory Synapses." PSD-95 Involvement in Maturation of Excitatory Synapses | *Science*. Accessed January 10, 2017. <http://science.sciencemag.org/content/290/5495/1364.abstract>.

Albensi, Benedict C., and Mark P. Mattson. "Evidence for the Involvement of TNF and NF- $\kappa$ B in Hippocampal Synaptic Plasticity." *Synapse* 35, no. 2 (02 2000): 151-59. doi:10.1002/(sici)1098-2396(200002)35:23.0.co;2-p.

Alberini, C.m. "Transcription Factors in Synaptic Plasticity and Learning and Memory." *Encyclopedia of Neuroscience*, 2009, 1081-092. doi:10.1016/b978-008045046-9.00828-7.

Alberini, Cristina M., Mirella Ghirardi, Richard Metz, and Eric R. Kandel. "C/EBP Is an Immediate-early Gene Required for the Consolidation of Long-term Facilitation in *Aplysia*." *Cell* 76, no. 6 (03 1994): 1099-114. doi:10.1016/0092-8674(94)90386-7.

Alberini, Cristina M., and Eric R. Kandel. "The Regulation of Transcription in Memory Consolidation." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7, no. 1 (12, 2014). doi:10.1101/cshperspect.a021741.

Andreatta, M., M. Fendt, A. Muhlberger, M. J. Wieser, S. Imobersteg, A. Yarali, B. Gerber,

- and P. Pauli. "Onset and Offset of Aversive Events Establish Distinct Memories Requiring Fear and Reward Networks." *Learning & Memory* 19, no. 11 (10, 2012): 518-26. doi:10.1101/lm.026864.112.
- Anokhin, Konstatin V., Radmila Mileusnic, Inna Y. Shamakina, and Steven P.r. Rose. "Effects of Early Experience on C-fos Gene Expression in the Chick Forebrain." *Brain Research* 544, no. 1 (03 1991): 101-07. doi:10.1016/0006-8993(91)90890-8.
- Baeuerle, Patrick A., and David Baltimore. "Activation of DNA-binding Activity in an Apparently Cytoplasmic Precursor of the NF- $\kappa$ B Transcription Factor." *Cell* 53, no. 2 (04 1988): 211-17. doi:10.1016/0092-8674(88)90382-0.
- Bailey, C. H., and E. R. Kandel. "Structural Changes Accompanying Memory Storage." *Annual Review of Physiology* 55, no. 1 (10 1993): 397-426. doi:10.1146/annurev.ph.55.030193.002145.
- Baldwin, Albert S. "THE NF- $\kappa$ B AND I $\kappa$ B PROTEINS: New Discoveries and Insights." *Annual Review of Immunology* 14, no. 1 (04 1996): 649-81. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.649.
- Bannerman, D. M., M. A. Good, S. P. Butcher, M. Ramsay, and R. G. M. Morris. "Distinct Components of Spatial Learning Revealed by Prior Training and NMDA Receptor Blockade." *Nature* 378, no. 6553 (11, 1995): 182-86. doi:10.1038/378182a0.
- Baratti, C. M., and M. M. Boccia. "Effects of Sildenafil on Long-term Retention of an Inhibitory Avoidance Response in Mice." *Behavioural Pharmacology* 10, no. 8 (12 1999): 731-37. doi:10.1097/00008877-199912000-00004.
- Barondes, S. H., and H. D. Cohen. "Puromycin Effect on Successive Phases of Memory Storage." *Science* 151, no. 3710 (02, 1966): 594-95. doi:10.1126/science.151.3710.594.
- Barondes, Samuel H., and Murray E. Jarvik. "The Influence Of Actinomycin-D On Brain Rna Synthesis And On Memory." *Journal of Neurochemistry* 11, no. 3 (03 1964): 187-95.

doi:10.1111/j.1471-4159.1964.tb06128.x.

Bechara, A. "Double Dissociation of Conditioning and Declarative Knowledge Relative to the Amygdala and Hippocampus in Humans." *Neurocase* 3, no. 4 (08, 1997): 267c-74.

doi:10.1093/neucas/3.4.267-c.

Belvin, Marcia P., and Kathryn V. Anderson. "A CONSERVED SIGNALING PATHWAY: The Drosophila Toll-Dorsal Pathway." *Annual Review of Cell and Developmental Biology*

12, no. 1 (11 1996): 393-416. doi:10.1146/annurev.cellbio.12.1.393.

Berman, D. E. "Memory Extinction, Learning Anew, and Learning the New: Dissociations in the Molecular Machinery of Learning in Cortex." *Science* 291, no. 5512 (03, 2001):

2417-419. doi:10.1126/science.1058165.

Boccia, M., R. Freudenthal, M. Blake, V. De La Fuente, G. Acosta, C. Baratti, and A.

Romano. "Activation of Hippocampal Nuclear Factor- B by Retrieval Is Required for Memory Reconsolidation." *Journal of Neuroscience* 27, no. 49 (12, 2007):

13436-3445. doi:10.1523/jneurosci.4430-07.2007.

Boersma, M. C. H., E. C. Dresselhaus, L. M. De Biase, A. B. Mihalas, D. E. Bergles, and M.

K. Meffert. "A Requirement for Nuclear Factor- B in Developmental and Plasticity-Associated Synaptogenesis." *Journal of Neuroscience* 31, no. 14 (04, 2011):

5414-425. doi:10.1523/jneurosci.2456-10.2011.

Bolatto, Carmen, Silvia Chifflet, Aram Megighian, and Rafael Cantera. "Synaptic Activity

Modifies the Levels of Dorsal and Cactus at the Neuromuscular Junction Of drosophila." *Journal of Neurobiology* 54, no. 3 (01, 2003): 525-36.

doi:10.1002/neu.10179.

Bonsignore, Luca Tommaso. *Behavioural Plasticity in Responce to Ethologically Relevant Stimuli in Rodents*. Firenze, 2008.

Bourtchouladze, Roussoudan, Bruno Freguelli, and Alcino J. Silva. "DEFICIENT LONG-TERM MEMORY IN MICE WITH A TARGETED MUTATION OF THE

- CAMP-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN." *Macromolecular Interplay In Brain Associative Mechanisms*, 02 1998, 323-24. doi:10.1142/9789812816894\_0034.
- Bouton, Mark E. "Conditioning, Remembering, and Forgetting." *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 20, no. 3 (1994): 219-31. doi:10.1037/0097-7403.20.3.219.
- Brashers-Krug, Thomas, Reza Shadmehr, and Emilio Bizzi. "Consolidation in Human Motor Memory." *Nature* 382, no. 6588 (07, 1996): 252-55. doi:10.1038/382252a0.
- Braud, William G., and William J. Broussard. "Effects of Puromycin on Memory for Shuttle Box Extinction in Goldfish and Barpress Extinction in Rats." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1, no. 6 (11 1973): 651-56. doi:10.1016/0091-3057(73)90028-2.
- Bruning, Johann E.a., Tino Breitfeld, Evelyn Kahl, Jorge R. Bergado-Acosta, and Markus Fendt. "Relief Memory Consolidation Requires Protein Synthesis within the Nucleus Accumbens." *Neuropharmacology* 105 (06 2016): 10-14. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.01.016.
- Buffington, Shelly A., Jürgen M. Sobotzik, Christian Schultz, and Matthew N. Rasband. "IkB $\alpha$  Is Not Required for Axon Initial Segment Assembly." *Molecular and Cellular Neuroscience* 50, no. 1 (05 2012): 1-9. doi:10.1016/j.mcn.2012.03.003.
- Béïque, Jean-Claude, and Rodrigo Andrade. "PSD-95 Regulates Synaptic Transmission and Plasticity in Rat Cerebral Cortex." *The Journal of Physiology* 546, no. 3 (02 2003): 859-67. doi:10.1113/jphysiol.2002.031369.
- Cahill, L. "The Amygdala and Emotional Memory." *Neurocase* 6, no. 6 (12, 2000): 444. doi:10.1093/neucas/6.6.444.
- Calabresi, Paolo, Barbara Picconi, Alessandro Tozzi, and Veronica Ghiglieri. "Interaction between Basal Ganglia and Limbic Circuits in Learning and Memory Processes." *Parkinsonism & Related Disorders* 22 (01 2016). doi:10.1016/j.parkreldis.2015.09.017.

- Cane, M., B. Maco, G. Knott, and A. Holtmaat. "The Relationship between PSD-95 Clustering and Spine Stability In Vivo." *Journal of Neuroscience* 34, no. 6 (02, 2014): 2075-086. doi:10.1523/jneurosci.3353-13.2014.
- Cantera, Rafael, Tatjana Kozlova, Carolina Barillas-Mury, and Fotis C. Kafatos. "Muscle Structure and Innervation Are Affected by Loss of Dorsal in the Fruit Fly, *Drosophila Melanogaster*." *Molecular and Cellular Neuroscience* 13, no. 2 (02 1999): 131-41. doi:10.1006/mcne.1999.0739.
- Caroni, Pico, Flavio Donato, and Dominique Muller. "Structural Plasticity upon Learning: Regulation and Functions." *Nature Reviews Neuroscience* 13, no. 7 (06, 2012): 478-90. doi:10.1038/nrn3258.
- Chen, Lin-Feng, and Warner C. Greene. "Assessing Acetylation of NF- $\kappa$ B." *Methods* 36, no. 4 (08 2005): 368-75. doi:10.1016/j.ymeth.2005.03.011.
- Chen, Shanping, Diancai Cai, Kaycey Pearce, Philip Y-W Sun, Adam C. Roberts, and David L. Glanzman. "Reinstatement of Long-term Memory following Erasure of Its Behavioral and Synaptic Expression in *Aplysia*." *ELife* 3 (11, 2014). doi:10.7554/elife.03896.
- Cheng, D. "Relative and Absolute Quantification of Postsynaptic Density Proteome Isolated from Rat Forebrain and Cerebellum." *Molecular & Cellular Proteomics* 5, no. 6 (03, 2006): 1158-170. doi:10.1074/mcp.d500009-mcp200.
- Ciano, P. Di. "Dissociable Effects of Antagonism of NMDA and AMPA/KA Receptors in the Nucleus Accumbens Core and Shell on Cocaine-seeking Behavior." *Neuropsychopharmacology* 25, no. 3 (09 2001): 341-60. doi:10.1016/s0893-133x(01)00235-4.
- Cohen, N., and L. Squire. "Preserved Learning and Retention of Pattern-analyzing Skill in Amnesia: Dissociation of Knowing How and Knowing That." *Science* 210, no. 4466 (10, 1980): 207-10. doi:10.1126/science.7414331.
- Corkin, Suzanne. "Lasting Consequences of Bilateral Medial Temporal Lobectomy: Clinical

- Course and Experimental Findings in H.M." *Seminars in Neurology* 4, no. 02 (06 1984): 249-59. doi:10.1055/s-2008-1041556.
- Dash, Pramod K., Binyamin Hochner, and Eric R. Kandel. "Injection of the CAMP-responsive Element into the Nucleus of Aplysia Sensory Neurons Blocks Long-term Facilitation." *Nature* 345, no. 6277 (06, 1990): 718-21. doi:10.1038/345718a0.
- Davis, Hasker P., and Larry R. Squire. "Protein Synthesis and Memory: A Review." *Psychological Bulletin* 96, no. 3 (1984): 518-59. doi:10.1037//0033-2909.96.3.518.
- Dezazzo, Jim, and Tim Tully. "Dissection of Memory Formation: From Behavioral Pharmacology to Molecular Genetics." *Trends in Neurosciences* 18, no. 5 (05 1995): 212-18. doi:10.1016/0166-2236(95)93905-d.
- Dudai, Yadin. *Memory from A to Z: Keywords, Concepts, and beyond*. Oxford, UK.: Oxford University Press, 2002.
- Dudai, Yadin. "Molecular Bases of Long-term Memories: A Question of Persistence." *Current Opinion in Neurobiology* 12, no. 2 (04 2002): 211-16. doi:10.1016/s0959-4388(02)00305-7.
- Dudai, Yadin, and Richard G.m. Morris. "To Consolidate or Not to Consolidate: What Are the Questions?" *Brain, Perception, Memory Advances in Cognitive Neuroscience*, 11, 2000, 149-62. doi:10.1093/acprof:oso/9780198524823.003.0011.
- Dudai, Yadin. "Universal Learning Mechanisms: From Genes to Molecular Switches." *Cell to Cell Signalling*, 1989, 99-108. doi:10.1016/b978-0-12-287960-9.50014-9.
- Díaz-Mataix, Lorenzo, Lucille Tallot, and Valérie Doyère. "The Amygdala: A Potential Player in Timing CS–US Intervals." *Behavioural Processes* 101 (01 2014): 112-22. doi:10.1016/j.beproc.2013.08.007.
- Ehrlich, I., M. Klein, S. Rumpel, and R. Malinow. "PSD-95 Is Required for Activity-driven Synapse Stabilization." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, no. 10 (02, 2007): 4176-181. doi:10.1073/pnas.0609307104.

- Ehrlich, I. "Postsynaptic Density 95 Controls AMPA Receptor Incorporation during Long-Term Potentiation and Experience-Driven Synaptic Plasticity." *Journal of Neuroscience* 24, no. 4 (01, 2004): 916-27. doi:10.1523/jneurosci.4733-03.2004.
- Eichenbaum, H., A.p. Yonelinas, and C. Ranganath. "The Medial Temporal Lobe and Recognition Memory." *Annual Review of Neuroscience* 30, no. 1 (07 2007): 123-52. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094328.
- Eichenbaum, Howard. "Is the Rodent Hippocampus Just for 'place'?" *Current Opinion in Neurobiology* 6, no. 2 (04 1996): 187-95. doi:10.1016/s0959-4388(96)80072-9.
- Eichenbaum, Howard. "Memory on Time." *Trends in Cognitive Sciences* 17, no. 2 (02 2013): 81-88. doi:10.1016/j.tics.2012.12.007.
- Elias, Guillermo M., Lars Funke, Valentin Stein, Seth G. Grant, David S. Bredt, and Roger A. Nicoll. "Synapse-Specific and Developmentally Regulated Targeting of AMPA Receptors by a Family of MAGUK Scaffolding Proteins." *Neuron* 52, no. 2 (10 2006): 307-20. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.012.
- Fagerlund, R., L. Kinnunen, M. Kohler, I. Julkunen, and K. Melen. "NF- B Is Transported into the Nucleus by Importin 3 and Importin 4." *Journal of Biological Chemistry* 280, no. 16 (01, 2005): 15942-5951. doi:10.1074/jbc.m500814200.
- Fanselow, Michael S., and Greg D. Gale. "The Amygdala, Fear, and Memory." *Annals of the New York Academy of Sciences* 985, no. 1 (01, 2006): 125-34. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb07077.x.
- Federman, N., V. De La Fuente, G. Zalcmán, N. Corbi, A. Onori, C. Passananti, and A. Romano. "Nuclear Factor B-Dependent Histone Acetylation Is Specifically Involved in Persistent Forms of Memory." *Journal of Neuroscience* 33, no. 17 (04, 2013): 7603-614. doi:10.1523/jneurosci.4181-12.2013.
- Federman, Noel, Gisela Zalcmán, Verónica De La Fuente, María Sol Fustiñana, and Arturo Romano. "Epigenetic Mechanisms and Memory Strength: A Comparative Study."

- Journal of Physiology-Paris* 108, no. 4-6 (09 2014): 278-85.  
doi:10.1016/j.jphysparis.2014.06.003.
- Feltenstein, M., and R. See. "NMDA Receptor Blockade in the Basolateral Amygdala Disrupts Consolidation of Stimulus-reward Memory and Extinction Learning during Reinstatement of Cocaine-seeking in an Animal Model of Relapse." *Neurobiology of Learning and Memory* 88, no. 4 (11 2007): 435-44. doi:10.1016/j.nlm.2007.05.006.
- Fenu, Sandro, and Gaetano Di Chiara. "Facilitation of Conditioned Taste Aversion Learning by Systemic Amphetamine: Role of Nucleus Accumbens Shell Dopamine D1 Receptors." *European Journal of Neuroscience* 18, no. 7 (10 2003): 2025-030. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02899.x.
- Fernandes, Jansen, Juliana Carlota Kramer Soares, Luiz Guilherme Zaccaro Do Amaral Baliego, and Ricardo Mario Arida. "A Single Bout of Resistance Exercise Improves Memory Consolidation and Increases the Expression of Synaptic Proteins in the Hippocampus." *Hippocampus* 26, no. 8 (04, 2016): 1096-103. doi:10.1002/hipo.22590.
- Fernando, Anushka B. P., Jennifer E. Murray, and Amy L. Milton. "The Amygdala: Securing Pleasure and Avoiding Pain." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 7 (2013). doi:10.3389/fnbeh.2013.00190.
- Ferreira, M. B.c., C. Wolfman, R. Walz, R. C. Da Silva, M. S. Zanatta, J. H. Medina, and I. Izquierdo. "NMDA-receptor-dependent, Muscimol-sensitive Role of the Entorhinal Cortex in Post-training Memory Processing." *Behavioural Pharmacology* 3, no. 4 (08 1992). doi:10.1097/00008877-199208000-00015.
- Ferreira, M.b.c., R.c. Da Silva, J.h. Medina, and I. Izquierdo. "Late Posttraining Memory Processing by Entorhinal Cortex: Involvement of NMDA and GABAergic Receptors." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 41, no. 4 (04 1992): 767-71. doi:10.1016/0091-3057(92)90225-5.
- Fioravante, Diasynou, and John H. Byrne. "Protein Degradation and Memory Formation."

- Brain Research Bulletin* 85, no. 1-2 (04 2011): 14-20.  
doi:10.1016/j.brainresbull.2010.11.002.
- Flexner, J. B., L. B. Flexner, and E. Stellar. "Memory in Mice as Affected by Intracerebral Puromycin." *Science* 141, no. 3575 (07, 1963): 57-59.  
doi:10.1126/science.141.3575.57.
- Frenkel, L., R. Freudenthal, A. Romano, V.e Nahmod, H. Maldonado, and A. Delorenzi. "Angiotensin II and the Transcription Factor Rel/NF- $\kappa$ B Link Environmental Water Shortage with Memory Improvement." *Neuroscience* 115, no. 4 (12 2002): 1079-087.  
doi:10.1016/s0306-4522(02)00583-3.
- Freudenthal, Ramiro, Mariano M. Boccia, Gabriela B. Acosta, Mariano G. Blake, Emiliano Merlo, Carlos M. Baratti, and Arturo Romano. "NF- $\kappa$ B Transcription Factor Is Required for Inhibitory Avoidance Long-term Memory in Mice." *European Journal of Neuroscience* 21, no. 10 (05 2005): 2845-852. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04126.x.
- Freudenthal, Ramiro, and Arturo Romano. "Participation of Rel/NF- $\kappa$ B Transcription Factors in Long-term Memory in the Crab Chasmagnathus." *Brain Research* 855, no. 2 (02 2000): 274-81. doi:10.1016/s0006-8993(99)02358-6.
- Freudenthal, Ramiro, Arturo Romano, and Aryeh Routtenberg. "Transcription Factor NF- $\kappa$ B Activation after in Vivo Perforant Path LTP in Mouse Hippocampus." *Hippocampus* 14, no. 6 (2004): 677-83. doi:10.1002/hipo.20020.
- Freudenthal, Ramiro, Fernando Locatelli, Gabriela Hermitte, Héctor Maldonado, Carlos Lafourcade, Alejandro Delorenzi, and Arturo Romano. " $\kappa$ -B like DNA-binding Activity Is Enhanced after Spaced Training That Induces Long-term Memory in the Crab Chasmagnathus." *Neuroscience Letters* 242, no. 3 (02 1998): 143-46.  
doi:10.1016/s0304-3940(98)00059-7.
- Freudenthal, Ramiro, Fernando Locatelli, Gabriela Hermitte, Héctor Maldonado, Carlos Lafourcade, Alejandro Delorenzi, and Arturo Romano. " $\kappa$ -B like DNA-binding Activity Is

- Enhanced after Spaced Training That Induces Long-term Memory in the Crab *Chasmagnathus*." *Neuroscience Letters* 242, no. 3 (02 1998): 143-46. doi:10.1016/s0304-3940(98)00059-7.
- Frey, Uwe, and Richard G. M. Morris. "Synaptic Tagging and Long-term Potentiation." *Nature* 385, no. 6616 (02, 1997): 533-36. doi:10.1038/385533a0.
- Fuente, Verónica De La, Noel Federman, María Sol Fustiñana, Gisela Zalcmán, and Arturo Romano. "Calcineurin Phosphatase as a Negative Regulator of Fear Memory in Hippocampus: Control on Nuclear Factor- $\kappa$  B Signaling in Consolidation and Reconsolidation." *Hippocampus* 24, no. 12 (08, 2014): 1549-561. doi:10.1002/hipo.22334.
- Fuente, Verónica De La, Noel Federman, Gisela Zalcmán, Angeles Salles, Ramiro Freudenthal, and Arturo Romano. "NF- $\kappa$ B Transcription Factor Role in Consolidation and Reconsolidation of Persistent Memories." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 8 (09, 2015). doi:10.3389/fnmol.2015.00050.
- García-Delatorre, Paola, Consuelo Pérez-Sánchez, Kioko Guzmán-Ramos, and Federico Bermúdez-Rattoni. "Role of Glutamate Receptors of Central and Basolateral Amygdala Nuclei on Retrieval and Reconsolidation of Taste Aversive Memory." *Neurobiology of Learning and Memory* 111 (05 2014): 35-40. doi:10.1016/j.nlm.2014.03.003.
- Gerber, B., A. Yarali, S. Diegelmann, C. T. Wotjak, P. Pauli, and M. Fendt. "Pain-relief Learning in Flies, Rats, and Man: Basic Research and Applied Perspectives." *Learning & Memory* 21, no. 4 (03, 2014): 232-52. doi:10.1101/lm.032995.113.
- Ghosh, Sankar, Michael J. May, and Elizabeth B. Kopp. "NF- $\kappa$ B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses." *Annual Review of Immunology* 16, no. 1 (04 1998): 225-60. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.225.
- Goelet, Philip, Vincent F. Castellucci, Samuel Schacher, and Eric R. Kandel. "The Long and

- the Short of Long-term Memory—a Molecular Framework." *Nature* 322, no. 6078 (07, 1986): 419-22. doi:10.1038/322419a0.
- Graf, Peter, and Daniel L. Schacter. "Implicit and Explicit Memory for New Associations in Normal and Amnesic Subjects." *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition* 11, no. 3 (1985): 501-18. doi:10.1037//0278-7393.11.3.501.
- Grecksch, Gisela, and Hansjürgen Matthies. "Two Sensitive Periods for the Amnesic Effect of Anisomycin." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 12, no. 5 (05 1980): 663-65. doi:10.1016/0091-3057(80)90145-8.
- Guerrini, L., F. Blasi, and S. Denis-Donini. "Synaptic Activation of NF-kappa B by Glutamate in Cerebellar Granule Neurons in Vitro." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, no. 20 (09, 1995): 9077-081. doi:10.1073/pnas.92.20.9077.
- Guido, Stoll, Jander Sebastian, and Michael Schroeter. "Detrimental and Beneficial Effects of Injury-Induced Inflammation and Cytokine Expression in the Nervous System." *Advances in Experimental Medicine and Biology Molecular and Cellular Biology of Neuroprotection in the CNS*, 2003, 87-113. doi:10.1007/978-1-4615-0123-7\_3.
- Hall, Jeremy, Kerrie L. Thomas, and Barry J. Everitt. "Fear Memory Retrieval Induces CREB Phosphorylation and Fos Expression within the Amygdala." *European Journal of Neuroscience* 13, no. 7 (04 2001): 1453-458. doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01531.x.
- Hanley, Jonathan G. "Actin-dependent Mechanisms in AMPA Receptor Trafficking." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8 (11, 2014). doi:10.3389/fncel.2014.00381.
- Hebb, D. O. *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. New York: Wiley, 1949.
- Heckscher, Elizabeth S., Richard D. Fetter, Kurt W. Marek, Stephanie D. Albin, and Graeme W. Davis. "NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, and IRAK Control Glutamate Receptor Density at the *Drosophila* NMJ." *Neuron* 55, no. 6 (09 2007): 859-73. doi:10.1016/j.neuron.2007.08.005.

- Heldt, S. A., K. Zimmermann, K. Parker, M. Gaval, and K. J. Ressler. "Bdnf Deletion or TrkB Impairment in Amygdala Inhibits Both Appetitive and Aversive Learning." *Journal of Neuroscience* 34, no. 7 (02, 2014): 2444-450. doi:10.1523/jneurosci.4085-12.2014.
- Hermans, Erno J., Francesco P. Battaglia, Piray Atsak, Lycia D. De Voogd, Guillén Fernández, and Benno Roozendaal. "How the Amygdala Affects Emotional Memory by Altering Brain Network Properties." *Neurobiology of Learning and Memory* 112 (07 2014): 2-16. doi:10.1016/j.nlm.2014.02.005.
- Hetru, C., and J. A. Hoffmann. "NF- B in the Immune Response of Drosophila." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1, no. 6 (10, 2009). doi:10.1101/cshperspect.a000232.
- Hochrainer, K., G. Racchumi, and J. Anrather. "Site-specific Phosphorylation of the P65 Protein Subunit Mediates Selective Gene Expression by Differential NF- B and RNA Polymerase II Promoter Recruitment." *Journal of Biological Chemistry* 288, no. 1 (10, 2012): 285-93. doi:10.1074/jbc.m112.385625.
- Hoesel, Bastian, and Johannes A. Schmid. "The Complexity of NF-κB Signaling in Inflammation and Cancer." *Molecular Cancer* 12, no. 1 (2013): 86. doi:10.1186/1476-4598-12-86.
- Huang, Bo, Xiao-Dong Yang, Acacia Lamb, and Lin-Feng Chen. "Posttranslational Modifications of NF-κB: Another Layer of Regulation for NF-κB Signaling Pathway." *Cellular Signalling* 22, no. 9 (09 2010): 1282-290. doi:10.1016/j.cellsig.2010.03.017.
- Huang, Wen-Hsuan, Hsu-Wen Chao, Li-Yun Tsai, Ming-Hung Chung, and Yi-Shuian Huang. "Elevated Activation of CaMKII $\beta$  in the CPEB3-knockout Hippocampus Impairs a Specific Form of NMDAR-dependent Synaptic Depotentiation." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8 (11, 2014). doi:10.3389/fncel.2014.00367.
- Huxford, Tom, De-Bin Huang, Shiva Malek, and Gourisankar Ghosh. "The Crystal Structure of the IκB $\alpha$ /NF-κB Complex Reveals Mechanisms of NF-κB Inactivation." *Cell* 95, no. 6 (12 1998): 759-70. doi:10.1016/s0092-8674(00)81699-2.

- Hyman, B. T., G. W. V. Hoesen, and A. R. Damasio. "Memory-related Neural Systems in Alzheimer's Disease: An Anatomic Study." *Neurology* 40, no. 11 (11, 1990): 1721. doi:10.1212/wnl.40.11.1721.
- Iversen, L. L., and J. Glowinski. "Regional Differences in the Rate of Turnover of Norepinephrine in the Rat Brain." *Nature* 210, no. 5040 (06, 1966): 1006-008. doi:10.1038/2101006a0.
- Izquierdo, I., J. A. Quillfeldt, M. S. Zanatta, J. Quevedo, E. Schaeffer, P. K. Schmitz, and J. H. Medina. "Sequential Role of Hippocampus and Amygdala, Entorhinal Cortex and Parietal Cortex in Formation and Retrieval of Memory for Inhibitory Avoidance in Rats." *European Journal of Neuroscience* 9, no. 4 (04 1997): 786-93. doi:10.1111/j.1460-9568.1997.tb01427.x.
- Izquierdo, Ivan, Claudio Da Cunha, Renata Rosat, Diana Jerusalinsky, Maria Beatriz C. Ferreira, and Jorge H. Medina. "Neurotransmitter Receptors Involved in Post-training Memory Processing by the Amygdala, Medial Septum, and Hippocampus of the Rat." *Behavioral and Neural Biology* 58, no. 1 (07 1992): 16-26. doi:10.1016/0163-1047(92)90847-w.
- Jarome, Timothy J., Jasmyne S. Thomas, and Farah D. Lubin. "The Epigenetic Basis of Memory Formation and Storage." *Progress in Molecular Biology and Translational Science Epigenetics and Neuroplasticity—Evidence and Debate*, 2014, 1-27. doi:10.1016/b978-0-12-800977-2.00001-2.
- Joseph, Shirley A., Cristina Tassorelli, Adapa V. Prasad, and Eileen Lynd-Balta. "NF- $\kappa$ B Transcription Factor Subunits in Rat Brain: Colocalization of P65 and  $\alpha$ -MSH." *Peptides* 17, no. 4 (01 1996): 655-64. doi:10.1016/0196-9781(96)00063-0.
- Kahl, Evelyn, and Markus Fendt. "Metabotropic Glutamate Receptors 7 within the Nucleus Accumbens Are Involved in Relief Learning in Rats." *Current Neuropharmacology* 14, no. 5 (06, 2016): 405-12. doi:10.2174/1570159x13666150425002017.

- Kaltschmidt, B., D. Ndiaye, M. Korte, S. Pothion, L. Arbibe, M. Prullage, J. Pfeiffer, A. Lindecke, V. Staiger, A. Israel, C. Kaltschmidt, and S. Memet. "NF- B Regulates Spatial Memory Formation and Synaptic Plasticity through Protein Kinase A/CREB Signaling." *Molecular and Cellular Biology* 26, no. 8 (03, 2006): 2936-946. doi:10.1128/mcb.26.8.2936-2946.2006.
- Kaltschmidt, B., and C. Kaltschmidt. "NF- B in the Nervous System." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1, no. 3 (09, 2009). doi:10.1101/cshperspect.a001271.
- Kaltschmidt, Barbara, and Christian Kaltschmidt. "DNA Array Analysis of the Developing Rat Cerebellum: Transforming Growth Factor- $\beta$ 2 Inhibits Constitutively Activated NF- $\kappa$ B in Granule Neurons." *Mechanisms of Development* 101, no. 1-2 (03 2001): 11-19. doi:10.1016/s0925-4773(00)00542-6.
- Kaltschmidt, C., B. Kaltschmidt, H. Neumann, H. Wekerle, and P. A. Baeuerle. "Constitutive NF-kappa B Activity in Neurons." *Molecular and Cellular Biology* 14, no. 6 (06 1994): 3981-992. doi:10.1128/mcb.14.6.3981.
- Kaltschmidt, Christian, Barbara Kaltschmidt, and Patrick A. Baeuerle. "Brain Synapses Contain Inducible Forms of the Transcription Factor NF- $\kappa$ B." *Mechanisms of Development* 43, no. 2-3 (10 1993): 135-47. doi:10.1016/0925-4773(93)90031-r.
- Kanarek, N., N. London, O. Schueler-Furman, and Y. Ben-Neriah. "Ubiquitination and Degradation of the Inhibitors of NF- B." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, no. 2 (09, 2009). doi:10.1101/cshperspect.a000166.
- Kandel, E. R. "Neuroscience: Breaking Down Scientific Barriers to the Study of Brain and Mind." *Science* 290, no. 5494 (11, 2000): 1113-120. doi:10.1126/science.290.5494.1113.
- Karin, Michael. "Nuclear Factor- $\kappa$ B in Cancer Development and Progression." *Nature* 441, no. 7092 (05, 2006): 431-36. doi:10.1038/nature04870.
- Kasai, Haruo, Masahiro Fukuda, Satoshi Watanabe, Akiko Hayashi-Takagi, and Jun

- Noguchi. "Structural Dynamics of Dendritic Spines in Memory and Cognition." *Trends in Neurosciences* 33, no. 3 (03 2010): 121-29. doi:10.1016/j.tins.2010.01.001.
- Kennedy, Bruce C., Jiva G. Dimova, Srikanth Dakoju, Li-Lian Yuan, Jonathan C. Gewirtz, and Phu V. Tran. "Deletion of Novel Protein TMEM35 Alters Stress-related Functions and Impairs Long-term Memory in Mice." *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 311, no. 1 (05, 2016). doi:10.1152/ajpregu.00066.2016.
- Kida, Satoshi, Sheena A. Josselyn, Sandra Peña De Ortiz, Jeffrey H. Kogan, Itzamarie Chevere, Shoichi Masushige, and Alcino J. Silva. "CREB Required for the Stability of New and Reactivated Fear Memories." *Nature Neuroscience* 5, no. 4 (03, 2002): 348-55. doi:10.1038/nn819.
- Kim, Eunjoon, and Morgan Sheng. "PDZ Domain Proteins of Synapses." *Nature Reviews Neuroscience* 5, no. 10 (10 2004): 771-81. doi:10.1038/nrn1517.
- Kolmus, Krzysztof, Jan Tavernier, and Sarah Gerlo. "β2-Adrenergic Receptors in Immunity and Inflammation: Stressing NF-κB." *Brain, Behavior, and Immunity* 45 (03 2015): 297-310. doi:10.1016/j.bbi.2014.10.007.
- Koopmans, G., A. Blokland, P. Vannieuwenhuijzen, and J. Prickaerts. "Assessment of Spatial Learning Abilities of Mice in a New Circular Maze." *Physiology & Behavior* 79, no. 4-5 (09 2003): 683-93. doi:10.1016/s0031-9384(03)00171-9.
- Kopitar-Jerala, Nataša. "Innate Immune Response in Brain, NF-Kappa B Signaling and Cystatins." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 8 (12, 2015). doi:10.3389/fnmol.2015.00073.
- Kosower, E. M. "A Molecular Basis for Learning and Memory." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69, no. 11 (11, 1972): 3292-296. doi:10.1073/pnas.69.11.3292.
- Krushel, L. A., B. A. Cunningham, G. M. Edelman, and K. L. Crossin. "NF- B Activity Is Induced by Neural Cell Adhesion Molecule Binding to Neurons and Astrocytes."

- Journal of Biological Chemistry* 274, no. 4 (01, 1999): 2432-439.  
doi:10.1074/jbc.274.4.2432.
- Leblanc, B.w., M. Iwata, A.p. Mallon, C.n. Rupasinghe, D.j. Goebel, J. Marshall, M.r. Spaller, and C.y. Saab. "A Cyclic Peptide Targeted against PSD-95 Blocks Central Sensitization and Attenuates Thermal Hyperalgesia." *Neuroscience* 167, no. 2 (05 2010): 490-500. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.02.031.
- Ledoux, Joseph E. "Emotion Circuits in the Brain." *Annual Review of Neuroscience* 23, no. 1 (03 2000): 155-84. doi:10.1146/annurev.neuro.23.1.155.
- Levita, Liat, Jeffrey W. Dalley, and Trevor W. Robbins. "Disruption of Pavlovian Contextual Conditioning by Excitotoxic Lesions of the Nucleus Accumbens Core." *Behavioral Neuroscience* 116, no. 4 (2002): 539-52. doi:10.1037//0735-7044.116.4.539.
- Lewis, Donald J. "Psychobiology of Active and Inactive Memory." *Psychological Bulletin* 86, no. 5 (1979): 1054-083. doi:10.1037//0033-2909.86.5.1054.
- Ling, Yun-Zhi, Wei Ma, Li Yu, Ye Zhang, and Qi-Sheng Liang. "Decreased PSD95 Expression in Medial Prefrontal Cortex (mPFC) Was Associated with Cognitive Impairment Induced by Sevoflurane Anesthesia." *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 16, no. 9 (09 2015): 763-71. doi:10.1631/jzus.b1500006.
- Liu, Y.-W., C.-C. Chen, J.-M. Wang, W.-C. Chang, Y.-C. Huang, S.-Y. Chung, B.-K. Chen, and J.-J. Hung. "Role of Transcriptional Factors Sp1, C-Rel, and C-Jun in LPS-induced C/EBP $\delta$  Gene Expression of Mouse Macrophages." *Cellular and Molecular Life Sciences* 64, no. 24 (10, 2007): 3282-294. doi:10.1007/s00018-007-7375-5.
- Loftus, Elizabeth F., and Geoffrey R. Loftus. "On the Permanence of Stored Information in the Human Brain." *American Psychologist* 35, no. 5 (1980): 409-20. doi:10.1037//0003-066x.35.5.409.
- Lorenz, Konrad. *The Foundations of Ethology*. New York: Springer-Verlag New York, 1981.

- Lubin, Farah D., and J. David Sweatt. "The I $\kappa$ B Kinase Regulates Chromatin Structure during Reconsolidation of Conditioned Fear Memories." *Neuron* 55, no. 6 (09 2007): 942-57. doi:10.1016/j.neuron.2007.07.039.
- Macdonald, Christopher J., Kyle Q. Lepage, Uri T. Eden, and Howard Eichenbaum. "Hippocampal "Time Cells" Bridge the Gap in Memory for Discontiguous Events." *Neuron* 71, no. 4 (08 2011): 737-49. doi:10.1016/j.neuron.2011.07.012.
- Maddox, Stephanie A., Casey S. Watts, and Glenn E. Schafe. "DNA Methyltransferase Activity Is Required for Memory-related Neural Plasticity in the Lateral Amygdala." *Neurobiology of Learning and Memory* 107 (01 2014): 93-100. doi:10.1016/j.nlm.2013.11.008.
- Maldonado, Héctor. "La Memoria Animal (Nº 32) Por Maldonado, Héctor - 9789502316284." Editorial Eudeba. Accessed January 11, 2017.
- Malek, S., T. Huxford, and G. Ghosh. "I $\kappa$ B Functions through Direct Contacts with the Nuclear Localization Signals and the DNA Binding Sequences of NF- $\kappa$ B." *Journal of Biological Chemistry* 273, no. 39 (09, 1998): 25427-5435. doi:10.1074/jbc.273.39.25427.
- Malley, Linda Angevine, John R. Bamberger, Judith C. Stadler, Glenn S. Elliott, John F. Hansen, Taisan Chiu, John S. Grabowski, and Kenneth L. Pavkov. "Subchronic Toxicity Of Cyclohexane In Rats And Mice By Inhalation Exposure." *Drug and Chemical Toxicology* 23, no. 4 (01 2000): 513-37. doi:10.1081/dct-100101969.
- Manago, F., C. Castellano, A. Oliverio, A. Mele, and E. De Leonibus. "Role of Dopamine Receptors Subtypes, D1-like and D2-like, within the Nucleus Accumbens Subregions, Core and Shell, on Memory Consolidation in the One-trial Inhibitory Avoidance Task." *Learning & Memory* 16, no. 1 (12, 2008): 46-52. doi:10.1101/lm.1177509.
- Maren, Stephen. "Neurobiology Ofpavlovianfearconditioning." *Annual Review of Neuroscience* 24, no. 1 (03 2001): 897-931. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.897.

- Martinez, R.c.r., A.r. Oliveira, C.e. Macedo, V.a. Molina, and M.I. Brandão. "Involvement of Dopaminergic Mechanisms in the Nucleus Accumbens Core and Shell Subregions in the Expression of Fear Conditioning." *Neuroscience Letters* 446, no. 2-3 (12 2008): 112-16. doi:10.1016/j.neulet.2008.09.057.
- May, Michael J., and Sankar Ghosh. "Rel/NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B Proteins: An Overview." *Seminars in Cancer Biology* 8, no. 2 (04 1997): 63-73. doi:10.1006/scbi.1997.0057.
- Meberg, Peter J., Walter R. Kinney, Eric G. Valcourt, and Aryeh Routtenberg. "Gene Expression of the Transcription Factor NF- $\kappa$  B in Hippocampus: Regulation by Synaptic Activity." *Molecular Brain Research* 38, no. 2 (06 1996): 179-90. doi:10.1016/0169-328x(95)00229-l.
- Meffert, Mollie K., Jolene M. Chang, Brian J. Wiltgen, Michael S. Fanselow, and David Baltimore. "NF- $\kappa$ B Functions in Synaptic Signaling and Behavior." *Nature Neuroscience* 6, no. 10 (08, 2003): 1072-078. doi:10.1038/nn1110.
- Merlo, E., P. Ratano, E. C. Ilioi, M. A. L. S. Robbins, B. J. Everitt, and A. L. Milton. "Amygdala Dopamine Receptors Are Required for the Destabilization of a Reconsolidating Appetitive Memory." *ENeuro* 2, no. 1 (02, 2015). doi:10.1523/eneuro.0024-14.2015.
- Merlo, E, Freudenthal R, Romano A. "The I $\kappa$ B kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab *Chasmagnathus*." *Neuroscience* (2002). 112(1):161-72.
- Merlo E, Freudenthal R, Maldonado H, Romano A. "Activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B by retrieval is required for long-term memory reconsolidation" *Learn Mem.* 2005 Jan-Feb;12(1):23-9. DOI: 10.1101/lm.82705.
- Mihalas, A. B., Y. Araki, R. L. Huganir, and M. K. Meffert. "Opposing Action of Nuclear Factor  $\kappa$ B and Polo-like Kinases Determines a Homeostatic End Point for Excitatory Synaptic Adaptation." *Journal of Neuroscience* 33, no. 42 (10, 2013): 16490-6501. doi:10.1523/jneurosci.2131-13.2013.

- Mikenberg, Ilja, Darius Widera, Aljoscha Kaus, Barbara Kaltschmidt, and Christian Kaltschmidt. "Transcription Factor NF- $\kappa$ B Is Transported to the Nucleus via Cytoplasmic Dynein/Dynactin Motor Complex in Hippocampal Neurons." *PLoS ONE* 2, no. 7 (07, 2007). doi:10.1371/journal.pone.0000589.
- Mikenberg, Ilja, Darius Widera, Aljoscha Kaus, Barbara Kaltschmidt, and Christian Kaltschmidt. "Transcription Factor NF- $\kappa$ B Is Transported to the Nucleus via Cytoplasmic Dynein/Dynactin Motor Complex in Hippocampal Neurons." *PLoS ONE* 2, no. 7 (07, 2007). doi:10.1371/journal.pone.0000589.
- Miller, George A., Eugene Galanter, and Karl H. Pribram. "Plans and the Structure of Behavior." 1960. doi:10.1037/10039-000.
- Milner, Brenda, Larry R. Squire, and Eric R. Kandel. "Cognitive Neuroscience and the Study of Memory." *Neuron* 20, no. 3 (03 1998): 445-68. doi:10.1016/s0896-6273(00)80987-3.
- Mir, Sajad, Tanusree Sen, and Nilkantha Sen. "Cytokine-Induced GAPDH Sulfhydration Affects PSD95 Degradation and Memory." *Molecular Cell* 56, no. 6 (12 2014): 786-95. doi:10.1016/j.molcel.2014.10.019.
- Mohammadi, Milad, and Markus Fendt. "Relief Learning Is Dependent on NMDA Receptor Activation in the Nucleus Accumbens." *British Journal of Pharmacology* 172, no. 9 (03, 2015): 2419-426. doi:10.1111/bph.13070.
- Morris, R. G. M., and U. Frey. "Hippocampal Synaptic Plasticity: Role in Spatial Learning or the Automatic Recording of Attended Experience?" *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 352, no. 1360 (10, 1997): 1489-503. doi:10.1098/rstb.1997.0136.
- Morris, R. G. M., P. Garrud, J. N. P. Rawlins, and J. O'keefe. "Place Navigation Impaired in Rats with Hippocampal Lesions." *Nature* 297, no. 5868 (06, 1982): 681-83. doi:10.1038/297681a0.

- Morris, R. G. M., E. Anderson, G. S. Lynch, and M. Baudry. "Selective Impairment of Learning and Blockade of Long-term Potentiation by an N-methyl-D-aspartate Receptor Antagonist, AP5." *Nature* 319, no. 6056 (02, 1986): 774-76. doi:10.1038/319774a0.
- Muller, Jeff, Keith P. Corodimas, Zhanna Fridel, and Joseph E. Ledoux. "Functional Inactivation of the Lateral and Basal Nuclei of the Amygdala by Muscimol Infusion Prevents Fear Conditioning to an Explicit Conditioned Stimulus and to Contextual Stimuli." *Behavioral Neuroscience* 111, no. 4 (1997): 683-91. doi:10.1037//0735-7044.111.4.683.
- Mumby, D. G. "Hippocampal Damage and Exploratory Preferences in Rats: Memory for Objects, Places, and Contexts." *Learning & Memory* 9, no. 2 (03, 2002): 49-57. doi:10.1101/lm.41302.
- Myers, Catherine E., and Mark A. Gluck. "Context, Conditioning, and Hippocampal Rerepresentation in Animal Learning." *Behavioral Neuroscience* 108, no. 5 (1994): 835-47. doi:10.1037//0735-7044.108.5.835.
- "An NF- $\kappa$ B-Like Transcription Factor in Axoplasm Is Rapidly Inactivated after Nerve Injury in Aplysia." An NF- $\kappa$ B-Like Transcription Factor in Axoplasm Is Rapidly Inactivated after Nerve Injury in Aplysia | Journal of Neuroscience. Accessed January 08, 2017. <http://www.jneurosci.org/content/17/13/4915.abstract>.
- Nader, Karim, Glenn E. Schafe, and Joseph E. Le Doux. *Nature* 406, no. 6797 (08, 2000): 722-26. doi:10.1038/35021052.
- Nagy, Agnes, and Antonio V. Delgado-Escueta. "Rapid Preparation of Synaptosomes from Mammalian Brain Using Nontoxic Isoosmotic Gradient Material (Percoll)." *Journal of Neurochemistry* 43, no. 4 (10 1984): 1114-123. doi:10.1111/j.1471-4159.1984.tb12851.x.
- Namburi, Praneeth, Ream Al-Hasani, Gwendolyn G. Calhoon, Michael R. Bruchas, and Kay

- M. Tye. "Architectural Representation of Valence in the Limbic System." *Neuropsychopharmacology* 41, no. 7 (12, 2015): 1697-715. doi:10.1038/npp.2015.358.
- Naya, Y., and W. A. Suzuki. "Integrating What and When Across the Primate Medial Temporal Lobe." *Science* 333, no. 6043 (08, 2011): 773-76. doi:10.1126/science.1206773.
- Niewalda, T., B. Michels, R. Jungnickel, S. Diegelmann, J. Kleber, T. Kahne, and B. Gerber. "Synapsin Determines Memory Strength after Punishment- and Relief-Learning." *Journal of Neuroscience* 35, no. 19 (05, 2015): 7487-502. doi:10.1523/jneurosci.4454-14.2015.
- O'keefe, J., and J. Dostrovsky. "The Hippocampus as a Spatial Map. Preliminary Evidence from Unit Activity in the Freely-moving Rat." *Brain Research* 34, no. 1 (11 1971): 171-75. doi:10.1016/0006-8993(71)90358-1.
- O'mahony, A., J. Raber, M. Montano, E. Foehr, V. Han, S.-M. Lu, H. Kwon, A. Lefevour, S. Chakraborty-Sett, and W. C. Greene. "NF- B/Rel Regulates Inhibitory and Excitatory Neuronal Function and Synaptic Plasticity." *Molecular and Cellular Biology* 26, no. 19 (09, 2006): 7283-298. doi:10.1128/mcb.00510-06.
- Ohkawa, Noriaki, Shunichiro Sugisaki, Eri Tokunaga, Kazuko Fujitani, Takahiro Hayasaka, Mitsutoshi Setou, and Kaoru Inokuchi. "N-acetyltransferase ARD1-NAT1 Regulates Neuronal Dendritic Development." *Genes to Cells*, 10 2008. doi:10.1111/j.1365-2443.2008.01235.x.
- Okuno, Hiroyuki, and Yasushi Miyashita. "Expression of the Transcription Factor Zif268 in the Temporal Cortex of Monkeys during Visual Paired Associate Learning." *European Journal of Neuroscience* 8, no. 10 (10 1996): 2118-128. doi:10.1111/j.1460-9568.1996.tb00733.x.
- Okuno, Hiroyuki, and Yasushi Miyashita. "Expression of the Transcription Factor Zif268 in

- the Temporal Cortex of Monkeys during Visual Paired Associate Learning." *European Journal of Neuroscience* 8, no. 10 (10 1996): 2118-128. doi:10.1111/j.1460-9568.1996.tb00733.x.
- Pastalkova, E., V. Itskov, A. Amarasingham, and G. Buzsaki. "Internally Generated Cell Assembly Sequences in the Rat Hippocampus." *Science* 321, no. 5894 (09, 2008): 1322-327. doi:10.1126/science.1159775.
- Pavlov, Ivan Petrovich, and W. Horsley Gantt. *Lectures on Conditioned Reflexes*. New York: Liveright, 1928.
- Paxinos, George, Keith B. J. Franklin, and Keith B. J. Franklin. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press, 2001.
- "Phrenology: The History of Brain Localization." Sabbatini, R.M.E.: Phrenology: The History of Cerebral Localization. Accessed January 27, 2017. <http://www.cerebromente.org.br/n01/frenolog/frenologia.htm>.
- Ploeger, Geke E., Berry M. Spruijt, and Alexander R. Cools. "Spatial Localization in the Morris Water Maze in Rats: Acquisition Is Affected by Intra-accumbens Injections of the Dopaminergic Antagonist Haloperidol." *Behavioral Neuroscience* 108, no. 5 (1994): 927-34. doi:10.1037//0735-7044.108.5.927.
- Pláteník, Jan, Nobuyuki Kuramoto, and Yukio Yoneda. "Molecular Mechanisms Associated with Long-term Consolidation of the NMDA Signals." *Life Sciences* 67, no. 4 (06 2000): 335-64. doi:10.1016/s0024-3205(00)00632-9.
- Pompl, Patrick N., Michael J. Mullan, Kimberly Bjugstad, and Gary W. Arendash. "Adaptation of the Circular Platform Spatial Memory Task for Mice: Use in Detecting Cognitive Impairment in the APPSW Transgenic Mouse Model for Alzheimer's Disease." *Journal of Neuroscience Methods* 87, no. 1 (02 1999): 87-95. doi:10.1016/s0165-0270(98)00169-1.
- Posner, Jonathan, James A. Russell, and Bradley S. Peterson. "The Circumplex Model of

- Affect: An Integrative Approach to Affective Neuroscience, Cognitive Development, and Psychopathology." *Development and Psychopathology* 17, no. 03 (09 2005). doi:10.1017/s0954579405050340.
- Preston, Alison R., and Howard Eichenbaum. "Interplay of Hippocampus and Prefrontal Cortex in Memory." *Current Biology* 23, no. 17 (09 2013). doi:10.1016/j.cub.2013.05.041.
- Reed, Jonathan M., and Larry R. Squire. "Impaired Recognition Memory in Patients with Lesions Limited to the Hippocampal Formation." *Behavioral Neuroscience* 111, no. 4 (1997): 667-75. doi:10.1037//0735-7044.111.4.667.
- Rescorla, Robert A. "Informational Variables in Pavlovian Conditioning." *Psychology of Learning and Motivation*, 1972, 1-46. doi:10.1016/s0079-7421(08)60383-7.
- Robbins, Trevor W., and Barry J. Everitt. "Neurobehavioural Mechanisms of Reward and Motivation." *Current Opinion in Neurobiology* 6, no. 2 (04 1996): 228-36. doi:10.1016/s0959-4388(96)80077-8.
- Rodrigues, Ricardo J., Tiago M. Alvaro, Nelson Rebola, Catarina R. Oliveira, and Rodrigo A. Cunha. "Co-localization and Functional Interaction between Adenosine A2A and Metabotropic Group 5 Receptors in Glutamatergic Nerve Terminals of the Rat Striatum." *Journal of Neurochemistry* 92, no. 3 (02 2005): 433-41. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02887.x.
- Romano, Arturo, Ramiro Freudenthal, Emiliano Merlo, and Aryeh Routtenberg. "Evolutionarily-conserved Role of the NF- $\kappa$ B Transcription Factor in Neural Plasticity and Memory." *European Journal of Neuroscience* 24, no. 6 (09 2006): 1507-516. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05022.x.
- Rudy, Jerry W. "Actin Dynamics and the Evolution of the Memory Trace." *Brain Research* 1621 (09 2015): 17-28. doi:10.1016/j.brainres.2014.12.007.
- Russo, S. J., M. B. Wilkinson, M. S. Mazei-Robison, D. M. Dietz, I. Maze, V. Krishnan, W.

- Renthal, A. Graham, S. G. Birnbaum, T. A. Green, B. Robison, A. Lesselyong, L. I. Perrotti, C. A. Bolanos, A. Kumar, M. S. Clark, J. F. Neumaier, R. L. Neve, A. L. Bhakar, P. A. Barker, and E. J. Nestler. "Nuclear Factor  $\kappa$  B Signaling Regulates Neuronal Morphology and Cocaine Reward." *Journal of Neuroscience* 29, no. 11 (03, 2009): 3529-537. doi:10.1523/jneurosci.6173-08.2009.
- Ryle, Gilbert, and Daniel C. Dennett. "The Concept of Mind." 2003. doi:10.7208/chicago/9780226922652.001.0001.
- Saha, Ramendra N., Xiaojuan Liu, and Kalipada Pahan. "Up-regulation of BDNF in Astrocytes by TNF- $\alpha$ : A Case for the Neuroprotective Role of Cytokine." *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 1, no. 3 (05, 2006): 212-22. doi:10.1007/s11481-006-9020-8.
- Salles, A., M. Boccia, M. Blake, N. Corbi, C. Passananti, C.m. Baratti, A. Romano, and R. Freudenthal. "Hippocampal Dynamics of Synaptic NF-kappa B during Inhibitory Avoidance Long-term Memory Consolidation in Mice." *Neuroscience* 291 (04 2015): 70-80. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.01.063.
- Salles, Angeles, Arturo Romano, and Ramiro Freudenthal. "Synaptic NF-kappa B Pathway in Neuronal Plasticity and Memory." *Journal of Physiology-Paris* 108, no. 4-6 (09 2014): 256-62. doi:10.1016/j.jphysparis.2014.05.002.
- Sanchez-Ponce, Diana, Mónica Tapia, Alberto Muñoz, and Juan José Garrido. "New Role of IKK $\alpha$ / $\beta$  Phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$  in Axon Outgrowth and Axon Initial Segment Development." *Molecular and Cellular Neuroscience* 37, no. 4 (04 2008): 832-44. doi:10.1016/j.mcn.2008.01.010.
- Sanders, Matthew J., Brian J. Wiltgen, and Michael S. Fanselow. "The Place of the Hippocampus in Fear Conditioning." *European Journal of Pharmacology* 463, no. 1-3 (02 2003): 217-23. doi:10.1016/s0014-2999(03)01283-4.
- Sara, S. J. "Retrieval and Reconsolidation: Toward a Neurobiology of Remembering."

- Learning & Memory* 7, no. 2 (03, 2000): 73-84. doi:10.1101/lm.7.2.73.
- Schmeisser, M. J., B. Baumann, S. Johannsen, G. F. Vindedal, V. Jensen, O. C. Hvalby, R. Sprengel, J. Seither, A. Maqbool, A. Magnutzki, M. Lattke, F. Oswald, T. M. Boeckers, and T. Wirth. "I B Kinase/Nuclear Factor B-Dependent Insulin-Like Growth Factor 2 (Igf2) Expression Regulates Synapse Formation and Spine Maturation via Igf2 Receptor Signaling." *Journal of Neuroscience* 32, no. 16 (04, 2012): 5688-703. doi:10.1523/jneurosci.0111-12.2012.
- Schmidtke, Klaus, and Heike Vollmer. "Retrograde Amnesia: A Study of Its Relation to Anterograde Amnesia and Semantic Memory Deficits." *Neuropsychologia* 35, no. 4 (02 1997): 505-18. doi:10.1016/s0028-3932(96)00109-1.
- Schmitz, M. Lienhard, Ivan Mattioli, Holger Buss, and Michael Kracht. "NF- $\kappa$ B: A Multifaceted Transcription Factor Regulated at Several Levels." *ChemBioChem* 5, no. 10 (09, 2004): 1348-358. doi:10.1002/cbic.200400144.
- Schultz, Christian, Hans-Georg König, Domenico Del Turco, Chrisoula Politi, Gunter P. Eckert, Estifanos Ghebremedhin, Jochen H.m. Prehn, Donat Kögel, and Thomas Deller. "Coincident Enrichment of Phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$ , Activated IKK, and Phosphorylated P65 in the Axon Initial Segment of Neurons." *Molecular and Cellular Neuroscience* 33, no. 1 (09 2006): 68-80. doi:10.1016/j.mcn.2006.06.008.
- Scoville, W. B. "Loss of Recent Memory after Bilateral Hippocampal Lesions." *Neurocase* 2, no. 4 (08, 1996). doi:10.1093/neucas/2.4.259-af.
- Senftleben, Uwe, and Michael Karin. "The IKK/NF- $\kappa$ B Pathway." *Critical Care Medicine* 30, no. Suppl. (01 2002). doi:10.1097/00003246-200201001-00003.
- Setlow, Barry. "The Nucleus Accumbens and Learning and Memory." *Journal of Neuroscience Research* 49, no. 5 (09, 1997): 515-21. doi:10.1002/(sici)1097-4547(19970901)49:5:3.co;2-h.
- Shadmehr, Reza, and Henry H. Holcomb. "Motor Memory Consolidation." *NeuroImage* 3,

no. 3 (06 1996). doi:10.1016/s1053-8119(96)80592-1.

Sharma, Shiv K. "Protein Acetylation in Synaptic Plasticity and Memory." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 34, no. 8 (07 2010): 1234-240. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.02.009.

Si, Jijian, Jianli Yang, Lifeng Xue, Chenhao Yang, Yixiao Luo, Haishui Shi, and Lin Lu. "Activation of NF- $\kappa$ B in Basolateral Amygdala Is Required for Memory Reconsolidation in Auditory Fear Conditioning." *PLoS ONE* 7, no. 9 (09, 2012). doi:10.1371/journal.pone.0043973.

Skinner, B. F. *Cumulative Record*. New York: Appleton-Century-Crofts, 1959.

Smith, Alexandra E., Zhili Xu, Yvonne Y. Lai, Pushkar M. Kulkarni, Ganesh A. Thakur, Andrea G. Hohmann, and Jonathon D. Crystal. "Source Memory in Rats Is Impaired by an NMDA Receptor Antagonist but Not by PSD95-nNOS Protein-protein Interaction Inhibitors." *Behavioural Brain Research* 305 (05 2016): 23-29. doi:10.1016/j.bbr.2016.02.021.

Smith, David M., and David A. Bulkin. "The Form and Function of Hippocampal Context Representations." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 40 (03 2014): 52-61. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.01.005.

Songa, Weihong, and Debomoy Lahiri. "Isolation of the Genomic Clone of the Rhesus Monkey Beta-amyloid Precursor Protein." *IUBMB Life* 46, no. 4 (11 1998): 755-64. doi:10.1080/15216549800204302.

Specht, Christian G., and Antoine Triller. "The Dynamics of Synaptic Scaffolds." *BioEssays* 30, no. 11-12 (11 2008): 1062-074. doi:10.1002/bies.20831.

Squire, L. R., and S. M. Zola. "Structure and Function of Declarative and Nondeclarative Memory Systems." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, no. 24 (11, 1996): 13515-3522. doi:10.1073/pnas.93.24.13515.

Squire, Larry R. *Fundamental Neuroscience*. Amsterdam: Elsevier / Academic Press, 2008.

- Squire, Larry R., Lisa Genzel, John T. Wixted, and Richard G. Morris. "Memory Consolidation." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7, no. 8 (08 2015). doi:10.1101/cshperspect.a021766.
- Squire, Larry R. "Memory and the Hippocampus: A Synthesis from Findings with Rats, Monkeys, and Humans." *Psychological Review* 99, no. 2 (1992): 195-231. doi:10.1037//0033-295x.99.2.195.
- Squire, Larry R., and Pablo Alvarez. "Retrograde Amnesia and Memory Consolidation: A Neurobiological Perspective." *Current Opinion in Neurobiology* 5, no. 2 (04 1995): 169-77. doi:10.1016/0959-4388(95)80023-9.
- Steiner, Pascal, Michael J. Higley, Weifeng Xu, Brian L. Czervionke, Robert C. Malenka, and Bernardo L. Sabatini. "Destabilization of the Postsynaptic Density by PSD-95 Serine 73 Phosphorylation Inhibits Spine Growth and Synaptic Plasticity." *Neuron* 61, no. 1 (01 2009): 152. doi:10.1016/j.neuron.2008.12.016.
- Stork, Oliver, and Hans-Christian Pape. "Fear Memory and the Amygdala: Insights from a Molecular Perspective." *Cell and Tissue Research* 310, no. 3 (12, 2002): 271-77. doi:10.1007/s00441-002-0656-2.
- Suh, Kwang S., Tamara T. Tatunchak, John M. Crutchley, Lindsay E. Edwards, Keith G. Marin, and Stuart H. Yuspa. "Genomic Structure and Promoter Analysis of PKC- $\delta$ ." *Genomics* 82, no. 1 (07 2003): 57-67. doi:10.1016/s0888-7543(03)00072-7.
- Sunyer, Berta, Weifei Diao, and Gert Lubec. "The Role of Post-translational Modifications for Learning and Memory Formation." *Electrophoresis* 29, no. 12 (06 2008): 2593-602. doi:10.1002/elps.200700791.
- Sutherland, R.j., and A.j. Rodriguez. "The Role of the Fornix/fimbria and Some Related Subcortical Structures in Place Learning and Memory." *Behavioural Brain Research* 32, no. 3 (04 1989): 265-77. doi:10.1016/s0166-4328(89)80059-2.
- Suzuki, Tatsuo, Shigehisa Mitake, Kuniko Okumura-Noji, Jian-Ping Yang, Toshihiro Fujii,

- and Takashi Okamoto. "Presence of NF- $\kappa$ B-like and I $\kappa$ B-like Immunoreactivities in Postsynaptic Densities." *NeuroReport* 8, no. 13 (09 1997): 2931-935. doi:10.1097/00001756-199709080-00025.
- Suzuki, Wendy A. "The Anatomy, Physiology and Functions of the Perirhinal Cortex." *Current Opinion in Neurobiology* 6, no. 2 (04 1996): 179-86. doi:10.1016/s0959-4388(96)80071-7.
- Thompson, Richard F., and William A. Spencer. "Habituation: A Model Phenomenon for the Study of Neuronal Substrates of Behavior." *Psychological Review* 73, no. 1 (1966): 16-43. doi:10.1037/h0022681.
- Thompson, Robert. "Entorhino-subicular Lesions: Amnestic Effects on an Assortment of Learned Responses in the White Rat." *Bulletin of the Psychonomic Society* 8, no. 6 (12 1976): 433-34. doi:10.3758/bf03335190.
- Thyss, Raphaël, Virginie Virolle, Véronique Imbert, Jean-François Peyron, Daniel Aberdam, and Thierry Virolle. "NF- $\kappa$ B/Egr-1/Gadd45 Are Sequentially Activated upon UVB Irradiation to Mediate Epidermal Cell Death." *The EMBO Journal* 24, no. 1 (12, 2004): 128-37. doi:10.1038/sj.emboj.7600501.
- Toledano, M. B., D. Ghosh, F. Trinh, and W. J. Leonard. "N-terminal DNA-binding Domains Contribute to Differential DNA-binding Specificities of NF-kappa B P50 and P65." *Molecular and Cellular Biology* 13, no. 2 (02 1993): 852-60. doi:10.1128/mcb.13.2.852.
- Tomita, S. "PDZ Domain-dependent Suppression of NF-kappa B/p65-induced Abeta 42 Production by a Neuron-specific X11-like Protein." *Journal of Biological Chemistry* 275, no. 17 (03, 2000): 13056-3060. doi:10.1074/jbc.c000019200.
- Tymianski M. "Emerging mechanisms of disrupted cellular signaling in brain ischemia." *Nat Neurosci.* 2011 Oct 26;14(11):1369-73. doi: 10.1038/nn.2951
- Tzschentke, Thomas M. "Measuring Reward with the Conditioned Place Preference (CPP) Paradigm: Update of the Last Decade." *Addiction Biology* 12, no. 3-4 (09 2007):

227-462. doi:10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x.

Vogt, Katrin, Ayse Yarali, and Hiromu Tanimoto. "Reversing Stimulus Timing in Visual Conditioning Leads to Memories with Opposite Valence in *Drosophila*." *Plos One* 10, no. 10 (10, 2015). doi:10.1371/journal.pone.0139797.

Voits, M., H. Fink, P. Gerhardt, and J.p. Huston. "Application of 'nose-poke Habituation' Validation with Post-trial Diazepam- and Cholecystinin-induced Hypo- and Hypermnnesia." *Journal of Neuroscience Methods* 57, no. 1 (03 1995): 101-05. doi:10.1016/0165-0270(94)00143-5.

Wahl, C., S. Liptay, G. Adler, and R. M. Schmid. "Sulfasalazine: A Potent and Specific Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B." *Journal of Clinical Investigation* 101, no. 5 (03, 1998): 1163-174. doi:10.1172/jci992.

Wellmann, H., B. Kaltschmidt, and C. Kaltschmidt. "Retrograde Transport of Transcription Factor NF-kappa B in Living Neurons." *Journal of Biological Chemistry* 276, no. 15 (11, 2000): 11821-1829. doi:10.1074/jbc.m009253200.

White, Norman M. "Reward or Reinforcement: What's the Difference?" *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 13, no. 2-3 (06 1989): 181-86. doi:10.1016/s0149-7634(89)80028-4.

Whiteside, Simon T., and Alain Israël. "I $\kappa$ B Proteins: Structure, Function and Regulation." *Seminars in Cancer Biology* 8, no. 2 (04 1997): 75-82. doi:10.1006/scbi.1997.0058.

Wiig, Kjesten A., and David K. Bilkey. "Perirhinal Cortex Lesions in Rats Disrupt Performance in a Spatial DNMS Task." *NeuroReport* 5, no. 11 (06 1994): 1405-408. doi:10.1097/00001756-199406270-00028.

Willner, P., M. Bianchin, R. Walz, M. Bueno E. Silva, M. S. Zanatta, and I. Izquierdo. "Muscimol Infused Into the Entorhinal Cortex Prior to Training Blocks the Involvement of This Area in Post-training Memory Processing." *Behavioural Pharmacology* 4, no. 2 (04 1993). doi:10.1097/00008877-199304000-00001.

- Wiltgen, Brian J., Matthew J. Sanders, Nicholas S. Behne, and Michael S. Fanselow. "Sex Differences, Context Preexposure, and the Immediate Shock Deficit in Pavlovian Context Conditioning with Mice." *Behavioral Neuroscience* 115, no. 1 (2001): 26-32. doi:10.1037//0735-7044.115.1.26.
- Winocur, Gordon. "Anterograde and Retrograde Amnesia in Rats with Dorsal Hippocampal or Dorsomedial Thalamic Lesions." *Behavioural Brain Research* 38, no. 2 (05 1990): 145-54. doi:10.1016/0166-4328(90)90012-4.
- Xia, Y., S. Shen, and I. M. Verma. "NF- B, an Active Player in Human Cancers." *Cancer Immunology Research* 2, no. 9 (09, 2014): 823-30. doi:10.1158/2326-6066.cir-14-0112.
- Xu, H., B. Jiang, L. Meng, T. Ren, Y. Zeng, J. Wu, L. Qu, and C. Shou. "N- -Acetyltransferase 10 Protein Inhibits Apoptosis through RelA/p65-regulated MCL1 Expression." *Carcinogenesis* 33, no. 6 (04, 2012): 1193-202. doi:10.1093/carcin/bgs144.
- Yang, Chih-Chao, Valerie Askanas, W. King Engel, and Renate B. Alvarez. "Immunolocalization of Transcription Factor NF- $\kappa$ B in Inclusion-body Myositis Muscle and at Normal Human Neuromuscular Junctions." *Neuroscience Letters* 254, no. 2 (09 1998): 77-80. doi:10.1016/s0304-3940(98)00657-0.
- Yang, Jianli, Jingjie Yu, Xiaojv Jia, Weili Zhu, Liyan Zhao, Suxia Li, Chunmei Xu, Chenghao Yang, Ping Wu, and Lin Lu. "Inhibition of Nuclear Factor- $\kappa$ B Impairs Reconsolidation of Morphine Reward Memory in Rats." *Behavioural Brain Research* 216, no. 2 (01, 2011): 592-96. doi:10.1016/j.bbr.2010.08.047.
- Yarali, Ayse, Thomas Niewalda, Yi-Chun Chen, Hiromu Tanimoto, Stefan Duernagel, and Bertram Gerber. "'Pain Relief' Learning in Fruit Flies." *Animal Behaviour* 76, no. 4 (10 2008): 1173-185. doi:10.1016/j.anbehav.2008.05.025.
- Ye, Junyi, Zhaoyang Yang, Candong Li, Meimei Cai, Daizhan Zhou, Qin Zhang, Yiming Wei,

- Ting Wang, and Yun Liu. "NF- $\kappa$ B Signaling and Vesicle Transport Are Correlated with the Reactivation of the Memory Trace of Morphine Dependence." *Diagnostic Pathology* 9, no. 1 (2014): 142. doi:10.1186/1746-1596-9-142.
- Yeh, S.-H. "A Requirement of Nuclear Factor-kappa B Activation in Fear-potentiated Startle." *Journal of Biological Chemistry* 277, no. 48 (09, 2002): 46720-6729. doi:10.1074/jbc.m206258200.
- Yin, J.c.p., J.s. Wallach, M. Del Vecchio, E.I. Wilder, H. Zhou, W.g. Quinn, and T. Tully. "Induction of a Dominant Negative CREB Transgene Specifically Blocks Long-term Memory in *Drosophila*." *Cell* 79, no. 1 (10 1994): 49-58. doi:10.1016/0092-8674(94)90399-9.
- Zalcman, Gisela, Noel Federman, Verónica De La Fuente, and Arturo Romano. "Nuclear Factor Kappa B-dependent Zif268 Expression in Hippocampus Is Required for Recognition Memory in Mice." *Neurobiology of Learning and Memory* 119 (03 2015): 10-17. doi:10.1016/j.nlm.2014.12.013.
- Zhong, Haihong, Reinhard E. Voll, and Sankar Ghosh. "Phosphorylation of NF- $\kappa$ B P65 by PKA Stimulates Transcriptional Activity by Promoting a Novel Bivalent Interaction with the Coactivator CBP/p300." *Molecular Cell* 1, no. 5 (04 1998): 661-71. doi:10.1016/s1097-2765(00)80066-0.
- Zhou, J. "Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 4 Expression Parallels Luteinizing Hormone Receptor Expression and Follicular Luteinization in the Primate Ovary." *Biology of Reproduction* 69, no. 1 (02, 2003): 22-29. doi:10.1095/biolreprod.102.009191.