Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Participación del sistema colinérgico y de la vía de señalización ERK/MAPKs en los procesos de reconsolidación de la memoria

Krawczyk, María del Carmen

2017

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

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

Cita tipo APA:
Krawczyk, María del Carmen. (2017). Participación del sistema colinérgico y de la vía de señalización ERK/MAPKs en los procesos de reconsolidación de la memoria. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6232_Krawczyk

Cita tipo Chicago:
Krawczyk, María del Carmen. "Participación del sistema colinérgico y de la vía de señalización ERK/MAPKs en los procesos de reconsolidación de la memoria". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6232_Krawczyk

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

U N I V E R S I D A D D E B U E N O S A I R E S

F A C U L T A D D E C I E N C I A S E X A C T A S Y N A T U R A L E S

D E P A R T A M E N T O D E F I S I O L O G Í A , B I O L O G Í A M O L E C U L A R Y C E L U L A R

Participación del Sistema Colinérgico y de la vía de señalización ERK/MAPKs en los Procesos de Reconsolidación de la Memoria.

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

MARÍA DEL CARMEN KRAWCZYK

Director de tesis: Dr. Mariano M. Boccia
Director Asistente: Dra. Mariana Feld
Consejero de Estudios: Dr. Arturo Romano
Lugar de Trabajo: Laboratorio de Neurofarmacología de los Procesos de Memoria – Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA
Laboratorio de Neurobiología de la Memoria – IFIByNE – CONICET – Facultad de Ciencias Exactas y Naturas – UBA

Buenos Aires, 22 de Marzo 2017

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la participación del sistema colinérgico, de la vía de señalización ERK/MAPKs y el posible vínculo entre las dos vías en los procesos que ocurren luego de la reactivación de una memoria de una respuesta de evitamiento inhibitorio en ratón.

Se estudió la posible participación de las proteínas ERK 1/2 en los procesos que ocurren luego de la reactivación de la memoria. Para tal fin, ratones CF-1 fueron entrenados con dos tipos de entrenamiento: entrenamiento débil y entrenamiento fuerte y, 48 h luego, su memoria fue reactivada. A distintos tiempos luego de la sesión de reactivación (15, 45 y 180 min) se evaluó el nivel de activación de las proteínas ERK1/2 hipocampales, encontrándose una activación diferencial de la proteína ERK2 citosólica dependiente del tipo de entrenamiento realizado. Por otra parte, se estudió el efecto de la administración por vía intrahipocampal (ih) de un inhibidor de esta vía luego de la reactivación de la memoria (inmediatamente y 3hs post reactivación) en los procesos de reconsolidación y persistencia de la memoria.

Asimismo, se intentó determinar si las proteínas ERK1/2 actúan como mediadoras del efecto mnésico ejercido por los receptores colinérgicos en vista de antecedentes que las proponen como punto de integración de señales en las neuronas. Se estudió entonces la activación de ERK1/2 mediada por la administración de un agonista y un antagonista de los receptores nicotínicos α7.

Por último, se prosiguió con el estudio de la participación de la vía Colinérgica en los procesos de reconsolidación de la memoria. Con esa finalidad, ratones CF-1 machos fueron entrenados en la tarea de evitamiento inhibitorio, empleando los dos tipos de estímulos. Cuarenta y ocho horas luego del entrenamiento la memoria fue reactivada inyectándose inmediatamente después agonistas y antagonistas inespecíficos para los receptores muscarínicos (RcM) porvía ih. El desempeño de los animales fue nuevamente evaluado a las 24 h. Se

observó que para ambos estímulos la administración del antagonista inespecífico Escopolamina disminuyó las latencias de entrada al compartimento, sugiriendo una modulación negativa de la memoria. Por su parte, la administración del agonista Oxotremorina, tuvo un efecto facilitador en aquellos animales entrenados con el estímulo débil; mientras que en aquellos entrenados con el estímulo fuerte disminuyó el desempeño de los mismos. Los efectos observados para ambas drogas fueron dosis- y tiempo-dependientes, así como específicos de la reactivación de la memoria. Asimismo, la disminución en el desempeño de estas drogas en animales entrenados con un estímulo fuerte fue revertida de manera dosis-dependiente al administrar cantidades crecientes de uno u otro respectivamente. Además, se estudió el subtipo de RcM involucrado en estos procesos, mediante la administración ih de antagonistas específicos de los RcM1, RcM2 y RcM3.

Los resultados detallados en la presente tesis de doctorado son originales y aportan nueva información al campo de la neurobiología del aprendizaje y la memoria. En su conjunto los mismos sugieren una participación crítica del sistema colinérgico, a partir de los receptores muscarínicos hipocampales (específicamente los subtipos RcM1 y RcM2) en los procesos de reconsolidación de la memoria. Además, la vía colinérgica involucra, al menos en parte, a la vía de ERK/MAPKs como mediadora en dichos procesos.

Palabras clave: evitamiento inhibitorio, acetilcolina, reconsolidación, persistencia, ratón

ABSTRACT

In the present work, we studied the participation of the cholinergic system, the ERK/MAPK signaling pathway and the possible link between them in the processes that have place after the reactivation of a memory using an inhibitory avoidance task paradigm in mice.

We first studied the possible involvement of ERK 1/2 proteins in the processes that occur after the reactivation of an inhibitory avoidance memory. To that end, CF-1 mice were trained in the inhibitory avoidance (IA) task, using two types of stimuli: a mild footshock or a strong footshock.Forty-eight hours later, their memory was reactivated. At different times after the reactivation session (15, 45 and 180 min), the level of phosphorylation of the ERK1 / 2 hippocampal proteins was evaluated, resulting in a differential activation of cytosolic ERK2 protein independently on the type of training performed. Furthermore, the effect of an ih ERK 1/2 phosphorylation inhibitor of this pathway after the reactivation of memory (immediately and 3h post-reactivation) was studied in both reconsolidation and memory persistence, with a decrease in performance of the animals.

Secondly, we tried to determine if the ERK1/2 proteins act as mediators of the mnesic effect exerted by the cholinergic receptors in view of the antecedents that propose them as point of integration of signals in the neurons. With that in mind, we studied the effects of the post retrieval administration of α7 nicotinic receptors´ agonist and antagonist on ERK1/2 activation levels.

Finally, we continued with the study of the participation of the Cholinergic system on memory reconsolidation processes. CF-1 male mice were trained In the IA task, forty-eight hours after training memory was reactivated and immediately afterwards mice received an ih injection of muscarinic receptors (RcM) non-specific agonist and antagonist. Mice performance was again evaluated 24 h later. Regardless of training conditions, the administration of the nonspecific antagonist scopolamine generated a decrease in animals´ performance, suggesting a negative modulation of the memory. On the other hand, the administration of the

agonist oxotremorine, displayed a facilitating effect in animals trained with the low footshock; while those trained with the strong stimulus decreased their performance. The observed effects for both drugs were dosis- and time-dependent, as well as specific of memory reactivation. Likewise, the decrease in the performance of these drugs in animals trained with a strong footshock reverted the behavioral response in a dose-dependent manner when administering increasing amounts of one or the other respectively. In addition, specific RcM subtype involved in these processes was studied by the administration of specific RcM1, RcM2 and RcM3 antagonists.

The results detailed in this PhD thesis are original and provide new information to the field of neurobiology of learning and memory. Taken together, they suggest a critical involvement of the hippocampal cholinergic system, by the muscarinic receptors (specifically the RcM1 and RcM2 subtypes), in the processes triggered after memory reconsolidation. Thus, it may involve, at least in part, the ERK / MAPKs pathway as a mediator in Processes.

Keywords: inhibitory avoidance, acetylcholine, reconsolidation, persistence, mouse.

PUBLICACIONES

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

HIPPOCAMPAL M1 AND M2 MUSCARINIC RECEPTORS MODULATE MEMORY RECONSOLIDATION OF AN INHIBITORY AVOIDANCE TASK IN MICE.

Krawczyk MC, Blake MG, Feld M, Boccia MM. Manuscrito en preparación.

RECONSOLIDATION-INDUCED MEMORY PERSISTENCE: PARTICIPATION OF LATE PHASE HIPPOCAMPAL ERK ACTIVATION.

Krawczyk MC, Navarro N, Blake MG, Romano A, Feld M, Boccia MM. Neurobiol Learn Mem. 2016 Sep; 133: 79-88. doi: 10.1016/j.nlm. 2016.06.013. PubMed PMID: 27321160.

MEMORY RECONSOLIDATION OF AN INHIBITORY AVOIDANCE TASK IN MICE INVOLVES CYTOSOLIC ERK2 BIDIRECTIONAL MODULATION.

Krawczyk MC, Blake MG, Baratti CM, Romano A, Boccia MM, Feld M. Neuroscience. 2015 May 21; 294: 227-37. doi: 10.1016/j.neuroscience. 2015.03.019. PubMed PMID: 25791227.

A mamá

A mis hermanos

A mi abuela, madrina y ahijada

Al Doc, Blake, Juli y especialmente a Bocha

Al labo de Exactas y especialmente a Mariana

A Angie, Cande, Gise, Nad, Marcos, Martín y Rodri

Al resto de mi familia y mi familia postiza

A mis amigos de la facu

A Luck, Sof y Benja

A Emi

ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima Acetilcolinesterasa
AF-DX	AF-DX116
AMPc	Adenosínmonofosfato cíclico
Arc	Gen que codifica para una proteína asociada al citoesqueleto
ARN	Ácido ribonucleico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF de sus siglas en inglés)
CaMKII	Proteína quinasa de Ca^{++} dependiente de calmodulina
CAT	Colina acetil-transferasa
Ch	Colina
CREB	Proteína de unión al elemento que responde a AMP cíclico (CREB de sus siglas en inglés)
CS	Estímulo condicionado
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
EA	Enfermedad de Alzheimer
EMSA	Ensayo del cambio en la movilidad electroforética
ERK1/2	Quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK, de sus siglas en inglés

HFS	Estímulo aversivo de intensidad fuerte
IGF2	Factor de crecimiento insulínico tipo 2
IP3	Inositoltri-fosfato
IQ	Coeficiente intelectual
JNK	Quinasa c-Jun-N-terminal
LE	Latencias de entrada
LFS	Estímulo aversivo de intensidad débil
MAPK	Proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK de sus siglas en inglés)
MCT	Memoria de corto término
MEK1/2	Quinasa-quinasa activada por mitógenos
MLA	Metilaconitina
MLT	Memoria de largo término
NMDA	Receptor N-metil-D-aspartato
NR	Grupo No Reactivado
NV	Grupo *Naïve*
Op NV	Grupo *Naïve* operado
Op T1	Grupo entrenado y operado
OXO	Oxotremorina
PD	PD098059
Piren	Pirenzepina
PKA	Proteína quinasa A

PKC	Proteína quinasa C
R	Grupo Reactivado
RcM	Receptor muscarínico
RcM M1	Subtipo de Receptor Muscarínico M1
RcM M2	Subtipo de Receptor Muscarínico M2
RcM M3	Subtipo de Receptor Muscarínico M3
RcN	Receptor Nicotínico
RcN α7	Subtipo de Receptor Nicotínico α7
SCOP	Escopolamina
SEM	Error estándar de la media
Sh	Grupo Shocked
Solifen	Solifenacina
T1	Sesión de Reactivación
T2	Sesión de Evaluación
TCAA	Transportador de Colina de alta afinidad
TEI	Tarea de Evitamiento Inhibitorio
TR	Sesión de Entrenamiento
UC	Estímulo incondicionado
USh	Grupo Unshocked
Veh	Vehículo

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Aprendizaje y Memoria 2
1.2. Tipos de Memoria 3
1.3. Tipos de aprendizaje 8
1.4. Fases de la Memoria 10
1.4.1. Consolidación de la Memoria 10
1.4.2. Reconsolidación de la Memoria 12
1.4.3. Extinción de la Memoria 14
1.4.4. Persistencia de la Memoria 15
1.5. Estructuras de Almacenamiento 16
1.5.1. Anatomía del cerebro 16
1.5.2. Hipocampo y Memoria 17
1.6. El Sistema Colinérgico 20
1.6.1. Organización del Sistema Colinérgico 20
1.6.2. Receptores Nicotínicos 23
1.6.3. Receptores Muscarínicos 24
1.6.4. Antecedentes de la vía colinérgica en memoria 26
1.7. Vías de señalización ERK/MAPKs 27
1.7.1. Características generales de la vía de MAPKs 27
1.7.2. Vías de señalización ERK 1/2 28
1.7.3. Antecedentes de ERK 1/2 en memoria 31
1.8. Antecedentes del Condicionamiento Aversivo 33
1.8.1. Tareas de Evitamiento Inhibitorio 34
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 36

2. MATERIALES Y MÉTODOS 39

2.1. Sujetos experimentales 40
2.2. Estudio comportamental 40

2.2.1. Aparato experimental 41
2.2.2. Protocolo experimental 42
2.3. Drogas empleadas 44
2.3.1. Inyecciones intra-hipocampales 44
2.4. Análisis Molecular 46
2.4.1. Realización de extractos proteicos de hipocampo 46
2.4.2. Cuantificación de la concentración de proteínas 47
2.4.3. Electroforesis: *SDS-PAGE* 48
2.4.4. Electrotransferencia 48
2.4.5. *Western Blot* 49
2.5. Análisis estadístico 51
2.5.1. Experimentos conductuales 52
2.5.2. Experimentos moleculares 52
3. **TAREA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO Y RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA** 54
3.1.1. Introducción 55
4. **RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA Y ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS ERK/MAPKS** 58
4.1. Introducción 59
4.2. Rol de la vía de señalización de ERK/MAPKs en los procesos de reconsolidación de una memoria de evitamiento inhibitorio 61
4.3. La activación de ERK2 citosólica es específica de la reactivación de una memoria de evitamiento inhibitorio 64
4.4. ¿Es la activación de ERK2 necesaria para que ocurra el proceso de reconsolidación de la memoria? 66
4.5. PD098059 afectaría a la re-estabilización de las memorias de largo término post reactivación 70

4.6. La activación diferencial de ERK2 luego de la reactivación de una memoria de evitamiento inhibitorio depende del tipo de entrenamiento empleado 72

4.7. La activación hipocampal de ERK1/2 es necesaria para la reconsolidación de una memoria débil 74

4.8. ¿Es la inhibición de ERK2 necesaria para que ocurra el proceso de reconsolidación de una memoria fuerte? 77

4.9. Cinética de activación de ERK1/2 180 minutos luego de la reactivación de una memoria de evitamiento inhibitorio 80

4.10. Discusión del capítulo 83

5. **VÍA DE ACTIVACIÓN ERK/MAPKS Y PERSISTENCIA DE LA MEMORIA** 90

5.1. Introducción 91

5.2. La activación de la vía de ERK1/2 3 h luego de la reactivación de la memoria es necesaria para la persistencia de una memoria de evitamiento inhibitorio 93

5.3. El efecto de la administración de PD098059 sobre la persistencia de una memoria de evitamiento inhibitorio es específico de la reactivación de la misma 95

5.4. Discusión del capítulo 97

6. **INTERACCIÓN ENTRE EL SISTEMA COLINÉRGICO Y LA VIA DE SEÑALIZACIÓN ERK/MAPKS** 100

6.1. Introducción 101

6.2. La administración de Colina y Metilaconitina produce un cambio en los niveles de activación de ERK1/2 en el hipocampo de ratón 104

6.3. La co-administración de Colina y PD098059 revierte el deterioro en el desempeño producto de la sola administración de Colina 112

6.4. Discusión del capítulo 115

7. **EL SISTEMA COLINÉRGICO Y LA RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA** 120

7.1. Introducción 121

7.2. Participación de la vía colinérgica muscarínica en los procesos de reconsolidación de una memoria de evitamiento inhibitorio 122

7.3. Los efectos de Oxotremorina y Escopolamina son observados específicamente a partir de la reactivación de la memoria de evitamiento inhibitorio 125

7.4. Los efectos de Oxotremorina y Escopolamina en los procesos de reconsolidación de una memoria de evitamiento inhibitorio son tiempo-específicos luego de la reactivación de la misma 127

7.5. Interacción farmacológica entre Oxotremorina y Escopolamina 129

7.6. Los subtipos de RcM M1 y M2 estarían involucrados en los procesos desencadenados por la reactivación de una memoria de evitamiento inhibitoria 134

7.7. Los efectos de Pirenzepina y AF-DX116 perduran, al menos por 21 días 142

7.8. Discusión del capítulo 144

8. **DISCUSIÓN GENERAL** 150

8.1. Recapitulación de los resultados obtenidos 151

8.2. ¿Por qué estudiar el proceso de reconsolidación de la memoria? 155

8.3. Vías Colinérgica y ERK/MAPKs en la Enfermedad de Alzheimer 157

9. **BIBLIOGRAFÍA** 160

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. APRENDIZAJE Y MEMORIA

A lo largo de los años, se ha atribuido el comportamiento del ser humano a diversas causas, tanto internas como externas a cada individuo en particular. Las causas internas han abarcado desde entidades metafísicas, como el alma, hasta estructuras hipotéticas del sistema nervioso. Las causas externas han incluido (entre diversas variantes) el efecto de la luna y de las mareas, la posición de las estrellas y los caprichos de los dioses. Sin embargo, lo que todas estas explicaciones tienen en común es que ninguna puede ser validada mediante el método científico.

Surge entonces la necesidad de estudiar al comportamiento a partir de la observación y experimentación controlada, proveyendo un marco científico para una mejor comprensión acerca de qué nos lleva a modificarlo, permitiéndonos predecir acontecimientos futuros y adaptarnos al ambiente en el que vivimos. Más aún, el comportamiento, como herramienta de estudio, nos brindó la posibilidad de estudiar fenómenos complejos y de gran relevancia para el ser humano como son el aprendizaje y la memoria, el lugar donde se almacena y qué mecanismos permiten recordar u olvidar.

Nos referiremos al aprendizaje como un cambio adaptativo en el comportamiento de un organismo como resultado de una experiencia comportamental (Thorne, 1953). En la definición propuesta se utiliza el término “organismo” y no “ser humano” dado que cambios en el comportamiento basados en experiencias de la vida cotidiana pueden observarse en casi todos los miembros del reino animal.

La memoria es, por consiguiente, la retención en el tiempo de la información que guía dicho cambio comportamental. Si bien el aprendizaje es el proceso por el cual un

organismo puede adaptarse a nuevas situaciones (mediante la adquisición de nueva información), la memoria es aquello que permite que dichos cambios subsistan. Podemos definirla entonces como un "conjunto de procesos neurobiológicos involucrados en el almacenamiento, mantenimiento y recuperación de la información adquirida" (Zornetzer et al., 1978). Más aún, podemos decir que es la representación interna de la información adquirida, que se halla codificada espacio-temporalmente en circuitos neuronales, mediante cambios en las propiedades reactivas de las neuronas (Dudai, 2002a). Como ya estableció Dudai años atrás, no toda representación interna que guía al comportamiento de un organismo es una memoria; sino que puede tratarse de construcciones innatas, codificadas en genes y establecidas durante el desarrollo del organismo, aún en ausencia de un aprendizaje.

La pregunta que surge de las definiciones recién expuestas es ¿cómo podemos medir la memoria de un organismo para su estudio? Si un cambio en el comportamiento de un organismo antes y después de una situación de aprendizaje (donde puede o no adquirir nueva información) es observable y cuantificable, el determinar si se ha adquirido o no la información sólo puede ser inferido. En otras palabras, el aprendizaje y su posible consecuencia, la memoria, no pueden ser medidos; sólo pueden ser inferidas a partir de cambios en el comportamiento. Esta limitación es aplicable a todos los organismos, inclusive a los propios seres humanos (Cahill et al., 2001).

1.2. TIPOS DE MEMORIA

Si uno tomara al tiempo como patrón de clasificación, los distintos tipos de

memorias podrían ser clasificadas, según su duración, en: memorias sensoriales, memorias de trabajo, memorias de corto plazo y memorias de largo plazo. Las memorias sensitivas son aquellas generadas a partir de los sentidos (gusto, tacto, visión, audición y olfacción). Estas memorias, generalmente llamadas memorias inmediatas, parecen actuar como "puerta de entrada" a las memorias de corto y largo plazo. Las memorias de trabajo son de muy corta duración (en el orden de milisegundos a segundos) y son las utilizadas para realizar tareas que requieran mantener y manipular cierta información disponible por un período breve de tiempo (Adams and Sweatt, 2002; Baddeley, 2012).

Sin embargo, los dos tipos de memoria más estudiados inicialmente, han sido las memorias de corto término (MCT) y las memorias de largo término (MLT). Las MCT pueden durar desde minutos a varias horas, dependiendo de la especie en estudio. Si bien no son almacenadas por largos períodos, poseen un rol central en la vida de los animales (Izquierdo et al., 1998). En cambio, las MLT son aquellas que se almacenan por largos períodos de tiempo, pudiendo durar días, meses, años o incluso toda la vida del animal (Figura 1.1). Dichas memorias, a su vez, pueden clasificarse según sus características particulares y las estructuras neurales involucradas (McGaugh, 2000). Ambos tipos de memoria pueden distinguirse entre sí por los procesos moleculares implicados durante la formación de las mismas. Así, la MCT involucra vías de señalización intracelular y modificaciones post traduccionales en proteínas ya existentes (Sutton et al., 2004; entre otros), mientras que la MLT implica, además, síntesis de proteínas e inducción de expresión génica (proveniente tanto de la traducción de ARNs mensajeros preexistentes, como de la transcripción) (Montarolo

et al., 1986; Pedreira et al., 1996).

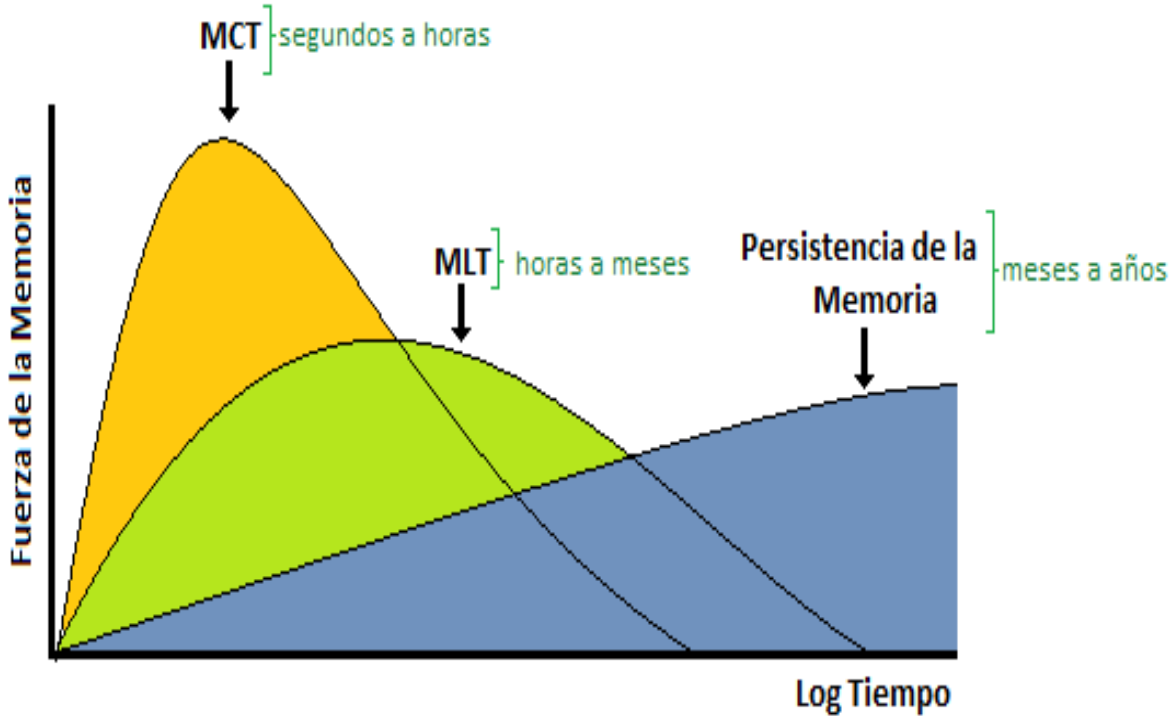

Figura 1.1. Esquema representativo de los distintos tipos de memoria en función del tiempo de almacenamiento. La hipótesis de las dos trazas sugiere que las MCT y las MLT, en sus diferentes estadíos (MLT y persistencia), serían la consecuencia de procesamientos paralelos y posiblemente independientes. Esto implicaría que, para que se consolide una MLT, no es necesario que la misma exista primero como MCT. Este modelo se sustenta en trabajos en los que diversos tratamientos farmacológicos o comportamentales pudieron bloquear selectivamente la formación de MCT sin alterar la formación de MLT, y viceversa. La persistencia de la memoria por meses, años o durante la vida del sujeto en estudio dependería de interacciones entre sistemas cerebrales (por ej., hipocampo y corteza) reorganizando y estabilizando nuevas conexiones. Adaptado de McGaugh, 2000.

Estos mecanismos moleculares y celulares que sustentan las memorias de largo y corto término parecen servir a las distintas fases de la memoria de acuerdo con la necesidad temporal y la duración de las mismas.

Para el estudio del aprendizaje y la memoria, los investigadores suelen utilizar modelos animales con el fin de aislar las funciones sensoriales y cognitivas más

relevantes de dichos procesos. Estos estudios suelen ser limitados, ya que los animales pueden utilizar funciones cognitivas y señales sensoriales no conocidas o no cuantificables por el investigador. Sin embargo, estudios en humanos con patologías definidas o accidentes cerebrales permitieron algunos de los avances más relevantes en el campo de la neurobiología de la memoria (Milner et al., 1998).

Surge así el caso HM. Henry Molaison (1926-2008), HM por sus siglas, era un joven de 27 años con un cuadro de epilepsia severa o crítica, cuya familia opta por una cirugía radical para intentar destruir el foco epiléptico. El médico cirujano, William Scoville, decidió remover el hipocampo y la corteza alrededor del mismo con la finalidad de frenar las convulsiones resistentes a los tratamientos convencionales utilizados en esa época. Henry parecía recuperarse rápidamente de su cirugía y, más importante aún, las convulsiones se redujeron en cuanto a su gravedad. Un perfil psicológico completo reveló que su coeficiente intelectual (IQ) había aumentado luego de la cirugía, que poseía percepción normal, pensamiento abstracto, razonamiento y motivación. Sin embargo, una evaluación psicológica posterior reveló que Henry sufría de una leve amnesia retrógrada (incapaz de recordar los eventos que ocurrieron dos años antes de la cirugía, o algunos de los acontecimientos ocurridos once años atrás) y de una severa amnesia anterógrada (incapaz de formar nuevos recuerdos o memorias). No obstante, su capacidad para recordar procedimientos a largo plazo estaba intacta (Dossani et al., 2015).

El caso de HM fue de gran importancia para el mundo de la neurociencia, al proporcionar información relevante sobre las patologías cerebrales, contribuyendo, además, al desarrollo de teorías sobre los procesos de memoria. Específicamente, su

capacidad para realizar tareas que requerían el uso de la MCT y la memoria de procedimiento, pero no de la memoria episódica, sugirió que las mismas involucran áreas cerebrales diferentes (Squire, 1986).

En base al estudio de HM, se realizó una de las primeras clasificaciones sobre los distintos tipos de MLT (Squire and Zola-Morgan, 1988). Así, las MLT pueden dividirse en dos grandes categorías de memoria: memorias declarativas y memorias no declarativas. Las memorias declarativas, también llamadas memorias explícitas, codifican información tanto sobre acontecimientos autobiográficos (memorias episódicas), como sobre conocimientos de hechos (memorias semánticas, (Eichenbaum and Cohen, 2004; Squire, 1992)). Estas memorias pueden formarse a partir de un único ensayo o experiencia, requieren del funcionamiento del hipocampo y áreas de la corteza adyacentes, así como de una evocación consciente en el caso de los seres humanos. Una diferencia importante entre la memoria semántica y la memoria episódica está en su relación con el tiempo. El conocimiento almacenado en la memoria semántica es independiente del tiempo (ej., recordar cuándo uno aprendió a realizar cierta tarea no es necesario para realizarla). La memoria episódica, sin embargo, requiere que el sujeto recuerde cuándo y dónde adquirió cierta información.

Por su parte, las memorias no declarativas, también conocidas como memorias implícitas, abarcan a las memorias de procedimiento, condicionamientos clásicos simples, aprendizaje perceptual y aprendizajes no asociativos (Squire and Zola-Morgan, 1988). Son llamadas así porque, en base a su clasificación en seres humanos, carecen de la cualidad de poder ser expresadas verbalmente. Las mismas son de carácter automático o reflejo, y su formación y evocación no dependen por

completo de la conciencia o de los procesos cognitivos. Estos tipos de memoria, dependientes de áreas cerebrales tales como: cerebelo, estriado y amígdala, se forman progresivamente mediante la repetición a lo largo de varios ensayos y se manifiestan como una mejora en el rendimiento del sujeto.

1.3. TIPOS DE APRENDIZAJE

El aprendizaje puede ser estudiado a múltiples niveles en diferentes organismos. Se conocen, en la actualidad, tres tipos de aprendizajes: no-asociativo, asociativo e incidental (Dudai, 2002b).

Se cree que el aprendizaje no-asociativo es la forma más básica de aprender y comprende 2 procesos: Habituación y Sensibilización. La habituación se define como la disminución gradual de la respuesta comportamental, por parte del sujeto de estudio, ante la presentación repetida de un mismo estímulo (Thompson and Spencer, 1966). En esta definición se excluyen los efectos causados por la fatiga motora, la adaptación sensorial o el daño físico (en cuyo caso se denominaría a dicho proceso adaptación). La sensibilización, por el contrario, se define como proceso por el cual se produce un aumento en la respuesta comportamental del sujeto experimental ante la presentación repetida de un estímulo. Éste estímulo, contrario al estímulo que desencadena habituación, es generalmente fuerte y nocivo para el organismo. La sensibilización, entonces, puede ser entendida como un mecanismo por el cual aumenta el estado de atención y de alerta en el organismo, disminuyendo el umbral para respuestas de defensa.

El aprendizaje asociativo requiere de la presentación y discriminación de dos estímulos diferentes cercanos en el tiempo. Existen dos categorías de aprendizaje asociativo altamente estudiados: condicionamiento clásico y condicionamiento operante.

El condicionamiento clásico o pavloviano (llamado así por el fisiólogo Ivan Pavlov, quien llevó a cabo los primeros experimentos utilizando este tipo de aprendizaje asociativo) ocurre cuando un estímulo neutral (sin significancia para el organismo, llamado estímulo condicionado -CS-) es pareado con un estímulo o refuerzo (estímulo incondicionado -US-) que desencadena una respuesta fisiológica específica (respuesta incondicionada -UR-, comportamiento que será evaluado en el experimento) (Pavlov, 1927). De esta manera, si el sujeto experimental formó una asociación CS-US, la sola presentación del estímulo condicionado debería desencadenar la respuesta incondicionada. Así, lo que antes era una respuesta incondicionada, es decir, producida sólo por el US, ahora se convierte en una respuesta condicionada producida por la presentación del CS. Por lo tanto, se dice que el sujeto ha aprendido la contingencia (de estímulos) a la que fue expuesto.

En contraposición, el condicionamiento operante no depende de un estímulo para provocar la respuesta a estudiar, sino que implica la regulación del comportamiento a partir de sus consecuencias; entonces, lo que el animal aprende es la contingencia entre su respuesta y el refuerzo (o US). El mismo requiere de comportamientos que ocurren de manera espontánea por parte del animal, así como de la ejecución de una respuesta motora del mismo. En este tipo de comportamiento el sujeto experimental decide qué respuesta llevar a cabo, mientras que el experimentador decide cuándo y

cómo reforzarla (Dudai, 2002b). Aquí, la probabilidad o intensidad de una respuesta comportamental espontánea es alterada por la presentación de un estímulo refuerzo (Skinner, 1966; Thorndike, 1898). B. F. Skinner llamó a este comportamiento condicionamiento operante porque, en una situación o escenario determinado, el comportamiento opera en el medio ambiente para producir efectos o consecuencias.

A modo de resumen, en ambos tipos de condicionamiento se manipulan estímulos y refuerzos. Sin embargo, mientras que en el condicionamiento clásico el experimentador controla los parámetros experimentales, seleccionando los estímulos a presentar; en el condicionamiento operante el sujeto experimental decide la respuesta que emite, y el experimentador decide cómo reforzarla. Asimismo, para ambos condicionamientos la contigüidad temporal (entre el CS y el US) es muy importante.

1.4. FASES DE LA MEMORIA

1.4.1. Consolidación de la memoria

Una vez finalizada la situación de aprendizaje, que eventualmente conducirá a la adquisición de la nueva información, la memoria de la experiencia atraviesa un período de labilidad antes de estabilizarse en el sistema nervioso y convertirse en una memoria de largo plazo (Gold and McGaugh, 1975; McGaugh, 2000). El proceso de estabilización de la memoria a largo plazo es conocido como consolidación de la memoria. Dicho proceso no se completa necesariamente en un período corto luego de la situación de aprendizaje; en algunos tipos de memoria la consolidación de la memoria podría continuar durante semanas, meses, incluso años (Dudai, 2000).

Dicho concepto fue acuñado por Müller y Pilzecker (Müller and Pilzecker, 1900). Así la actividad neuronal responsable de que se produzca un cambio físico que codifica una experiencia, persiste de manera lábil algún tiempo después de la misma y, como consecuencia de la actividad nerviosa persistente, dichos cambios se fijarían con más firmeza y la memoria se tornaría consolidada luego de un cierto tiempo. Si la actividad nerviosa fuera modificada por la acción de algún agente (como intervenciones farmacológicas, hipotermia, descargas eléctricas o el aprendizaje de otra tarea; Baratti et al., 2009) los cambios neuronales que codifican a la experiencia serían de diferente magnitud y la retención de dicha memoria podría ser distinta. Lo recién mencionado implica que el fenómeno de consolidación ocurre en un período acotado de tiempo (McGaugh, 1966, 2000).

Implícita en la teoría de consolidación está la idea de que una vez que una memoria se almacena en el cerebro, permanece inalterada durante toda su vida útil. Sin embargo, varios grupos a finales de los años 60 (Misanin et al., 1968; Schneider and Sherman, 1968) y principios de los 70 (DeVietti and Kirkpatrick, 1976; Lewis, 1976; Mactutus et al., 1979; Robbins and Meyer, 1970) demostraron que los tratamientos amnésicos pueden poner en peligro no sólo nuevos recuerdos, sino también recuerdos ya consolidados y reactivados previo a dicho tratamiento. Estos datos condujeron a una propuesta alternativa en la que, independientemente de la edad, los recuerdos permanecen abiertos a modificaciones tan pronto como vuelven a su estado activo, como ocurre durante la evocación (Lewis, 1979), [revisado (Fernández et al., 2016a)].

1.4.2. Reconsolidación de la Memoria

El punto de vista clásico acerca de la formación de memorias, consideraba que durante los primeros minutos posteriores a la situación de aprendizaje, el sujeto experimental forma una traza de memoria cada vez más fuerte y estable, mediante el proceso de consolidación de la memoria (Roozendaal and McGaugh, 2011). Mientras se desarrolla este proceso, la memoria es inestable y puede ser modificada. Durante años se consideró que, una vez consolidada, la memoria permanecía establemente almacenada en la corteza cerebral, no siendo susceptible a modificaciones. Sin embargo, una gran cantidad de estudios han demostrado que cuando las memorias son evocadas, de manera consciente o no, pueden ser reformuladas y actualizadas (Carbó Tano et al., 2009; Dudai, 2012; Eysenck, 1976; Fernández et al., 2016b; Forcato et al., 2014; Nader et al., 2000; Przybyslawski and Sara, 1997; Spear et al., 1990). Entonces, una vez almacenada la memoria puede ser recuperada y luego, mediante procesos de toma de decisiones, guiar el control del comportamiento (expresión de la memoria) (Blake et al., 2012).

Un desarrollo particularmente interesante fue el resurgimiento del interés en la posibilidad de que ciertos detalles de la MLT se reconsoliden cada vez que la memoria es reactivada. Nader y colaboradores (2000) reportaron que la administración de un inhibidor de la síntesis proteica, anisomicina (bloqueante de la consolidación del condicionamiento del miedo en la amígdala), genera amnesia si se administra inmediatamente después de la reactivación de una memoria ya consolidada. Este nuevo período de labilización luego de la reactivación de una memoria y su eventual re-estabilización fue llamado reconsolidación de la memoria. En 1982 Judge y Quatermain demostraron por primera vez que la estabilización de

dicha memoria, posterior a su reactivación, era dependiente de la síntesis proteica. La existencia de la reconsolidación no sólo se ha demostrado en roedores (Boccia et al., 2003, 2004; Judge and Quartermain, 1982; Nader, 2003; Nader et al., 2000; Przybyslawski et al., 1999), sino también en distintas especies tanto de vertebrados como invertebrados (Anokhin et al., 2002; Forcato et al., 2007; Hupbach et al., 2009; Pedreira and Maldonado, 2003; Pedreira et al., 2002), sugiriendo que se trata de un fenómeno conservado evolutivamente.

Cuando se habla de reconsolidación de la memoria, no se pretende implicar que dicho proceso es una recapitulación exacta de los pasos y eventos ocurridos en la consolidación de la memoria (Alberini, 2005; Sara et al., 1999; Taubenfeld et al., 2001). Varios grupos de investigación evidenciaron una disociación a nivel molecular entre los procesos de consolidación y reconsolidación de la memoria (von Hertzen and Giese, 2005; Hoeffer et al., 2011; Lee et al., 2004) [revisado (Kandel et al., 2014)]. Sin embargo, lo antedicho no descarta que ambos procesos compartan eventos, como ser la participación de determinados receptores, moduladores y vías de señalización (Baratti et al., 2009; Przybyslawski and Sara, 1997; Przybyslawski et al., 1999; Romano et al., 2006; Roullet and Sara, 1998)

Sin embargo, el proceso de reactivación / reconsolidación de la memoria no es ubicuo, y la recuperación no siempre conduce a la reactivación de la memoria o a un "estado activo" de la misma. Dicho proceso depende de varias condiciones limitantes, tales como: la fuerza del entrenamiento (Boccia et al., 2004; Suzuki et al., 2004); la edad de la memoria (Boccia et al., 2006; Milekic and Alberini, 2002); la estructura: la duración de la CS (Pedreira and Maldonado, 2003), el desajuste entre lo que se espera y lo que realmente sucede (Exton-McGuinness et al., 2015; Pedreira et al.,

2004).

1.4.3. Extinción de la memoria

Como ya ha sido mencionado, para que se dispare el proceso de reconsolidación es necesaria la reactivación de la memoria. Sin embargo, como también se mencionó, una de las condiciones limitantes de la misma es la estructura del recordatorio. En particular, dependiendo por ejemplo de su duración es posible desencadenar reconsolidación o extinción. La extinción puede definirse como la reducción o inhibición temporaria de la respuesta condicionada que tiene lugar cuando, luego de establecida una asociación CS-US, se presenta en forma reiterada o sostenida en el tiempo el CS en ausencia del US (Herry et al., 2010; Myers and Davis, 2002, 2007).

Este proceso ha sido observado en distintas especies: abejas (Sandoz and Pham-Delègue, 2004), peces (Berman and Dudai, 2001), ratones (Cain et al., 2004), conejos (Napier et al., 1992), cangrejos (Pedreira and Maldonado, 2003) y perros (Pavlov, 1927), entre otros.

A lo largo de los años se llevaron a cabo estudios en donde se evaluó la diferencia entre extinción y olvido. De ellos se desprende que la memoria de extinción no puede explicarse como un olvido de la memoria original, ya que requiere de la presentación del CS para que tenga lugar. En el olvido, por el contrario, no hay presentación del CS, sino que la disminución de la respuesta condicionada se da por el simple paso del tiempo (Herry et al., 2010).

1.4.4. Persistencia de la memoria

La mayor parte de la información adquirida está destinada a desaparecer o puede dejar una huella indetectable. Por lo tanto, la cuestión de la persistencia de la memoria es fundamental para comprender la neurobiología del aprendizaje y la memoria. Dado que los recuerdos pueden durar por largos períodos, o incluso toda una vida, para que logren persistir, los cambios celulares y moleculares deben ocurrir después de la adquisición [revisado (Bekinschtein et al., 2010)].

No existe una definición o distinción clara entre la consolidación de la memoria y la persistencia. Una vez que se consolida una memoria, puede persistir durante días, meses o años (McGaugh, 2000). Las formas persistentes de la memoria requieren mecanismos específicos, inducidos diferencialmente por condiciones particulares del aprendizaje, que justifican la estabilización remota de la memoria. Tales mecanismos no deberían ser requeridos por formas menos duraderas de memorias. Poco es lo conocido hasta el momento sobre los eventos moleculares y celulares que median las MLT o su persistencia.

Se ha demostrado que la infusión retardada de inhibidores de la síntesis de proteínas después del entrenamiento no afecta a la consolidación de la memoria (Bekinschtein et al., 2008a). Suponiendo que el sustrato molecular de la memoria no perdure durante toda la vida; el recambio de proteínas podría representar una limitación para que la memoria persista a largo plazo. En consecuencia, se sugirió que diferentes ondas de síntesis de proteínas podrían ser responsables, al menos en parte, de la persistencia de la memoria (Bekinschtein et al., 2008b, 2010). Además, se ha encontrado que los mecanismos epigenéticos, como la acetilación de las histonas,

están implicados en la determinación de la fuerza y la persistencia de la memoria (Federman et al., 2009, 2013). Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en la persistencia de la memoria luego de los procesos de consolidación y/o reconsolidación sigue siendo un tema de estudio.

La consolidación, la reconsolidación y la persistencia de la memoria son dependientes de la síntesis proteica y comparten algunas vías moleculares como BDNF, IGF2, Arc / Arg3.1, entre otras (Alonso et al., 2002; Bekinschtein et al., 2008b; Maddox and Schafe, 2011; Mizuno et al., 2000). Estos procesos implican casi las mismas áreas cerebrales, aunque en momentos críticos diferentes (Bekinschtein et al., 2008b; Bevilaqua et al., 2008; Dudai, 2012; Izquierdo et al., 2008; Medina et al., 2008). Aunque mecánisticamente estos procesos pueden parecer muy similares, es importante destacar que no necesariamente sean idénticos (Alberini et al., 2006; Lee et al., 2004; Taubenfeld et al., 2001; Tronson and Taylor, 2007).

1.5. ESTRUCTURAS DE ALMACENAMIENTO

1.5.1. Anatomía del cerebro

El sistema nervioso de los mamíferos está compuesto por el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). El SNC, que incluye el cerebro y la médula espinal, es responsable de coordinar los ajustes y reacciones del cuerpo a las condiciones externas e internas. El SNP consiste en todos los nervios que conectan el SNC con el resto del cuerpo: los órganos, los órganos de los sentidos, los músculos, los vasos sanguíneos y las glándulas. El SNP proporciona el control autonómico (automático) de los órganos internos y la información sensorial sobre la

posición del músculo y de los miembros (por ejemplo, el brazo y la pierna). También es responsable de mantener al CNS informado sobre el medio ambiente, una función que realiza a través de los sentidos (por ejemplo, el tacto, el dolor, el calor y el frío), así como la retransmisión de órdenes motoras (de movimiento) del SNC al músculo.

El lóbulo temporal medial forma parte del lóbulo temporal en el cerebro, e incluye un sistema de estructuras anatómicamente relacionadas: la región o formación hipocampal y las cortezas perirrinal, entorrinal y parahipocampal adyacentes.

1.5.2. Hipocampo y memoria

El hipocampo es una estructura involucrada en la formación / almacenamiento de las memorias episódicas (a partir de estudios realizados en humanos y roedores con lesiones en el hipocampo) y la navegación espacial (a partir del descubrimiento de las *"place cells"* y de lesiones hipocampales con consecuencias directas en la navegación espacial). Su estructura, larga y curvada, está presente en todos los mamíferos (Figura 1.2) [Revisado en (Strange et al., 2014)].

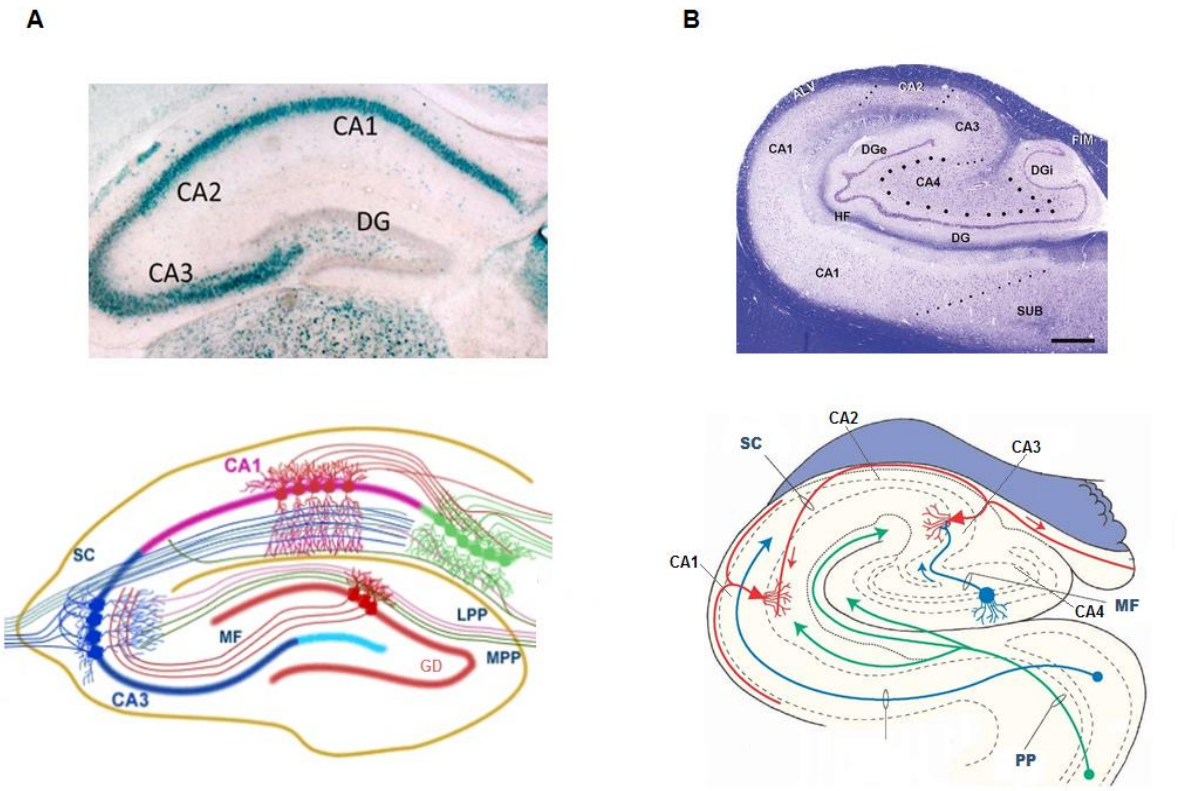

Figura 1.2. Dibujos de cortes transversales de hipocampo de ratón **(A)** y humano **(B)**. en la parte superior se encuentran fotos representativas de hipocampo de ratón y humano teñidas con Cresyl. SC: axones colaterales de Schafer, MF: fibras mossy, PP: paso perforante, GD: giro dentado. Las fotografías de microscopio fueron publicadas en Blümcke et al., 2016; Wang et al., 2012.

El hipocampo está compuesto por tres subregiones principales: CA1, CA3 y el giro dentado (GD). La corteza entorrinal, quien recibe información de diferentes áreas corticales mediante el paso perforante, proporciona el *imput* principal del hipocampo a través del GD. El GD proyecta, a su vez, a la región CA3 mediante la vía de las *mossy fibers*. Los axones de la región CA3 forman: la vía colateral de Schafer que se proyectan a CA1; y las fibras comisurales que se conectan al hipocampo contralateral. Finalmente, la región CA1 proyecta tanto al subículo como a las capas profundas de la corteza entorrinal, completando el *loop* (Figura 1.2).

A partir de estudios realizados a lo largo de los años (Dong et al., 2009; Fanselow and Dong, 2010; Thompson et al., 2008), se llegó a un modelo unificador de la función del hipocampo, en donde cada tipo de memoria depende de circuitos intra-hipocampales independientes. En estos estudios, lesiones restringidas al hipocampo dorsal generaban un deterioro en las memorias espaciales; pero no ocurría lo mismo al realizar lesiones de tamaño similar en áreas ventrales del hipocampo (Gray, 1982). Se propuso, entonces, que las regiones más ventrales del hipocampo median las respuestas emocionales (basándose en la diferencia en la densidad entre las conexiones ventrales y dorsales con la amígdala y el hipotálamo), mientras que las regiones dorsales median las funciones cognitivas (en particular, las memorias espaciales).

Existe una gran dificultad en el estudio de las memorias dependientes de hipocampo por la complejidad de los estímulos involucrados en estas memorias y las asociaciones inducidas durante el aprendizaje. En una memoria explícita típica, las claves a asociarse son complejas, siendo aún más complejo poder determinar las neuronas específicas, dentro de la red neuronal, que sufren modificaciones para formar nuevas asociaciones (Kandel et al., 2014).

En el estudio de patologías humanas, fue el caso de HM el que ubicó al hipocampo como estructura importante e imprescindible para la formación de memorias declarativas. Su estudio ha llevado a la propuesta de que el hipocampo es necesario para el proceso de consolidación de la memoria prolongado en el tiempo, que en los seres humanos puede requerir meses o incluso años [revisado (Dudai, 2002b)]. Una vez consolidadas, las memorias se independizan de la función

hipocampal, volviéndose dependientes de la corteza cerebral, proceso denominado "consolidación sistémica" (Scoville and Milner, 1957; Squire and Alvarez, 1995). Este punto de vista, sustentado también por estudios realizados en animales (Winocur, 1990), tiene sus detractores, quienes proponen que el papel del hipocampo en algunos tipos de memoria no es limitado en el tiempo (Moscovitch and Nadel, 1998).

1.6. EL SISTEMA COLINÉRGICO

1.6.1. Organización del Sistema Colinérgico

Se puede considerar al sistema colinérgico como el conjunto de fibras, tractos nerviosos y neuronas localizadas central o periféricamente, que al ser estimuladas convenientemente liberan Acetilcolina (ACh) como neurotransmisor. Los componentes del Sistema Nervioso Parasimpático son conocidos a partir de trabajos realizados desde principios del siglo XX, mientras que los conocimientos acerca del llamado Sistema Colinérgico Central son mucho más recientes. Shute y Lewis (1966) realizaron una identificación preliminar de posibles neuronas colinérgicas centrales mediante su actividad colinesterásica, proporcionando así el primer mapeo cerebral de este sistema. La utilización posterior de técnicas mucho más específicas (anticuerpos monoclonales anti-colina-acetiltransferasa, hibridación in situ, etc), confirmó en parte sus hallazgos (Mesulam et al., 1983), pero también, en algunos aspectos, los modificaron sustancialmente.

La ACh presente en los terminales sinápticos de las neuronas colinérgicas se sintetiza en el citoplasma del terminal por acción de la enzima colina-acetil-transferasa

(CAT), que cataliza la transferencia de un resto acetilo desde la acetil coenzima A (acetil-CoA, producto de la actividad mitocondrial) a la colina, Figura 1.3. La mayor parte de la colina necesaria para esta reacción proviene de su captación por el terminal presináptico a través del transportador de colina de alta afinidad (TCAA), un mecanismo específico que la cotransporta con sodio. La energía necesaria para el transporte proviene de la disipación del gradiente electroquímico del sodio, creado por la bomba Na^+/K^+ ATPasa. Este TCAA, en condiciones fisiológicas, parece ser el paso limitante en la síntesis de ACh (Jope, 1979). Una vez sintetizado, el neurotransmisor se almacena en vesículas sinápticas cuya membrana contiene proteínas que son particulares del terminal colinérgico mediante un transportador específico (Usdin et al., 1995), quedando protegida de su degradación por la acetilcolinesterasa (AChE), una enzima específica de amplia distribución, que produce la hidrólisis de la ACh liberada desde el terminal presináptico, y que constituye el único mecanismo conocido para la terminación de la acción de este neurotransmisor (Taylor, 2001).

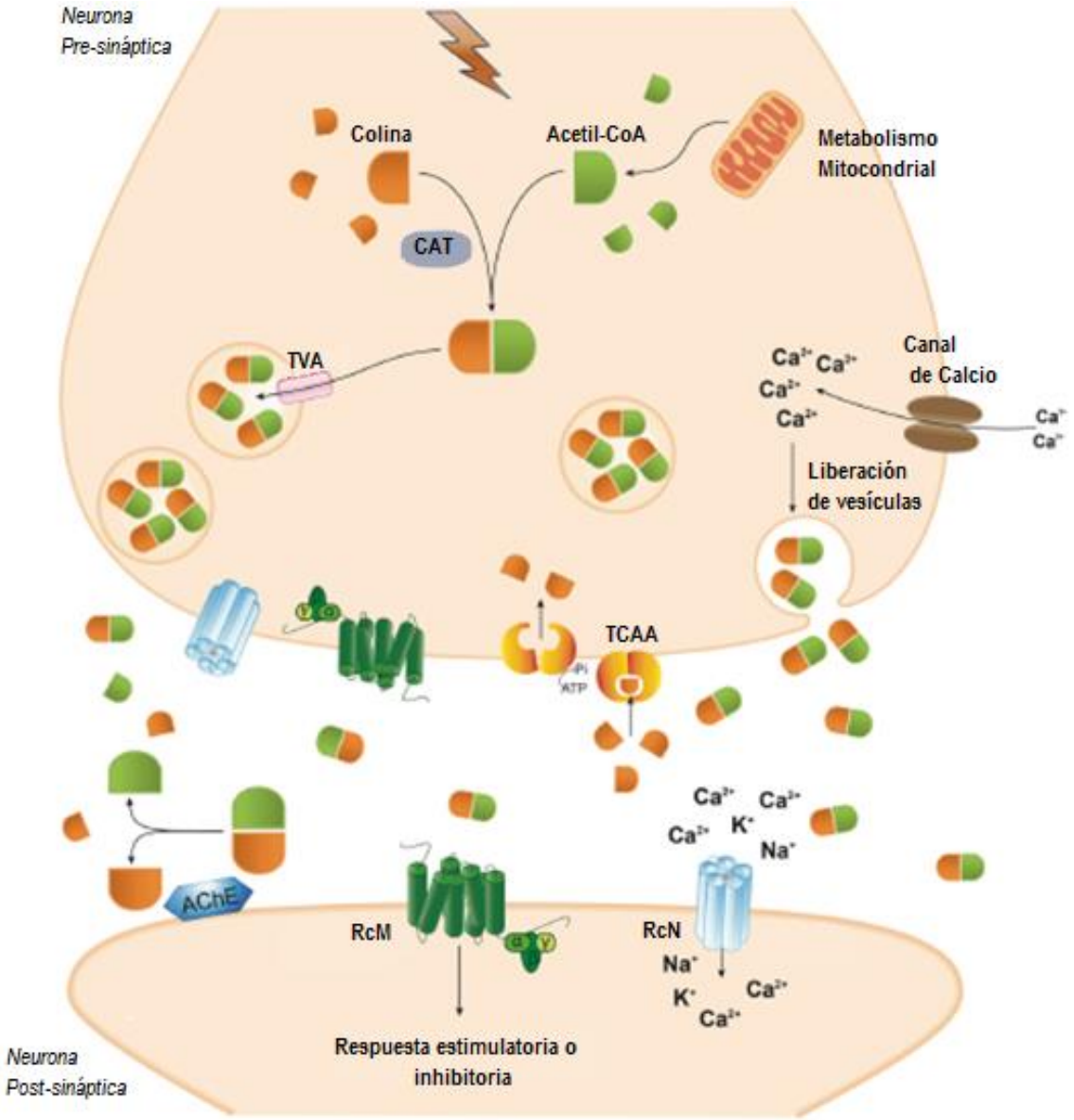

Figura 1.3. Representación esquemática de la síntesis y liberación de la Acetilcolina. La Ach se sintetiza en el citosol de las neuronas pre-sinápticas a partir de los sustratos acetil-coenzima A (Acetil-CoA) y colina mediante el funcionamiento de la enzima colina acetil transferasa (CAT) para ser luego transferida dentro de vesículas sinápticas por el transportador vesicular de acetilcolina (TVA). La despolarización de la neurona presinática promueve la exocitosis de la ACh de las vesículas sinápticas al espacio sináptico, uniéndose a RcN y RcM que se encuentran tanto en la membrana de las neuronas pre- y post-sinápticas. La ACh es rápidamente hidrolizada por la enzima acetilcolinesterasa (AChE) dando como producto final acetato y colina, el cual es recaptado dentro de la membrana pre-sináptica por el transportador de colina de alta afinidad (TCAA). Adaptado de (Ferreira-Vieira et al., 2016).

La ACh ejerce sus acciones biológicas mediante su unión a receptores específicos, localizados en las membranas pre- y post-sinápticas. Existen dos clases de receptores: los nicotínicos y los muscarínicos (Mackintosh, 1982).

Por lo tanto, la concentración de ACh en la hendidura sináptica estará determinada por: i) la actividad de la AChE y ii) el control de su liberación desde el terminal presináptico, como consecuencia de la actividad neuronal o tono colinérgico (que determina la liberación de la ACh desde el terminal), iii) por la interacción de la ACh liberada con los receptores muscarínicos presinápticos (Brown and Taylor), y iv) por la posible acción reguladora de neurotransmisores retrógrados gaseosos, como el óxido nítrico (Kopf and Baratti, 1996).

1.6.2. Receptores Nicotínicos

Los receptores nicotínicos (RcN) son canales iónicos activados por ligandos, que al unirse inducen un rápido aumento de la permeabilidad celular al Na^+ y al Ca^{2+} y, consecuentemente despolarización y excitación neuronal (Figura 1.4, Albuquerque et al., 2009). Están compuestos de cinco subunidades homólogas organizadas alrededor de un poro central y se dividen además en dos grupos: de tipo muscular y de tipo neuronal. Los RcN neuronales se expresan ampliamente en los ganglios periféricos, la médula suprarrenal, numerosas áreas del cerebro y células no neuronales (Albuquerque et al., 2009). Los receptores nicotínicos tienen estructura homo- o heteropentamérica y han estado implicados en varias funciones fisiológicas, entre ellas el aprendizaje y la memoria (Levin et al., 2006), y en varios trastornos

neuromusculares y neurodegenerativos (Taly et al., 2009).

Hasta el momento, se han identificado 12 genes de RcN neuronales: nueve α (α2-α10) y tres β (β2-β4). Las diferentes subunidades de los RcN neuronales se combinan para formar receptores funcionales. De los muchos subtipos posibles de RcN que se han descripto, los receptores α7 y α4β2 son los dos subtipos principales ampliamente expresados en el cerebro, particularmente en el hipocampo (Albuquerque et al., 2009), regulando la liberación de GABA y Glutamato (a nivel pre-sináptico) o mediando el input excitatorio (a nivel post-sináptico) (Frazier et al., 1998; Gray et al., 1996; McGehee and Role, 1995; Radcliffe et al., 1999). Estos receptores han sido implicados en varios desórdenes del SNC tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), Esquizofrenia, Depresión, Trastorno por déficit de atención e hiperactividad y Tabaquismo (Taly et al., 2009).

1.6.3 Receptores Muscarínicos

Los receptores muscarínicos (RcM) son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G por lo que las respuestas a su activación son más lentas; pudiendo ser tanto excitatorias como inhibitorias (Eglen, 2005; Langmead et al., 2008).

Se conocen por lo menos 5 subclases de RcM (M1-M5), cuyas síntesis está codificada por 5 genes diferentes (van der Zee and Luiten, 1999). Los más ampliamente distribuidos son los RcM M1, M2 y M3. Los primeros están localizados en los ganglios autonómicos y en el SNC, los segundos se localizan en el corazón y en las terminales presinápticas; por último, los RcM M3 se encuentran en el endotelio

vascular.

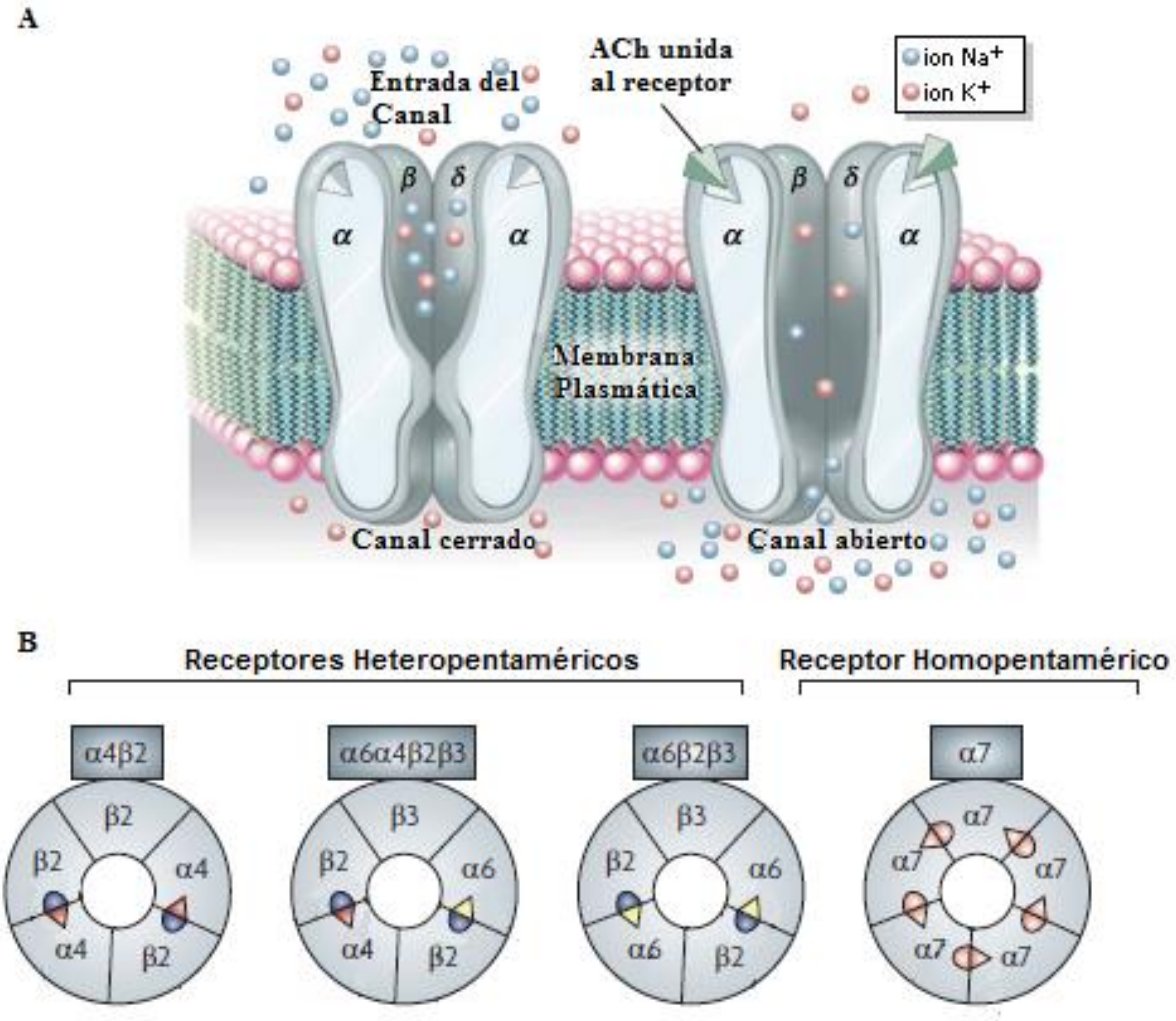

Figura 1.4. Esquema representativo del funcionamiento de los RcN (A) y de los subtipos de receptores según el tipo de unidades que lo conforman (B). Los RcN están compuestos por 5 subunidades (α, β, γ y δ) ordenados de forma simétrica con respecto a un canal central. Al unirse la ACh, se produce la apertura del canal permitiendo la difusión de Na^+ y K^+ de la célula. Adaptado de Taly et al., 2009.

En cuanto a su interacción con las proteínas G, los receptores M1, M3 y M5 interactúan con la proteína Gq, la cual conduce a la estimulación de la fosfolipasa C con la consecuente hidrólisis de fosfoinosítidos para dar inositoltrifosfato (IP3) y

diacilglicerol (DAG). Una consecuencia importante de esta vía de señalización es el aumento de Ca^{2+} intracelular, activando a las proteínas quinasa. Los RcM M2 y M4 actúan a través de la proteína Gi, inhibiendo a la adenilatociclasa y promoviendo la apertura de canales de K^{+} en ciertos tejidos excitables, como las células del marcapasos del nodo sinoauricular (van der Zee and Luiten, 1999).

Estos subtipos de receptores se encuentran en el hipocampo, modulando una diversidad de procesos (Origlia et al., 2006). Los RcM M1 se encuentran en el soma y zona dendrítica de las neuronas piramidales de las regiones CA1-CA3 y en las células granulares del GD; los RcM M2 y M4 se encuentran a nivel pre-sináptico en varias fibras, así como a nivel post-sináptico en neuronas no piramidales; los RCM M3 pueden encontrarse, aunque en baja proporción, en las neuronas piramidales y en la capa molecular externa del GD [revisado en (Giovannini et al., 2015)].

1.6.4 Antecedentes de la Vía Colinérgica en memoria

Desde un punto de vista experimental (Gold, 2003) y clínico (Mohs and Davis, 1985), prácticamente cada uno de los elementos del Sistema colinérgico central (SCC) ha sido implicado en funciones cognitivas, incluidas las asociadas con el aprendizaje y la memoria. En tal sentido han merecido atención especial los procesos de biosíntesis y degradación de la Ach (Baratti et al., 2009; Gold, 2003) y la activación de los receptores colinérgicos muscarínicos (RcM) y nicotínicos (RcN) (Levin and Rezvani, 2002; Power et al., 2003). También existen evidencias que objetan un papel primario de la Ach en el aprendizaje y la memoria (Baratti and Kopf,

1996; Baratti et al., 1989, 1993, 2009, Blake et al., 2012, 2013; Blokland, 1995; Boccia et al., 2004, 2006; Davies and Maloney, 1976; Kopf and Baratti, 1996; McGaugh, 1985, 1989; McKinney and Coyle, 1991).

Los estudios aludidos en primer término se han focalizado en la adquisición y/o la consolidación de la memoria y en menor medida en su evocación (Boccia et al., 2003; Martí Barros et al., 2004), su extinción (Mason, 1983) y en la consolidación de la extinción de la memoria (Boccia et al., 2009; Quirk and Mueller, 2008).

En este sentido, la inhibición post entrenamiento de la síntesis de ACh mediante la administración de hemicolinio-3 (HC-3), inhibidor específico del TCAA (Gardiner, 1961), lleva a un deterioro de la memoria en ratones entrenados en la TEI (Boccia et al., 2004). Si bien el efecto de HC-3 sobre la memoria es de carácter transitorio (evaluado a los 2 y 7 días post administración), el deterioro de la memoria perdura por un largo periodo (al menos 7 días). Esta disociación aparente entre la neuroquímica y el comportamiento sugeriría que los efectos de HC-3 no estarían actuando directamente en la reactivación de la memoria sino que estaría actuando en etapas tempranas de la consolidación de la misma (Boccia et al., 2004). Más aún, estos resultados sumados a trabajos experimentales y clínicos realizados en otros laboratorios sugieren un rol preponderante de la Ach en los fenómenos mnemónicos (Decker and McGaugh, 1991; Power et al., 2003).

1.7 VÍA DE SEÑALIZACIÓN ERK/MAPKs

1.7.1 Características generales de la vía de MAPKs

Como ya mencionamos, las células eucariotas responden a los cambios en su entorno a través de redes de transducción de señales complejas e interconectadas que convierten los estímulos externos en un rango de respuestas celulares. Las vías de proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK) juegan un papel clave en la transducción de señales extracelulares en respuestas intracelulares (Meloche and Roux, 2012). Se encuentran en plantas, hongos y animales (Kültz, 1998). En mamíferos, se han identificado 14 genes de MAPK que definen 7 vías de MAPK distintas. El análisis filogenético de los genes de las MAPKs sugiere que en vertebrados éstas se originaron a partir de 3 precursores y se han expandido a través de la duplicación de genes durante la evolución temprana de los vertebrados (Li et al., 2011). Esta expansión genética plantea una interesante discusión respecto de si las isoformas de MAPKs han desarrollado funciones fisiológicas únicas o se activan indistintamente para alcanzar un umbral de actividad de quinasas global [revisado en (Saba-El-Leil et al., 2016)]. Las vías mejor caracterizadas son: la vía de quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK), la vía de quinasas del extremo amino terminal de c-Jun (JNK) y la vía de quinasas p38.

1.7.2 Vía de señalización ERK 1/2

La activación y función de ERK 1/2 puede ser modulada por varios factores extracelulares como factores de crecimiento, factores neurotróficos, citoquinas, estrés celular, despolimerización de los microtúbulos, entre otras (Raman et al., 2007).

Los principales mecanismos implicados en la activación de la vía ERK 1/2 han sido bien caracterizados. En resumen (Figura 1.4), la señalización se inicia cuando un

ligando extracelular se une a un receptor tirosina quinasa específico en la membrana plasmática celular. Esto promueve la dimerización del receptor y la autofosforilación sobre residuos de tirosina intracelulares que actúan entonces como sitios de reconocimiento para proteínas que contienen los dominios de homología Src 2 (SH2) o de sitio de unión a fosfotirosina, incluyendo a las proteínas adaptadoras Shc y Grb2. Como respuesta se reclutan factores que llevan a la conversión de Ras-GDP inactivo a Ras-GTP activo. Ras-GTP activo, recluta a Raf (otra proteína G pequeña) a la membrana plasmática, donde se activa de manera compleja. Una vez activados, todos los miembros de la familia Raf son capaces de activar a MEK1/2, la cual activará a la quinasa ERK 1/2 mediante fosforilación en el segmento de activación de sus respectivos dominios quinasa. El resultado final es la fosforilación de una gran variedad de sustratos citosólicos y nucleares por parte de ERK 1/2 [revisado en (Lake et al., 2016)].

La vía de señalización de ERK 1/2 procesa información de una amplia gama de estímulos extracelulares para regular fenómenos tales como la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Pearson et al., 2001). Las isoformas ERK1 (también llamadas p44) y ERK2 (también llamadas p42) están codificadas por genes distintos, localizados en cromosomas diferentes (Li et al., 1994). Ellos están co-expresados en casi todos los tipos de células y tejidos, aunque su abundancia relativa varía considerablemente de un tejido a otro (Boulton and Cobb, 1991; Boulton et al., 1991; Frémin et al., 2015). ERK1 y ERK2 reconocen la misma secuencia primaria Ser / Thr-Pro en sus sustratos, con preferencia por una prolina en la posición P-2 (Gonzalez et al., 1991). Se conocen en la actualidad una amplia gama de sustratos

tanto citosólicos como nucleares de ambas isoformas (Courcelles et al., 2013; Yoon and Seger, 2006); sin embargo, no se ha proporcionado aún evidencia de especificidad del sustrato por alguna de las isoformas.

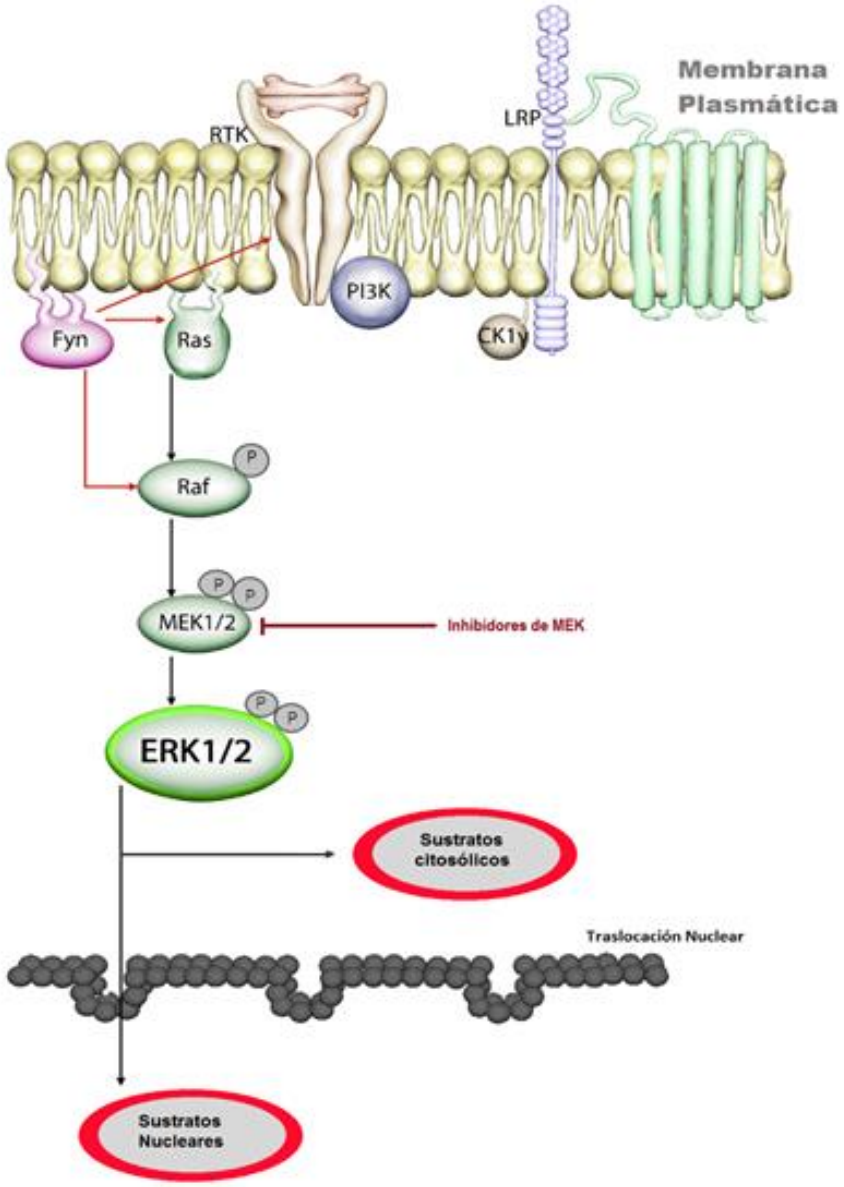

Figura 1.5. Representación de la vía de activación Raf/MEK/ERK. Los estímulos extracelulares tales como factores de crecimiento regulan diversos procesos fisiológicos activando los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptores de tirosina-quinasas, RTK), que transmiten las señales a la cascada de quinasas Raf / MEK / ERK. Tras la activación, ERK 1/2 no sólo activan / inactivan diversos sustratos citosólicos y nucleares, sino también actúa como retroalimentador negativo para las proteínas

Raf modulando la actividad de esta vía en las células. Figura adaptada de Gonsalvez et al., 2016.

La pregunta acerca de si las funciones que desempeñan ERK1 y ERK2 son específicas o actúan de forma redundante ha sido objeto de intensa investigación y controversia a lo largo de los años (Boulton et al., 1991). La falta de inhibidores farmacológicos selectivos de una u otra isoforma ha complicado el análisis de sus funciones. Sin embargo, el estudio de fenotipos mutantes de ratones *knockout* para cada isoforma evidenció grandes diferencias en cuanto a las posibles funciones de cada una. Los mutantes ERK -/- mostraron un desarrollo normal, aumento en la actividad locomotora en el *open field*, sugiriendo un fenotipo levemente hiperreactivo, y déficits en la maduración del timo (Pagès et al., 1999; Selcher et al., 2001). por su parte, los mutantes ERK2 -/- son letales a nivel del embrión (Yao et al., 2003), evidenciando un papel crucial de la isoforma ERK2 en las etapas tempranas del desarrollo embrionario que no podría ser compensado (al menos en este trabajo) por la expresión de ERK1. La expresión de mutantes defectuosos o catalíticamente inactivos de fosforilación de ERK1 o ERK2 se ha utilizado para investigar con éxito las funciones de las quinasas, pero estos mutantes ejercen efectos de interferencia dominantes en ambas isoformas (Pagès et al., 1993) [revisado en (Saba-El-Leil et al., 2016)].

1.7.3 Antecedentes de ERK 1/2 en memoria

El interés por el estudio de las MAPKs en procesos de plasticidad y memoria proviene de los mecanismos que regulan su activación y de sus sustratos. Estudios

realizados en varios organismos, incluidos vertebrados e invertebrados, sugieren que la activación de las proteínas quinasa ERK 1/2 es un evento bioquímico necesario e imprescindible para la formación de MLT, pero no así de MCT (Atkins et al., 1998; Blum et al., 1999; Crow et al., 1998; Martin et al., 1997). Trabajos realizados en mamíferos en distintas áreas cerebrales como la corteza insular (Berman et al., 1998), el hipocampo (Blum et al., 1999), la corteza entorrinal (Hebert and Dash, 2002) y la amígdala (Schafe et al., 2000) demostraron la necesidad de la activación de ERK ½ para el correcto desempeño de los sujetos experimentales en distintas tareas comportamentales. Una posible explicación podría ser el tipo de sustrato que activa, ya que media la activación, entre otros sustratos citosólicos y nucleares, del factor de transcripción CREB (Lu et al., 1999). En este sentido, inhibiciones farmacológicas y moleculares de la activación de ERK o de la función de CREB llevan a déficits en el desempeño de los animales en estudio (Adams and Sweatt, 2002; Selcher et al., 1999) [revisado en (Bitner et al., 2007)]

En el hipocampo, su activación depende de una variedad de señales extracelulares como ser factores tróficos (Gottschalk et al., 1998), activación por receptores NMDA, receptores β-adrenérgicos y receptores muscarínicos, mediados por PKC, PKA e incluso por mecanismos dependiente de AMPc, independientes de PKA (Roberson et al., 1999; de Rooij et al., 1998).

Antecedentes del laboratorio realizados con invertebrados (cangrejo *Neohelice granulata*) demuestran la participación de la vía ERK 1/2 en los procesos de consolidación de las memorias Contexto-Señal. En este modelo, la exposición al contexto de entrenamiento (control pasivo) o la estimulación visual continua (control activo) aumentó los niveles de fosforilación de ERK en la fracción proteica citosólica

obtenida inmediatamente luego del entrenamiento. Sin embargo, se observó una activación de ERK 1 h luego de un entrenamiento espaciado, que induce la formación de una MLT (Feld et al., 2005). La inhibición específica de la activación en este punto temporal indujo un deterioro de la MLT, pero no de la MCT (Feld, 2007).

Más recientemente, ERK ha sido también implicada en la reconsolidación de la memoria en roedores de tareas como el reconocimiento de objetos (Kelly et al., 2003); el condicionamiento aversivo por claves (*cued fear conditioning*) (Cestari et al., 2006; Duvarci et al., 2005) y en modelos de adicción a cocaína (Valjent et al., 2006). Sin embargo, también se ha observado que el proceso de reactivación de la memoria de una tarea de evitamiento activo en ratas, induce una regulación negativa de ERK en amígdala y corteza prefrontal (involucradas en la evocación emocional), pero no en hipocampo (Botreau and Gisquet-Verrier, 2006).

1.8 ANTECEDENTES EN CONDICIONAMIENTO AVERSIVO

El estudio del condicionamiento aversivo en animales se inició a finales de 1930, con el fin de tener una mejor comprensión de los procesos neurales/nerviosos que guían dicho comportamiento. En estos estudios comportamentales el US actúa como un refuerzo negativo, el cual puede ser: de evitación, cuando la conducta impide la presencia de un estímulo aversivo; o de escape, cuando la conducta elimina la presencia de un estímulo aversivo. Las picaduras, los ataques, los malos olores, la luz brillante y los ruidos muy fuertes son ejemplos de eventos que los organismos están dispuestos a evadir. La acción de escapar o evitar estos estímulos aversivos primarios

tuvo un gran valor de supervivencia a lo largo de los años, seguramente porque fueron los animales que desarrollaron este comportamiento los que sobrevivieron y lograron reproducirse en este ambiente (Pierce, 2004).

Existen otros tipos de eventos aversivos, los cuales en principio no desarrollarían una respuesta de escape *per sé*, salvo por estar asociados con eventos aversivos primarios de la vida del animal. En el laboratorio, el evitamiento se define como un tipo de procedimiento, dentro del condicionamiento, en el cual los sujetos aprenden a minimizar o prevenir el contacto con una conducta o CS que fue asociado temporalmente con eventos aversivos (típicamente descargas eléctricas).

Existe un amplio rango de tareas de evitamiento, las cuales pueden dividirse en dos grandes grupos: de evitamiento inhibitorio (denominado también “pasivo”) y de evitamiento activo [revisado en (LeDoux et al., 2017)]. En las tareas de evitamiento inhibitorio, el evento aversivo es evitado si el sujeto es capaz de suprimir una respuesta determinada evitando el estímulo aversivo. Las tareas de evitamiento activo, por el contrario, tienen como objetivo que el sujeto desarrolle activamente una acción para así evitar el evento aversivo.

1.8.1 Tareas de Evitamiento Inhibitorio

En las tareas de evitamiento inhibitorio, el animal aprende a suprimir una respuesta motora para evitar la exposición al contexto asociada con o predictiva del estímulo aversivo (US). De este modo se crea una situación de conflicto. Inicialmente, la presentación del US da lugar a un estado emocional de aprendizaje (miedo

condicionado), que involucra un condicionamiento clásico pavloviano, seguido de la adquisición de respuestas conductuales discretas y adaptativas (la respuesta de escape o de evitamiento). Para que la asociación entre el estímulo y la respuesta adaptativa tenga lugar, se requiere contingencia y contigüidad temporal entre el US y el estímulo sensorial o contexto utilizado como CS. Contrario a la tarea de evitamiento activo, en estas tareas no existe un CS explícito. En este sentido, el contexto del entrenamiento actúa como CS por lo que los estímulos del contexto son de suma importancia para la obtención de valores de retención óptimos en los experimentos (LeDoux, 2000).

Existe más de una variante de las tareas de evitamiento pasivas más conocidas. Estas son: "*step-down avoidance*" y "*step-through avoidance*".

La tarea "*step-through avoidance*" es una tarea de memoria emocional de un solo ensayo que combina el condicionamiento de miedo al contexto (Condicionamiento Pavloviano) con una respuesta instrumental, por ejemplo, la elección activa de un animal para evitar entrar en el compartimiento oscuro asociado con un evento/estímulo aversivo (Ogren, 1985). Esta tarea difiere del clásico condicionamiento al miedo Pavloviano en cuanto al lugar en donde se llevan a cabo las sesiones de entrenamiento y evaluación; siendo el mismo lugar o compartimento para la tarea de evitamiento pasivo.

En esta tesis se utilizará como modelo comportamental la tarea de evitamiento inhibitorio (TEI), también llamada "*step-through avoidance*". La misma se explicará en detalle en la sección materiales y métodos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta tesis es estudiar los mecanismos neurobiológicos implicados en los procesos que se desencadenan luego de la reactivación de una memoria de evitamiento inhibitorio en el hipocampo de ratón.

Como **hipótesis central** en esta tesis se postula que el Sistema Colinérgico es capaz de modular la activación de la cascada de señalización intracelular ERK/MAPKs desencadenada luego de la reactivación de la memoria a nivel del hipocampo; mecanismo necesario para que ocurra el proceso de reconsolidación de la misma. Esta hipótesis central se basó en las siguientes hipótesis particulares:

a. La vía de activación ERK 1/2 hipocampal está críticamente involucrada en los procesos de reconsolidación y persistencia de la memoria; y su participación depende del compartimiento subcelular estudiado

b. El Sistema Colinérgico modula la reconsolidación de las memorias a nivel de hipocampo, siendo su efecto dependiente de la intensidad del estímulo aversivo aplicado durante el entrenamiento.

c. La vía de activación ERK 1/2 hipocampal es crítica en el proceso de reconsolidación, mediando los efectos de la activación del receptor nicotínico del Sistema Colinérgico.

Tomando como punto de partida los antecedentes presentados en la introducción de la tesis, se plantean los siguientes objetivos específicos:

A. Estudiar la participación de la vía de ERK 1/2 en los procesos desencadenados por la reactivación de la memoria en hipocampo de ratones adultos.

1. Estudiar la participación de la vía de ERK 1/2 hipocampal en el proceso de reconsolidación de una memoria.

1.1. Estudiar la activación de las proteínas ERK 1/2 en extractos citosólicos y nucleares de animales entrenados con un estímulo débil o fuerte a distintos tiempos luego de la reactivación de la memoria.

1.1.1. Estudiar el efecto de la administración intra-hipocampal de un inhibidor específico de la fosforilación de ERK 1/2 (PD098059) a los tiempos estudiados luego de la reactivación de memorias débiles o fuertes.

2. Evaluar la participación de la vía de ERK 1/2 hipocampal en el proceso de persistencia de la memoria.

B. Estudiar el rol de los RcM en los procesos de reconsolidación de la memoria en el hipocampo de ratones adultos.

1. Establecer las correspondientes curvas dosis-respuesta luego de la administración del agonista (Oxotremorina) y antagonista (Escopolamina) muscarínicos inespecíficos sobre la reconsolidación de la memoria de la TEI.

2. Establecer las correspondientes curvas dosis-respuesta luego de la administración de antagonistas específicos de los RcM de los subtipos M1, M2 y M3 (Solifenacina, AF-DX116 y Pirenzepina, respectivamente) y sus interacciones sobre la reconsolidación de la memoria de la REI.

C. Evaluar la interacción entre la vía de ERK 1/2 y el Sistema Colinérgico, particularmente los RcN α7 en los procesos de reconsolidación de la memoria, en hipocampo de ratón.

1. Estudiar la interacción entre la vía colinérgica nicotínica y la fosforilación de las proteínas ERK 1/2 hipocampales luego de la reactivación de la memoria de la TEI.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 SUJETOS EXPERIMENTALES

Para los ensayos realizados en esta tesis se utilizaron ratones CF-1 machos provenientes de nuestro bioterio con un peso corporal aproximado de 25-30 g (Figura 2.1). Dichos animales fueron mantenidos en nuestro propio bioterio con un ciclo de luz/oscuridad de 12 hs (6 am-6 pm), y a una temperatura ambiente de 23 ± 2 ºC. Los animales tuvieron libre acceso a una dieta balanceada y al agua corriente de bebida. Dichas condiciones se mantuvieron a lo largo de todos los experimentos. La manipulación de los sujetos experimentales se realizó de acuerdo a las normas reguladoras locales y a los principios internacionales redactados en "*The National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals"* (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011).

Figura 2.1. Foto representativa de machos CF-1 criados en nuestro bioterio.

2.2 ESTUDIO COMPORTAMENTAL

Para realizar los ensayos conductuales se utilizó el modelo de tarea de evitamiento inhibitorio (TEI). En esta tarea, los sujetos experimentales tienen que

adquirir y retener, siempre y cuando sea posible, la capacidad de suprimir un comportamiento natural (la búsqueda de un ambiente oscuro) y así evitar una situación que reconocen como aversiva (descarga eléctrica en las patas). En este modelo de aprendizaje los ratones adquieren en sólo una sesión de entrenamiento la respuesta de evitamiento buscada. Dicha respuesta conductual se considera una expresión de la memoria declarativa (Cahill and McGaugh, 1998). En los trabajos que se describirán en esta tesis se empleó la variante de "*one-trial step-through inhibitory avoidance task*" (Boccia et al., 2004).

Los roedores naturalmente evitan la luz y buscan la oscuridad. Por ello, cuando son colocados en un compartimento iluminado que se comunica con otro oscuro, ingresan a este último no sólo por su predisposición a explorar, sino también por su aversión a los estímulos luminosos. Si al ingresar al compartimento oscuro se le presenta un estímulo aversivo en forma aguda, la preferencia de los roedores por la oscuridad es revertida.

2.2.1 *Aparato Experimental*

El equipo de condicionamiento fue construido en acrílico opaco negro y sus dimensiones son de 22 cm de ancho x 26 cm de alto x 26 cm de profundidad (Figura 2.2). La caja consta de un compartimento oscuro que se comunica con una plataforma acrílica blanca (5 x 5 cm), iluminada por una lámpara incandescente de 25 watts colocada 15 cm por encima de ella, siendo ésta la única fuente de iluminación durante dicha prueba conductual.

El piso del compartimento oscuro está constituido por una grilla formada con barras de acero inoxidable de 4mm de diámetro conectadas en forma alternada a un estimulador, a través de la cual los animales pueden recibir una descarga eléctrica de intensidad y duración variable en las cuatro patas.

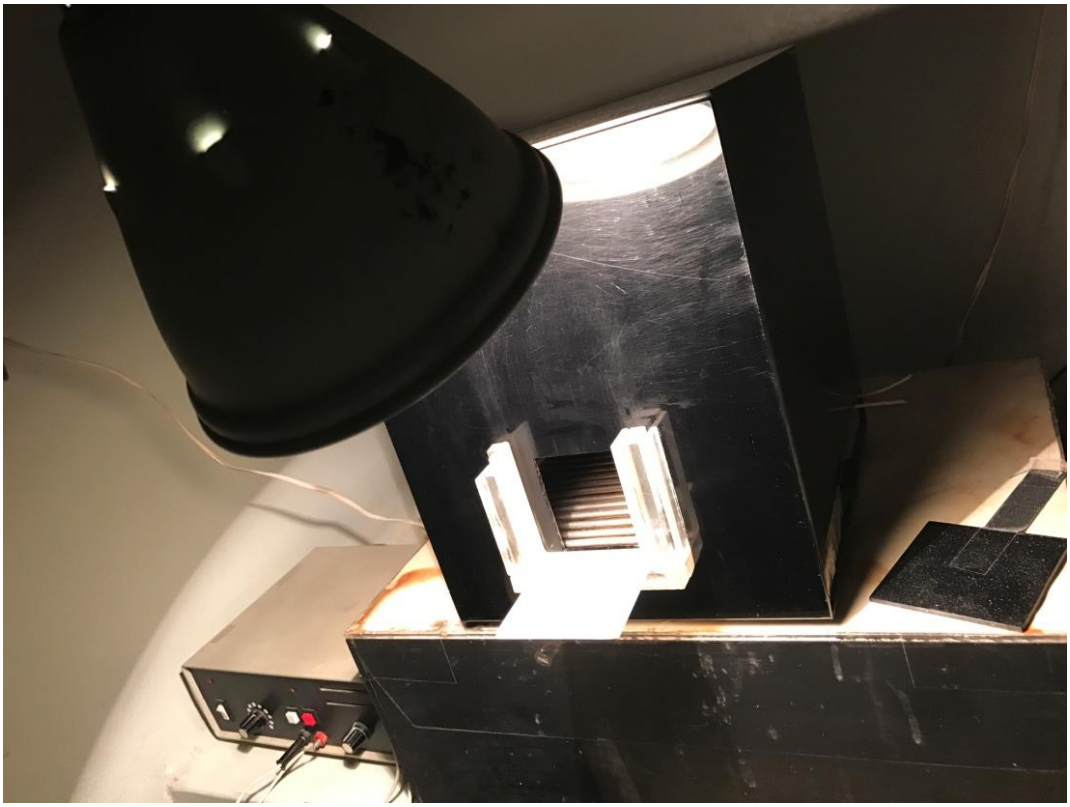

Figura 2.2. Foto representativa del equipo de condicionamiento empleado para el desarrollo de la tarea comportamental de evitamiento inhibitorio.

2.2.2 *Protocolo Experimental*

En la parte superior de cada gráfico y al inicio de cada experimento se detalla el diseño experimental utilizado. Sin embargo, a continuación, se describirá el protocolo general para el estudio de los procesos de reconsolidación de la memoria.

Durante la sesión de adquisición o entrenamiento (TR), se coloca a los animales en la plataforma iluminada y se registra el tiempo que tardan en ingresar con sus cuatro patas al compartimento oscuro (latencia de entrada al compartimento oscuro, LE). Una vez en el mismo, reciben una descarga eléctrica de intensidad variable: estímulo aversivo débil (LFS: 0.8mA, 3 s) o estímulo aversivo fuerte (HFS: 1.2 mA, 3 s). Cuarenta y ocho horas luego de la sesión de entrenamiento, los animales son nuevamente situados en la plataforma iluminada, realizándose el ensayo de reactivación de la memoria (T1). Durante el mismo, se mide el tiempo que tarda el animal en ingresar al compartimento oscuro. El ensayo finaliza cuando el animal ingresa al compartimento oscuro o bien permanece en la plataforma durante 300 s. En este último caso, se retira al animal de la plataforma y se le asigna una LE de 300 s. Al finalizar la sesión de reactivación los animales son devueltos a sus cajas-hogar. Parece oportuno aclarar que durante T1, y en ensayos subsiguientes, los animales no reciben una descarga eléctrica si ingresan al compartimento oscuro. Veinticuatro horas (72 hs luego del TR) o 7 días luego de la sesión de reactivación se lleva a cabo la sesión de evaluación (T2), en la que los animales son re-expuestos a la plataforma iluminada y se registran las LE.

En el caso de administrarse una droga o vehículo, la intervención quirúrgica y la administración se realizan a distintos tiempos (según el protocolo del experimento detallado en cada caso) post T1.

2.3 DROGAS EMPLEADAS

Las drogas utilizadas se detallan a continuación:

PROVEEDOR	ACCIÓN	ABREVIATURA	DROGA
Sigma	Inhibidor MEK1/2	PD	PD098059
Sigma	Agonista no selectivo RcM	OXO	Oxotremorina
Sigma	Antagonista no selectivo RcM	SCOP	Escopolamina
Bernabo	Antagonista específico RcM M1	Piren	Pirenzepina
K. Thomae	Antagonista específico RcM M2	AF-DX	AF-DX116
Lazar	Antagonista específico RcM M3	Solifen	Solifenacina
Sigma	Agonista específico RcN α7	Ch	Colina
Sigma	Antagonista específico de RcN α7	MLA	Metilaconitina

Todos los otros compuestos y reactivos fueron de pureza analítica y se obtuvieron a través de comercios locales. Todas las soluciones fueron preparadas inmediatamente antes de su administración. Los experimentos fueron llevados a cabo en forma ciega con respecto a los tratamientos farmacológicos.

2.3.1 *Inyecciones intra-hipocampales*

Para la administración vía intra-hipocampal de las drogas o vehículos utilizados

en la tesis se realizó una intervención quirúrgica bajo anestesia con éter. En primera instancia, se anestesia al animal en una cámara de éter durante 30s; luego, se coloca al animal en el dispositivo estereotáxico (Figura 2.3) y se realizan 2 orificios a través de la calota (AP= -4.8mm; D/I= ±1.5mm). Por último, se inyectan 0.5 µl/hipocampo de la droga o del vehículo, cuyas concentraciones se indican en cada experimento. La administración se realiza en el hipocampo dorsal (DV= -1.8 mm), mediante una aguja 30G conectada a través de una cánula plástica a una microjeringa Hamilton de 5 µl, durante 90 s.

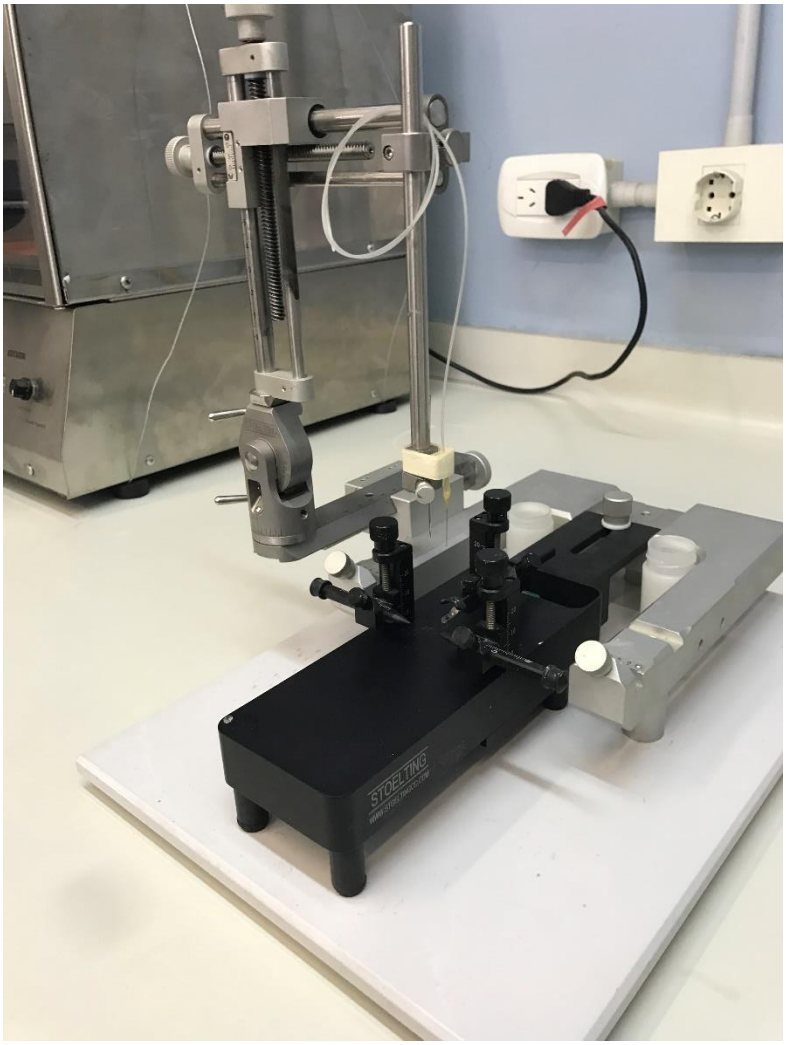

Figura 2.3. Foto representativa del estereotáxico empleado para realizar las cirugías como la inyección

del vehículo o droga.

Finalizado el experimento se sacrificaron a los animales mediante dislocación cervical y se determinó la precisión del sitio de inyección de manera macroscópica. Para ello se disecó el cerebro de los animales y se realizó un corte coronal a la altura de los orificios para observar el tracto de la aguja con una lupa.

2.4 ANÁLISIS MOLECULAR

2.4.1 *Realización de extractos proteicos de hipocampo*

Para determinar los niveles de ERK 1/2 fosforilada (pERK 1/2) y total (ERK 1/2) durante los procesos que ocurren luego de la reactivación de la memoria, se utilizó la técnica de *western blot* a partir de extractos proteicos citosólicos y nucleares de hipocampo de ratón.

Para ello, se entrena a los animales en la TEI (TR); 48h luego se someten a una sesión de reactivación (T1) y posterior a la misma, a los tiempos indicados en cada caso según el protocolo, se sacrifican los animales mediante dislocación cervical. Los cerebros son rápidamente removidos y el hipocampo completo es disecado según el método de Glowinski e Iversen (1966).

Para realizar los extractos proteicos, se utiliza un método desarrollado por Freudenthal et al., (2000). Brevemente, el hipocampo se introduce inmediatamente en un homogeneizador *Dounce* de tipo *tight* y se agregan 250 µl de buffer A (10 mM HEPES pH 7,9; 1,5 mM MgCl2; 10 mM KCl; 1 mM DTT; 1 µg/ml Pepstatina A; 10

μg/ml Leupeptina; 0,5 mM PMSF; 10 μg/ml Aprotinina). A continuación, se baja 8 veces el émbolo. Todo el procedimiento se realiza en frío. Finalmente, se coloca el homogenato en un eppendorf limpio para realizar las subsiguientes centrifugaciones diferenciales. Primero se realiza una centrifugación a 1000 g durante 15 minutos a 4 ºC. Finalizada la misma se separa el sobrenadante (fracción citosólica), se mezcla el pellet resultante con 25 μl de solución B (20 mM HEPES pH 7,9; 1,2 M KCl; 1.5 mM MgCl2; 0,4 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 50 % glicerol; 1 μg/ml Pepstatina A; 10 μg/ml Leupeptina; 0,5 mM PMSF; 10 μg/ml Aprotinina) y se deja 20 min en hielo. Por último, se realiza una segunda centrifugación a 10000 g durante 15 min a 4 ºC, luego de la cual se recupera el sobrenadante (fracción nuclear). Como resultado final se obtienen fracciones proteicas citosólicas y nucleares del hipocampo de cada animal, las cuales se guardan en freezer para su posterior análisis.

La presencia e integridad de los núcleos ha sido previamente verificada con azul de Tripán en un microscopio óptico, y se determinó, a modo de control, la presencia en los extractos de un marcador nuclear, el factor de transcripción SP1, por el ensayo de cambio en la movilidad electroforética en gel (EMSA) (Freudenthal and Romano, 2000), así como de la proteína citosólica IKK por la técnica de Western blot (Merlo et al., 2002).

2.4.2 *Cuantificación de la concentración de proteínas presentes en los extractos*

La concentración de proteína de cada extracto se midió mediante el kit de ensayo de proteína BCA, "*Pierce™ BCA Protein Assay Kit"*, utilizando el protocolo establecido

por el fabricante.

2.4.3 *Electroforesis: SDS-PAGE*

Se realizó la técnica de electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida al 12.5 % en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, *polyacrilamide gel electrophoresis*). Para la preparación de las muestras, se colocan 15 µg de proteína total de cada extracto en buffer de siembra (4x: Tris-HCl 0,25 M; SDS 8%; azul de bromofenol 0,1%; glicerol 40%; pH 6,8), y agua destilada hasta llegar a un volumen final de 20 µl; luego se las incuba a 100 ºC por 5 min e, inmediatamente, se las vuelve a colocar en hielo hasta la siembra en el gel. Como marcador de peso molecular se utilizó el *Rainbow Marker* (3 µl, Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers 250 µl RPN800E, GE Healthcare). La electroforesis se realiza durante 30 min a 80 V hasta que la muestra pasa del gel de *stacking* al gel *resolving*; y durante 1,5 h a 120 V en el gel *resolving*.

2.4.4 Electrotransferencia

Las proteínas son electrotransferidas en frío (1 h, 100 V) a membranas de PVDF (buffer de transferencia: 24,8 mM Tris base; 192 mM glicina; 10 % v/v metanol; pH 8,3). Luego de la transferencia, se chequeó la correcta transferencia de las proteínas a la membrana mediante la técnica de Ponceau. Posteriormente, se las dejó secar a temperatura ambiente y se guardaron a 4 °C para su uso.

2.4.5 *Western Blot*

Se realizaron distintas inmunomarcaciones con anticuerpos primarios anti-pERK 1/2 (proteínas ERK fosforiladas), anti-ERK 1/2 total, anti- Actina y anti-β-lamina (como control de siembra), seguidos de los respectivos anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (HRP), con la finalidad de marcar las proteínas de interés (ERK 1/2 fosforiladas y totales, respectivamente) y evaluar las cantidades de cada una de ellas presentes en los extractos obtenidos.

Para la técnica de *western blot*, las membranas se activan con metanol (15 s), se lavan con agua destilada (2 veces, 2 min cada una) y, por último, se incuban en buffer de bloqueo (leche descremada en TTBS; TTBS: 50 mM Tris base; 150 mM NaCl; pH 7,4; Tween 0,1 % v/v), durante 1 h, a temperatura ambiente con agitación. Una vez finalizado, se realizan tres lavados con buffer TTBS (3 x 5 min) y se incuban con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C con agitación. Al día siguiente, se lavan las membranas tres veces en buffer TTBS por 5 min, y luego se incuban con anticuerpo secundario anti-conejo (dilución 1:5000) acoplados a peroxidasa de rabanito (*goat anti rabbit IgG*, Santa Cruz Biotechnology) durante 45 min a temperatura ambiente con agitación. Al terminar la incubación, las membranas se lavan dos veces en TTBS y una vez en TBS (5 min / lavado).

La detección de los complejos se realizó utilizando un método quimioluminiscente y las señales fueron digitalizadas utilizando el equipo G-Box (gentilmente prestado por el Departamento de Química Biológica). A partir de dichas imágenes se estimó la densidad óptica relativa (DO) utilizando el programa ImageJ 1.48V del Instituto Nacional de Salud (NIH) de EEUU.

PROVEEDOR	DILUCIÓN	ANTICUERPO
Cell Signalling	1:2500 en TTBS	Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)
Cell Signalling	1:1000 en TTBS 5% BSA	p44/42 MAPK (Erk 1/2)
Santa Cruz Biotechnology	1:2000 en TTBS 5% leche descremada	Lamin β1: sc-56143
Santa Cruz Biotechnology	1:2000 en TTBS 5% leche descremada	Actin (I-19): sc-1616

Luego del revelado, las membranas se almacenaron en TBS a 4 °C. En los casos en los que se utilizó el mismo anticuerpo secundario fue necesario remover el complejo proteína - anticuerpo primario antes de re-incubarlas con el siguiente anticuerpo primario. Entonces, se sumergen las membranas en solución de remoción (*Stripping Buffer*: Tris-HCl 0,5 mM pH=6,7, 2-Mercaptoetanol 100 mM, SDS 10 % P/V) durante 45 min a 50 °C con agitación. Luego, se realizan lavados con agua destilada durante 1 h para remover el 2-Mercaptoetanol, ya que interfiere con la unión del anticuerpo. Finalmente, se bloquea nuevamente a las membranas en buffer de bloqueo para posterior incubación con anticuerpo secundario y revelado por quimioluminiscencia. Este paso se realiza para verificar la ausencia de marcación en las membranas.

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.5.1 *Experimentos conductuales*

Dado que los animales eran retirados de la arena comportamental si pasaban 300 s en la plataforma, sin ingresar al compartimento oscuro, se realizó un análisis estadístico no paramétrico. Se empleó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis y el ensayo de comparaciones múltiples de Dunn. En el caso de realizar comparaciones pareadas entre dos grupos se realizó el ensayo de U-Mann Whitney (dos colas) (Siegel, 1956). Los datos se expresaron como medianas e intervalos intercuartiles. Se consideraron como significativos los valores de *p* menores que 0,05.

2.5.2 *Experimentos moleculares*

La estimación de los pesos moleculares de las bandas específicas observadas para ERK1 y ERK2 se realizó por medio de una regresión lineal considerando los valores de peso molecular correspondientes a la banda de cada marcador y su movilidad relativa en el gel. De los datos obtenidos, se descartaron las muestras cuyo valor haya sido mayor o menor a 3 desvíos estándar con respecto a la media del grupo.

Para el análisis de la activación de ERK 1/2 se presentaron los datos como la relación de la densidad óptica (DO) entre las bandas específicas obtenidas con los anticuerpos contra pERK y los anticuerpos contra ERK total (ERK_f/ERK_t), obteniéndose así la densidad óptica relativa (DOR). En los gráficos, esta relación, a

su vez, se relativizó a la DOR de las bandas correspondientes al grupo *naïve* (DOR media) ± SEM. Se calculó para cada extracto una DOR_{ERK1} y DOR_{ERK2} citosólica y nuclear. Se empleó la prueba de ANOVA (1 factor) y el ensayo de comparaciones múltiples de Dunnet. Se consideró significativo si el valor de *p* era menor que 0,05.

RESULTADOS

Tarea de Evitamiento Inhibitorio

-3-

En esta sección nos ocuparemos del estudio de la reconsolidación de la memoria en una tarea de evitamiento inhibitorio y de cómo el desempeño de los sujetos experimentales varía dependiendo del tipo de entrenamiento.

3.1 INTRODUCCIÓN

Varias décadas de investigación en el campo de la neurociencia nos han provisto de un vasto conocimiento sobre la naturaleza de la formación de la memoria. Sin embargo, se sabe que la memoria no es rígida ni precisa (no refleja los hechos tal como ocurrieron) como se creía anteriormente y existen diversas explicaciones para esta aparente contradicción. El ensayo de la memoria, en ausencia de una prueba específica, nos lleva a omitir, incorporar, modificar o hasta destruir parte de la experiencia original. Estos fenómenos nos permiten considerar a la memoria como un proceso dinámico y maleable en contraposición a lo originalmente planteado. Luego de una reactivación explícita, la memoria puede ser desestabilizada, reformulada y eventualmente almacenarse incorporando dichas alteraciones al suceso original. Los procesos que ocurren en estas circunstancias fueron agrupados bajo la denominación de reconsolidación de la memoria.

En la sección materiales y métodos se describió en detalle la tarea de evitamiento inhibitorio. En esta tarea la respuesta evaluada será la latencia de entrada al compartimento oscuro, que tomaremos como índice de memoria. Sin embargo, en este punto describiremos en detalle el desempeño que se observa en los distintos tipos de entrenamientos que se utilizaran en el presente trabajo de Tesis.

Distintos experimentos en el Laboratorio de Neurofarmacología de los Procesos de Memoria (FFyB, UBA) permitieron observar variaciones en las latencias de entrada al compartimento oscuro, dependiendo de la intensidad del estímulo aversivo empleado. Así, animales entrenados con un estímulo de 0.8 mA durante 3 s (estímulo débil, LFS por sus siglas en inglés *low footshock*) presentan medianas de latencia de

entrada al compartimento oscuro de 120 s (80-200 s); mientras que animales entrenados con un estímulo de 1.2 mA durante 3 s (estímulo fuerte, HFS del inglés *high footshock*) en general no ingresan al compartimento oscuro. Estos animales, luego de 5 min en la plataforma iluminada, son retirados de la arena comportamental, finalizando así la sesión de evaluación y obteniendo medianas de latencia de entrada de 300 s. Por último, animales que son entrenados en la tarea pero que no reciben estímulo aversivo al ingresar presentan medianas de latencias de entrada de 8 s, Figura 3.1.

A partir de estos resultados, podemos decir que esta tarea comportamental presenta dos modalidades de entrenamiento que nos permiten evaluar diferentes comportamientos o memorias de largo plazo. Aquí nos referiremos a “memoria de tipo débil” o “memoria de tipo fuerte”, según la intensidad del estímulo empleado durante el entrenamiento.

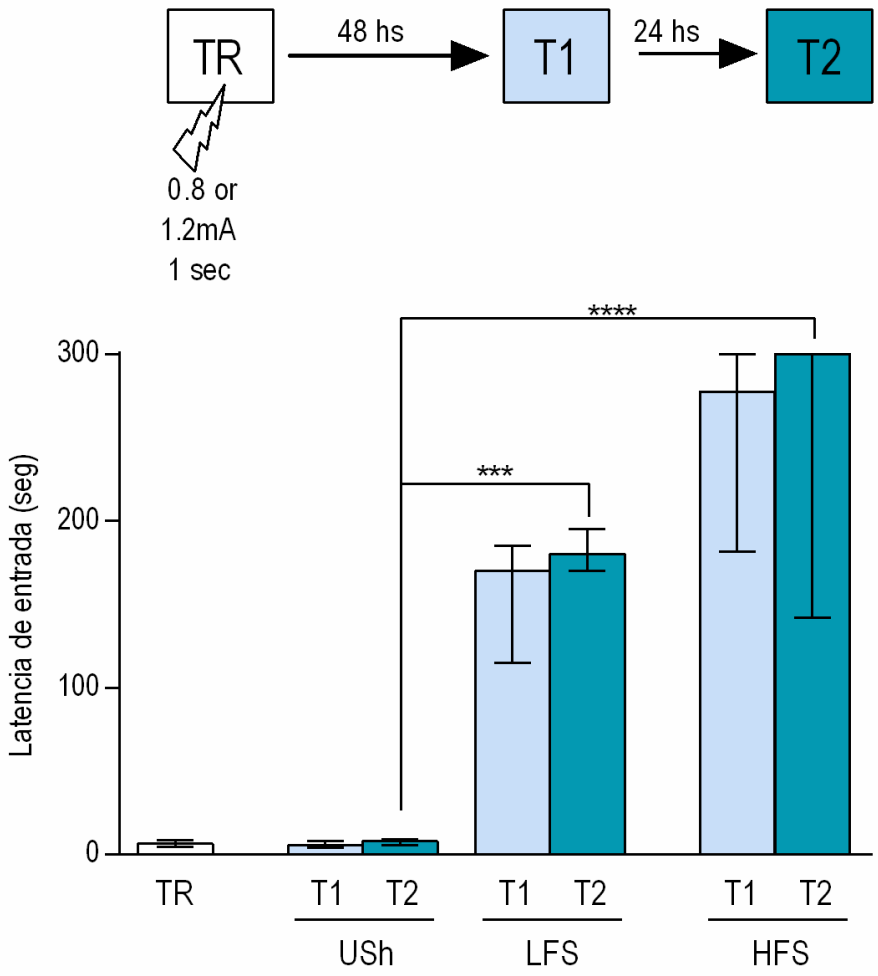

Figura 3.1. Caracterización comportamental de los distintos grupos experimentales en una tarea de evitamiento inhibitorio. Tres grupos de animales fueron entrenados en la tarea de evitamiento inhibitorio en presencia de un estímulo débil (0.8 mA, LFS), de un estímulo fuerte (1.2 mA, HFS) o en ausencia del estímulo aversivo (USh). Se representan las medianas ± espacios intercuartiles (n=8 ratones/grupo). En la parte superior del gráfico se muestra un diagrama del protocolo experimental realizado. TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación. *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ (T2 vs T2 USh; test de comparaciones múltiples de Dunn).

Reconsolidación de la memoria

Y

Vía de activación ERK/MAPKs

-4-

En esta sección nos ocuparemos de estudiar la participación de la vía de ERK/MAPKs en los procesos que ocurren luego de la reactivación de una memoria de evitamiento inhibitorio.
Parte de los resultados mostrados en este capítulo fueron publicados en la revista *Neuroscience*, Krawczyk et al. 2015.

4.1 INTRODUCCIÓN

A lo largo de los años se han involucrado a varias cascadas de señalización intracelular en procesos de aprendizaje y memoria. Entre ellas, la vía de señalización de ERK 1/2 ha sido exhaustivamente estudiada en las últimas dos décadas (Boggio et al., 2007; English and Sweatt, 1997; Sweatt, 2001; Zhai et al., 2013). Su activación en hipocampo ocurre ante una variedad de señales extracelulares como ser factores tróficos (Gottschalk et al., 1998), activación por receptores NMDA, receptores β-adrenérgicos y receptores muscarínicos, mediados por PKC, PKA e incluso por mecanismos dependiente de AMPc, independientes de PKA (Roberson et al., 1999; de Rooij et al., 1998).

Las primeras evidencias directas del papel de las MAPKs en procesos de plasticidad provienen de experimentos realizados en *Aplysia*. Kandel y col. probaron que la activación y traslocación de MAPK al núcleo y la activación de factores de transcripción es fundamental para la facilitación sináptica que subyace a la sensibilización de largo término (Martin et al., 1997). La activación de las MAPK también participa en la fosforilación e internalización de moléculas de adhesión celular (CAM) en las sinapsis, paso crítico para la instalación de cambios de largo término (Bailey et al., 1997).

En este modelo, se observó un aumento en la fosforilación de ERK 1/2 inmediatamente luego de una exposición al contexto de entrenamiento (control pasivo) o a la estimulación visual continua (control activo) que no inducen retención a largo plazo. Sin embargo, en el caso de un entrenamiento espaciado, capaz de inducir

la formación de una memoria de largo término, la activación de ERK 1/2 se observó una hora después de la finalización del mismo. En todos estos casos, la activación fue observada en la fracción proteica citosólica y no en la nuclear (Feld et al., 2005).

Si bien algunos autores destacaron el papel de ERK en los procesos de la reconsolidación de la memoria, el mismo no ha sido "universalmente" demostrado siendo aún un tema de debate (Besnard et al., 2013; Cestari et al., 2006; Duvarci et al., 2005; Kelly et al., 2003; Martijena and Molina, 2012; Miller and Marshall, 2005). En consecuencia, el primer objetivo de esta Tesis fue estudiar la participación de la vía de ERK 1/2 en los procesos desencadenados por la reactivación de la memoria en hipocampo de ratones adultos.

4.2 ROL DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE ERK/MAPKS EN LOS PROCESOS DE RECONSOLIDACIÓN DE UNA MEMORIA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO.

Como fuera descripto en la introducción de este capítulo, existen numerosas evidencias que avalan la importancia de ERK 1/2 en la modulación de la función sináptica tanto a nivel nuclear como a nivel extra-nuclear (en las uniones sinápticas). Sin embargo, no existe suficiente información acerca de la función de ésta vía en distintas localizaciones subcelulares, en los distintos procesos de memoria. Es por este motivo que decidimos estudiar la activación de ERK 1/2 en distintas localizaciones subcelulares del hipocampo de ratón luego de la reactivación de una memoria de evitamiento inhibitorio.

En base a los objetivos planteados, realizamos inicialmente extractos proteicos hipocampales citosólicos y nucleares a distintos tiempos (15, 45 min) luego de la reactivación de una memoria de tipo fuerte (entrenados con 1.2 mA) y evaluamos la activación de la vía ERK 1/2 mediante la técnica de *Western Blot*.

Para ello, 2 grupos (n=8 ratones/grupo) fueron entrenados en una tarea de evitamiento inhibitorio (TR). Un grupo recibió un estímulo fuerte, HFS (grupo Sh), mientras que el grupo restante no recibió descarga alguna (grupo USh). Cuarenta y ocho horas luego del entrenamiento, los dos grupos fueron re expuestos a la arena comportamental (T1, sesión de reactivación), siendo luego sacrificados a 15 min post-reactivación de la memoria. Un grupo adicional, llamado grupo *naïve* (NV), fue incorporado para determinar la activación basal de ERK 1/2. Finalmente, se disecaron

los hipocampos de cada ratón y se realizaron extractos citosólicos y nucleares como fue descripto en la sección Materiales y Métodos. Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes, se transfirieron a membranas de PVDF y se analizaron mediante inmunoblot con anticuerpos específicos anti- ERK total (ERK_t) y anti- ERK fosforilada (ERK_f). Se realizó el mismo experimento, pero sacrificando a los animales 45 min post reactivación de la memoria. Los resultados se muestran en la Figura 4.1.

Como se observa en la Figura 4.1, sólo se hallaron cambios significativos en los niveles de activación de ERK2 citosólicos (15 min: $F=12.22$, $p=0.0004$; 45 min: ERK2: $F=5.43$, $p=0.01$). En particular, a los 15 min, tanto el grupo Sh como el USh mostraron un aumento ($q=3.98$, grupo Sh_{15min} *vs* NV; $q=3.55$, grupo USh_{15min} *vs* NV), mientras que a los 45 min sólo el grupo Sh presentó una disminución en la activación de ERK2 ($q=2.81$, grupo Sh_{45min} *vs* NV) en comparación con sus respectivos grupos NV.

Con respecto a las fracciones nucleares, no se encontraron alteraciones en los niveles de activación de las isoformas ERK1 y ERK2 en los extractos de 15 min para ninguno de los grupos analizados (ERK1: $F=0.72$, $p=0.49$; ERK2: $F=1.63$, $p=0.22$) al compararlos con el grupo NV. De manera similar, independientemente del grupo analizado (Sh o USh), a los 45 min post reactivación no se encontraron diferencias en los niveles de fosforilación de ERK1 y ERK2 (ERK1: $F=2.49$, $p=0.11$; ERK2: $F=0.15$, $p=0.86$) con respecto al grupo control.

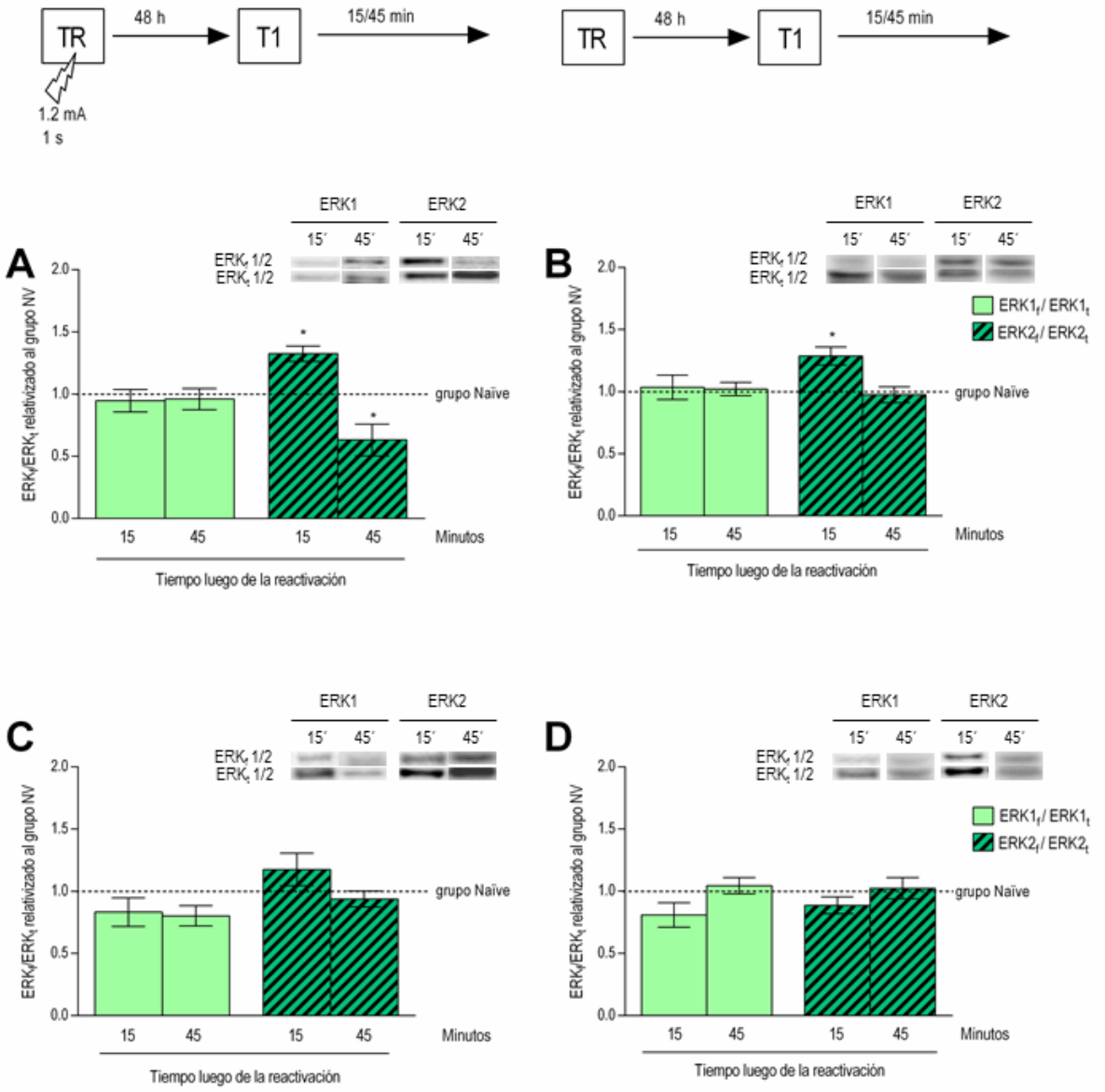

Figura 4.1. Cinética de activación de la vía ERK 1/2 en las fracciones citosólica y nuclear luego de la reactivación de una memoria fuerte de evitamiento inhibitorio en ratón. Activación de ERK 1/2 en extractos citosólicos (**A, B**) y nucleares (**C, D**) de animales entrenados con un estímulo aversivo fuerte (**A, C**) o en ausencia de un estímulo aversivo (**B, D**) y sacrificados 15 y 45 min luego de la reactivación de la memoria. Las barras indican la densidad óptica media ± error estándar de la relación ERK_f/ERK_t para las bandas específicas de la isoforma 1(barras lisas) y 2 (barras rayadas) obtenidas. * $p<0.05$ en relación al grupo, test de comparaciones múltiples de Dunnet. La línea punteada representa la media del grupo *Naïve* en cada gráfico. En la parte superior de los gráficos A y B se muestra un diagrama del protocolo experimental.

4.3 LA ACTIVACIÓN DE ERK 1/2 CITOSÓLICA ES ESPECÍFICA DE LA REACTIVACIÓN DE UNA MEMORIA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO.

A continuación, evaluamos si los cambios en los niveles de activación de ERK2 en el citosol eran específicos de los procesos inducidos por la reactivación de la memoria de evitamiento inhibitorio. Para ello, entrenamos 4 grupos de 8 animales cada uno con un HFS (TR). Cuarenta y ocho horas luego, sólo 2 grupos fueron sometidos a una sesión de reactivación (T1, grupos llamados R); los grupos restantes (grupos NR) permanecieron en su caja hogar. A los tiempos ya mencionados (15 y 45 min post reactivación de la memoria) se sacrificaron a los animales y se realizaron los extractos citosólicos y nucleares correspondientes. Dos grupos, uno para cada punto temporal, fueron agregados como control (NV).

El resultado de este experimento se muestra en la Figura 4.2 A. Se observaron, en el grupo R, niveles similares de activación de ERK2 citosólica a los dos tiempos estudiados (15 y 45 min, ver Figura 4.1 A). Sólo en los grupos reactivados (R 15 y 45 min) se detectaron cambios significativos en los niveles de activación de ERK2 con respecto al grupo NV (15 min: $F=4.98$, $p=0.027$, $q=3.095$ grupo R_{15min} *vs* NV; 45 min: $F=6.785$, $p=0.006$, $q=2.81$ grupo R_{45min} *vs* NV). Por otra parte, los animales NR mostraron niveles de fosforilación de ERK2 similares al grupo control ($q=0.39$ R_{15min} *vs* NV; $q=0.16$ R_{45min} *vs* NV).

Estos resultados sugerirían que la activación citosólica de ERK2 podría ser atribuida a los procesos inducidos por la reactivación / reconsolidación de la memoria

de una respuesta de evitamiento inhibitorio y no a procesos tardíos atribuibles a la consolidación de la memoria original.

En este apartado también hemos realizado el ensayo conductual control para determinar si la evaluación en el desempeño de los sujetos experimentales 72 h luego del entrenamiento difiere de la habitualmente realizada a las 48h. Con este fin, dos grupos de animales fueron entrenados en la TEI (n=10 ratones / grupo) con el HFS. Un grupo de animales fue evaluado a las 48 y 72 h mientras que el grupo restante sólo fue evaluado a las 72 h. No se observan diferencias significativas el desempeño de los animales durante los ensayos de evaluación (T1 y T2) (Figura 4.2 B).

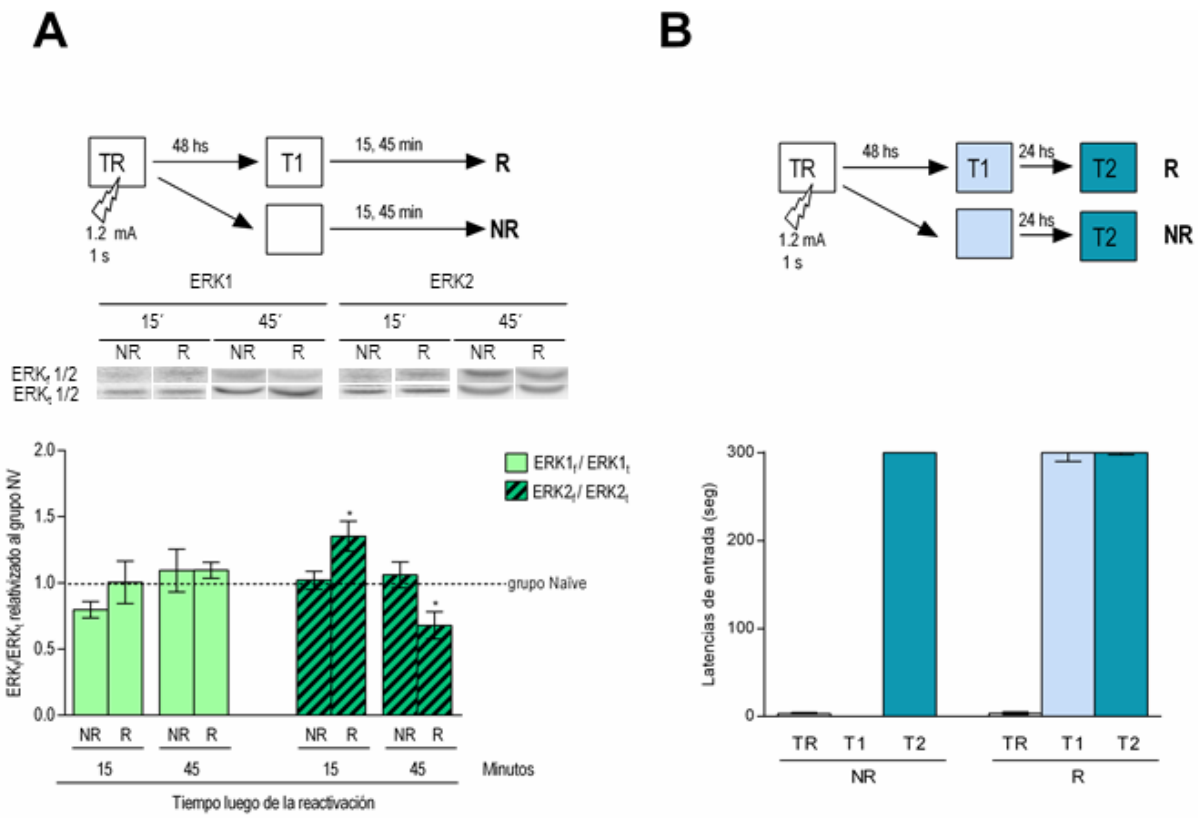

Figura 4.2. ERK2 solo se activa o inhibe específicamente luego de la reactivación de una memoria fuerte de evitamiento inhibitorio. A) Niveles de activación citosólicos de ERK 1/2 a los 15 (N, n=7; NR, n=6; R, n=7) o 45 (N, n= 8; NR, n= 6; R, n=8) minutos de la reactivación (R) o no (NR) de la memoria (T1). Las barras indican la densidad óptica media ± error estándar de la relación ERKf/ERKt

para las bandas específicas de la isoforma 1(barras lisas) y 2 (barras rayadas) obtenidas. * $p<0.05$ en relación al grupo NV, test de comparaciones múltiples de Dunnet. La línea punteada representa la media del grupo Naïve en cada gráfico. B) Ensayo conductual de animales entrenados en la TEI y evaluados 48 y/o 72 hs luego del entrenamiento. Se representan las medianas ± espacios intercuartiles de latencia de entrada al compartimento oscuro (n=8 ratones/grupo). En la parte superior del gráfico se muestra un diagrama del protocolo experimental realizado. TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación. En la parte superior de los gráficos A y B se muestra un diagrama del protocolo experimental. En la parte superior de los gráficos A y B se muestra un diagrama del protocolo experimental.

4.4 ¿ES LA ACTIVACIÓN DE ERK2 NECESARIA PARA QUE OCURRA EL PROCESO DE RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA?

En la sección anterior concluimos que la reactivación de la memoria sería necesaria para inducir la activación diferencial de la vía de ERK/MAPKs en animales entrenados con un estímulo fuerte.

Como hipótesis de trabajo planteamos que la activación de la vía de ERK 1/2 hipocampal sería un evento necesario para que los procesos de reconsolidación de la memoria tengan lugar. Ya en la introducción se habló acerca de estas proteínas y su mecanismo de acción. Tanto ERK1 como ERK2 son proteínas quinasas que requieren de su fosforilación para pasar a la configuración activa, siendo las proteínas quinasas MEK1 y MEK2 las responsables de dicha activación. ¿Qué ocurriría a nivel comportamental si uno inhibiera la activación de ERK 1/2? Con este fin administramos un inhibidor específico de MEK1/2, PD098059, por vía intra-hipocampal inmediatamente post-reactivación de la memoria.

Cuatro grupos de 10 animales cada uno fueron entrenados con un HFS en la

tarea de evitamiento inhibitorio. El primer ensayo de reactivación (T1) se realizó 48h luego. Inmediatamente post-T1, los animales fueron inyectados de manera intra-hipocampal con vehículo o distintas dosis de PD098059 (0.1-1.0 µg/hipocampo). Veinticuatro horas post-T1 los animales fueron nuevamente situados en la arena comportamental (T2) y se midieron las latencias de entrada al compartimento oscuro (Figura 4.3).

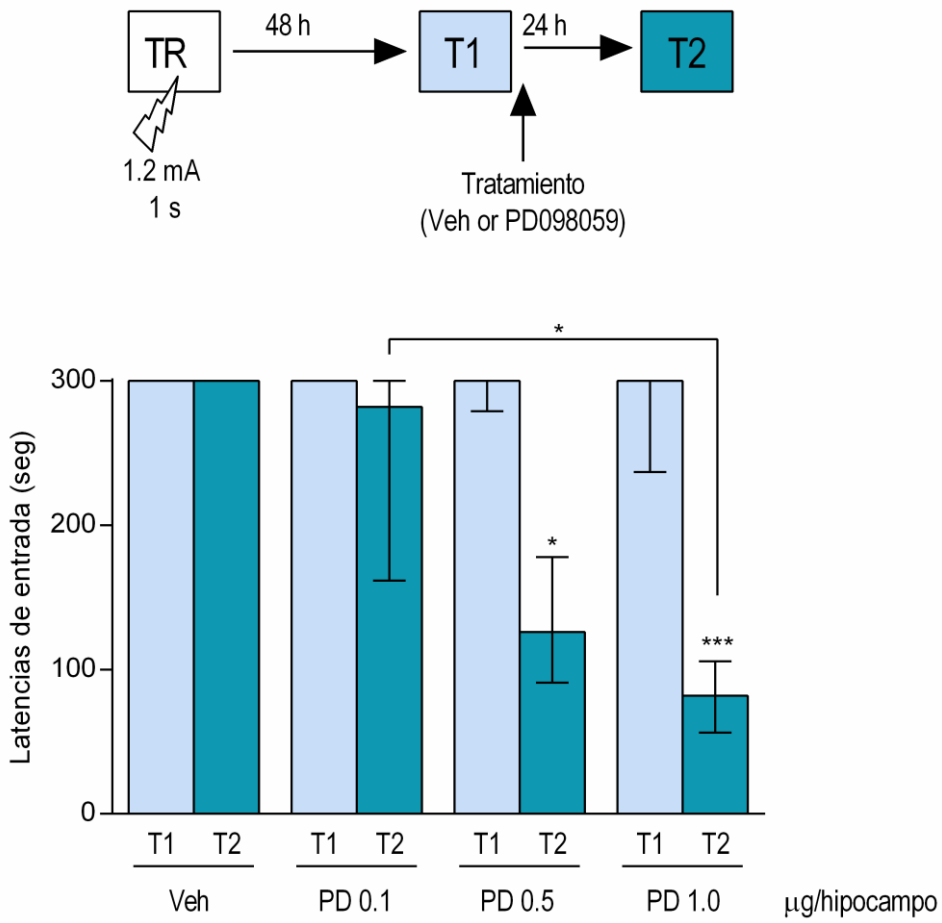

Figura 4.3. La inhibición de ERK 1/2 por la administración de PD098059 genera un deterioro en el desempeño de los animales. Efectos de la administración de PD098059 (inhibidor específico de la activación de MEK1/2) en los procesos de reconsolidación de una memoria fuerte de evitamiento inhibitorio en ratón. Vehículo (Veh) o PD098059 (0.1, 0.5 o 1.0 µg/hipocampo) se administró

inmediatamente luego de la reactivación de la memoria (T1). En la parte superior del gráfico se muestra un diagrama del protocolo experimental. Cada barra representa las medianas ± espacios intercuartiles (n=10 ratones/grupo). TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ (T2 vs T2 Veh; Dunn´s test).

Se observó que la administración del inhibidor de la activación de ERK 1/2 disminuye la latencia de entrada al compartimento oscuro de manera dosis-dependiente, siendo la dosis de 1.0 µg/hipocampo la que produce el mayor deterioro en el desempeño de los animales ($H=22.52$, $p<0.0001$; $T2_{PD\ 0.5}$ vs $T2_{veh}$: DRS=11.29; $T2_{PD\ 1.0}$ vs $T2_{veh}$: DRS=16.88).

A partir de estos resultados, evaluamos si el efecto de PD098059 sobre el desempeño de los animales observado es específico de la reactivación de la memoria. Para ello, 2 grupos de animales fueron entrenados en la tarea de evitamiento inhibitorio con un HFS. Cuarenta y ocho horas luego del TR, los animales fueron inyectados con vehículo (Veh) o PD098059 (PD, 1.0 µg/hipocampo), pero en ausencia de la sesión de reactivación (T1, los animales no fueron re-expuestos a la arena comportamental). Setenta y dos horas luego del TR, se realizó la sesión de evaluación (T2). Al comparar las latencias de entrada al compartimento oscuro observadas en el T2 del grupo Veh y del grupo PD no se observaron diferencias significativas ($p=0.41$, $U=19$; Figura 4.4 panel izquierdo).

A continuación, evaluamos la dependencia temporal del efecto de PD098059 sobre el desempeño de los animales luego de la reactivación de la memoria. Dos grupos de animales fueron entrenados en la tarea de evitamiento inhibitorio recibiendo un HFS. Cuarenta y ocho horas luego del TR se realizó la sesión T1 (sesión de

reactivación). Tres horas luego, los animales recibieron vehículo (Veh) o PD098059 (PD, 1.0 µg/hipocampo). Veinticuatro horas post-T1 se realizó la sesión de evaluación (T2). La administración de PD098059 180 min luego de la reactivación de la memoria no modificó significativamente las latencias de entrada observadas en T2 con respecto al grupo control (p=0.99, U=31; Figura 4.4 panel derecho).

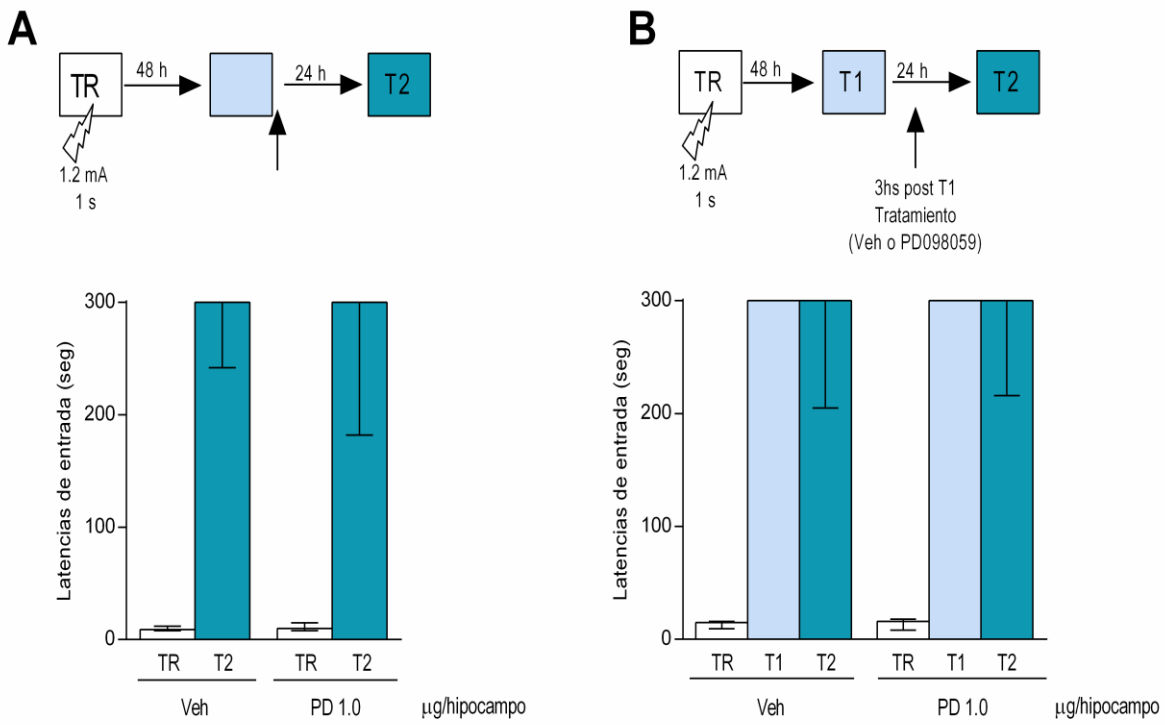

Figura 4.4. La administración de un inhibidor específico de la activación de ERK 1/2 disminuye las latencias de entrada al compartimiento oscuro si y solo si la memoria es previamente reactivada o se inyecta dentro de la ventana de reconsolidación. Efectos de la administración intrahipocampal de PD098059 (1µg/hipocampo) o vehículo (Veh) en el desempeño de los animales 48 h luego del entrenamiento en ausencia de la sesión de reactivación **(A)** o 180 min luego de la sesión de reactivación **(B)**. Cada barra representa las medianas con sus respectivos espacios intercuartiles (n=8-10 ratones/grupo).TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación. El protocolo experimental para cada caso se encuentra representado en la parte superior

de la figura.

4.5 PD098059 AFECTARÍA A LA RE-ESTABILIZACIÓN DE LAS MEMORIAS DE LARGO TÉRMINO POST REACTIVACIÓN

En la sección anterior se evaluó si el efecto de PD sobre el desempeño de los animales era específico de la reactivación de la memoria y si existía una dependencia temporal para dicho efecto. A continuación, nos preguntamos si los efectos de PD observados estarían actuando sobre el proceso de re-estabilización, afectando así a las memorias de largo término post reactivación (PR-MLT) evaluadas 24 h post T1. Dos grupos (n=9 ratones/grupo) fueron entrenados con un HFS en la TEI. Veinticuatro horas post TR se realizó el ensayo de reactivación (T1) e inmediatamente luego se administró vía intrahipocampal vehículo (Veh) o PD (1.0 µg/hipocampo). A las 3 h (T2) y 24 h (T3) se evaluó el desempeño de los animales a corto y largo término respectivamente, Figura 4.5.

Como puede observarse en la figura, a las 3 h luego de la sesión de reactivación no se encontraron diferencias en el desempeño entre los grupos evaluados (Veh *vs* PD). Sin embargo, a las 24 h se evidenció una disminución significativa de la latencia de entrada al compartimento del grupo PD ($p=0.0001$, $U=0.0$), tal y como se observó en la figura 4.3; sugiriendo que PD estaría actuando sobre la re-estabilización de la memoria labilizada a partir de la reactivación de la misma.

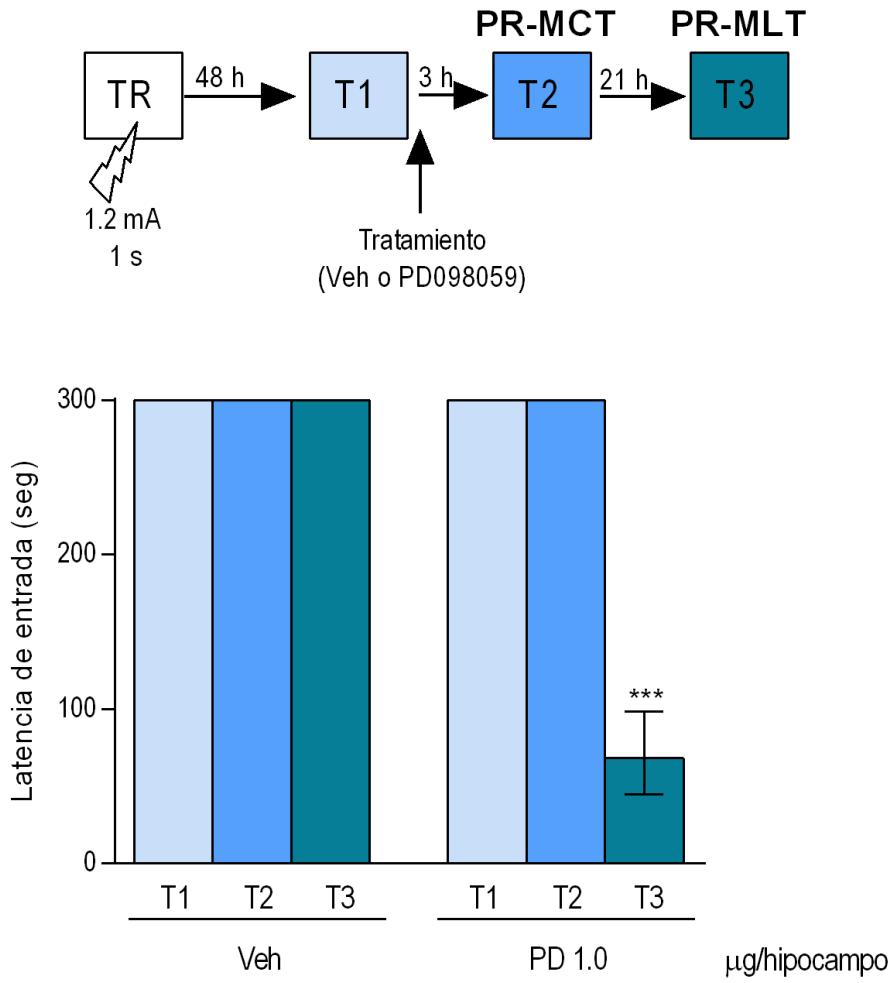

Figura 4.5. El efecto de PD098059 sobre el desempeño de los animales sólo se observa en PR-MLT. Efectos de la administración intrahipocampal de PD098059 (1µg/hipocampo) o vehículo (Veh) en el desempeño de los animales entrenados con HFS luego de la sesión de reactivación (T1). El desempeño fue evaluado 3 y 24 h post T1. Cada barra representa las medianas con sus respectivos espacios intercuartiles (n=9 ratones/grupo).TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación a corto término, T3: sesión de evaluación a largo término, PR-MCT: memoria a corto término post reactivación, PR-MLT: memoria a largo término post reactivación. El protocolo experimental para cada caso se encuentra representado en la parte superior de la figura. *** $p<0.0001$ T2 *vs* T2 Veh, Mann-Whitney test.

4.6 LA ACTIVACIÓN DIFERENCIAL DE ERK2 LUEGO DE LA REACTIVACIÓN DE UNA MEMORIA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO DEPENDE DEL TIPO DE ENTRENAMIENTO EMPLEADO.

Hasta el momento estudiamos la cinética de activación de la vía ERK 1/2 en los procesos de reconsolidación de una memoria de evitamiento inhibitorio en ratones entrenados con un estímulo fuerte (1.2 mA). Sin embargo, en el primer capítulo nos referimos a dos tipos de memorias que podían evaluarse en una misma tarea comportamental, dependiendo de la intensidad del estímulo empleado durante el entrenamiento. Así, decidimos evaluar si la intensidad del estímulo aplicado durante el entrenamiento (estímulo débil [LFS] *vs* estímulo fuerte [HFS]) inducía un patrón de activación de ERK 1/2 post-reactivación diferente a la descripta para un estímulo fuerte.

Para responder esta pregunta, 4 grupos de 8 animales cada uno fueron entrenados en la tarea de evitamiento inhibitorio (TR). Dos de esos grupos recibieron un LFS al ingresar al compartimento oscuro (grupos Sh), mientras que los 2 grupos restantes no recibieron la descarga (grupos USh). Cuarenta y ocho horas luego del entrenamiento, los 4 grupos fueron re-expuestos a la arena comportamental (T1) y luego sacrificados a 15 ó 45 minutos. Un grupo adicional, grupo *naïve* (NV), fue incorporado para cada tiempo para evaluar la activación basal de ERK 1/2. Se disecaron los hipocampos de cada ratón y se realizaron extractos citosólicos y nucleares para posterior análisis mediante *western blot* con anticuerpos específicos anti- proteína ERK total (ERK_t) y anti- proteína ERK fosforilada (ERK_f). Los resultados se observan en la Figura 4.6.

Similar a lo descripto en la sección 4.2, existe una activación de la isoforma ERK2 en los extractos hipocampales citosólicos. Sin embargo, para ambos tiempos estudiados (15 min; ERK1: F=0.23, p=0.79; ERK2: F=4.48, p=0.028 /45 min; ERK1: F=0.053, p=0.95; ERK2: F=6.26, p=0.009) se observaron aumentos significativos al comparar los grupos Sh_{15min} *vs* NV (15, q=2.86; Figura 4.5 A) y Sh_{45min} *vs* NV (45, q=3.022; Figura 4.6 A). Destacamos que el punto temporal de 45 min post-T1 representaría un punto de regulación diferencial post-reactivación, dependiente del tipo de memoria inducida durante el TR.

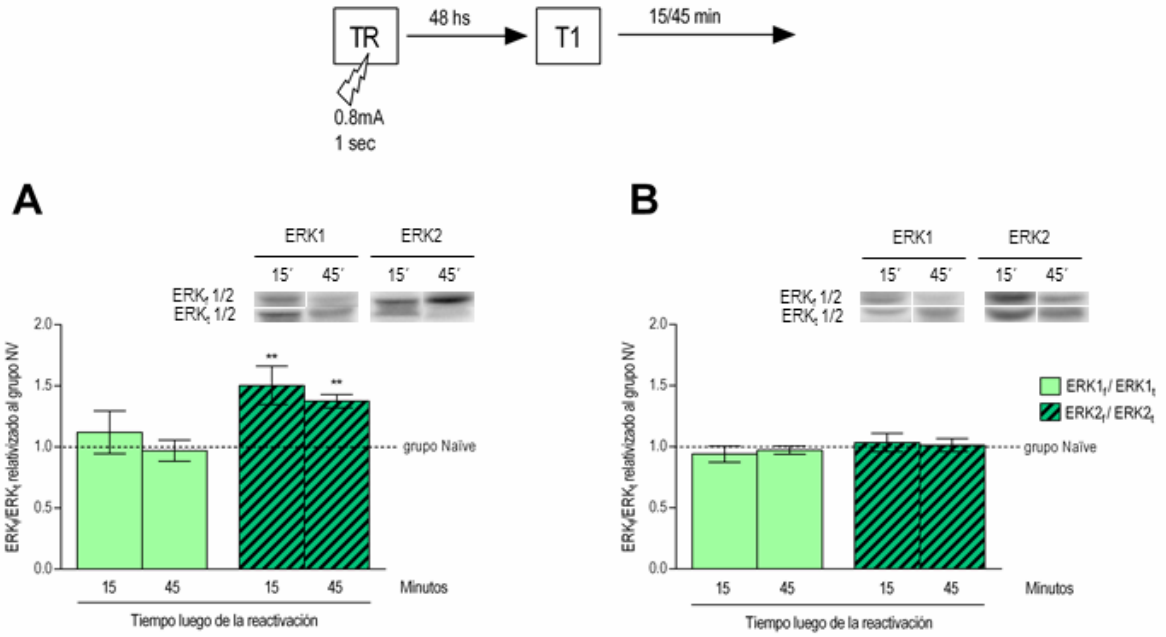

Figura 4.6. Cinética de activación de la vía ERK 1/2 en las fracciones citosólica y nuclear luego de la reactivación de una memoria débil de evitamiento inhibitorio en ratón. Activación de ERK 1/2 en extractos citosólicos (**A**) y nucleares (**B**) de animales entrenados con un estímulo aversivo débil y sacrificados 15 (n=7) y 45 (n=7) minutos luego de la reactivación de la memoria. Las barras indican la densidad óptica media ± error estándar de la relación ERK_f/ERK_t para las bandas específicas de la isoforma 1 (barras lisas) y 2 (barras rayadas) obtenidas. ** p<0.01 en relación al grupo NV, test de comparaciones múltiples de Dunnet. La línea punteada representa la media del grupo *Naïve* (n=8) en cada gráfico. En la parte superior de los gráficos A y B se muestra un diagrama del protocolo experimental.

Con respecto a las fracciones nucleares, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de activación de ERK 1/2, tanto a los 15 (ERK1: $F=2.86$, $p=0.07$; ERK2: $F=2.56$, $p=0.092$) como a los 45 (ERK1: $F=0.66$, $p=0.52$; ERK2: $F=0.071$, $p=0.93$) minutos, Figura 4.6 B.

4.7 LA ACTIVACIÓN HIPOCAMPAL DE ERK TAMBIÉN ES NECESARIA PARA LA RECONSOLIDACIÓN DE UNA MEMORIA DÉBIL.

En la sección anterior observamos una cinética diferencial de activación de ERK2 citosólica en animales entrenados con un HFS y con un LFS.

El siguiente paso fue estudiar qué ocurriría a nivel comportamental si uno impidiera la activación de ERK 1/2 inducida a los 15 min de la reactivación de la memoria, mediante el uso del inhibidor de MEK1/2. Tres grupos de 10 animales cada uno fueron entrenados con un LFS en la tarea de evitamiento inhibitorio, repitiendo el protocolo ya descripto. Inmediatamente luego de T1, los animales fueron inyectados por vía intra-hipocampal con vehículo o distintas dosis de PD098059 (0.5 o 1.0 µg/hipocampo) y evaluados a las 24h (T2). Los resultados se muestran en la Figura 4.7.

En base a estos resultados, también evaluamos para este tipo de TR, si el efecto de PD098059 es específico de la reactivación de la memoria y la dependencia temporal del fenómeno observado.

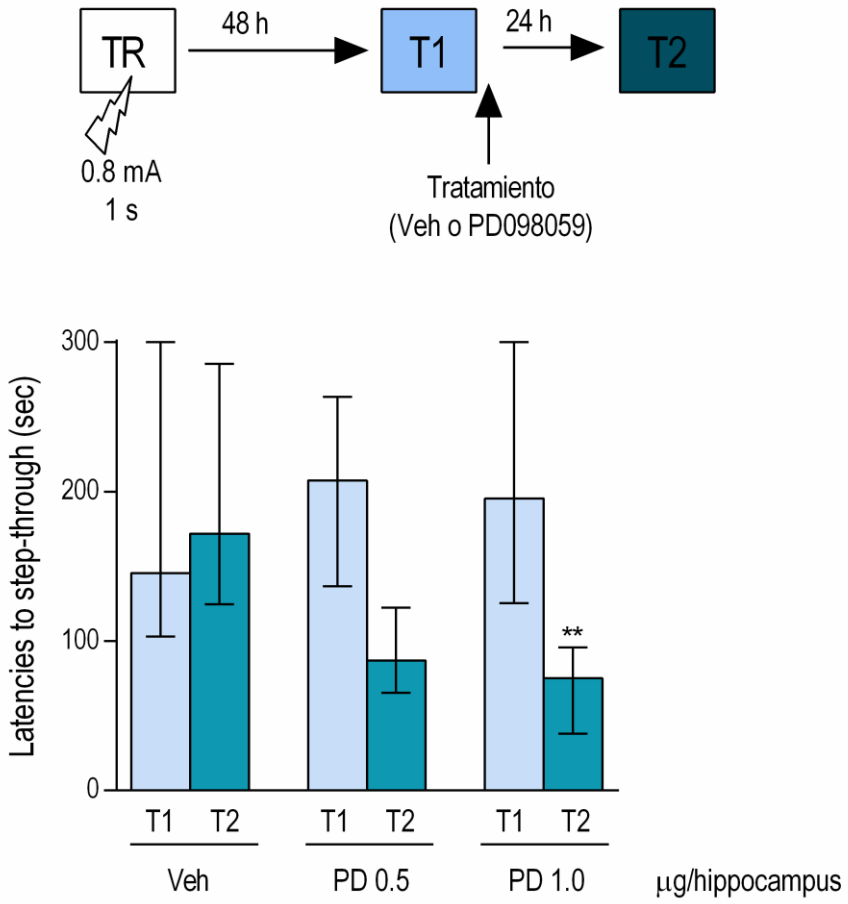

Figura 4.7. La inhibición de ERK 1/2 por la administración de PD098059 genera un deterioro en el desempeño de los animales entrenados con un LFS. Efectos de la administración de PD098059 (inhibidor específico de la activación de MEK1/2) en los procesos de reconsolidación de una memoria fuerte de evitamiento inhibitorio en ratón. Vehículo (Veh) o PD098059 (PD 0.5 o PD 1.0 µg/hipocampo) se administró inmediatamente luego de la reactivación de la memoria (T1). En la parte superior del gráfico se muestra un diagrama del protocolo experimental. Cada barra representa las medianas ± espacios intercuartiles (n=10 ratones/grupo). TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación. ** $p < 0.01$ (T2 PD 1.0 vs T2 Veh en test de Dunn).

Nuevamente, se entrenaron 2 grupos (10 ratones/grupo) en la TEI con un LFS y 48 h luego del TR, los animales fueron inyectados con vehículo (Veh) o PD098059 (PD, 1.0 µg/hipocampo), sin ser previamente re-expuestos al contexto (NR). Setenta y

dos horas luego del TR se realizó la sesión de evaluación (T2). No se encontraron diferencias significativas en las latencias de entrada al compartimento oscuro entre los grupos Veh y PD ($p=0.75$, $U=28.5$ $T2_{PD1.0}$ *vs* $T2_{veh}$; Figura 4.8 panel izquierdo), sugiriendo que los efectos del inhibidor de la fosforilación de ERK 1/2 sobre el desempeño son específicamente inducidos por la reactivación de la memoria.

Luego, se evaluó la ventana temporal de acción del inhibidor. Para ello, 2 grupos de 10 animales cada uno fueron entrenados en la tarea de evitamiento inhibitorio recibiendo un LFS y, 48 h luego se realizó la reactivación de la memoria (T1). Tres horas luego, los animales recibieron Veh o PD098059 (PD, 1.0 µg/hipocampo) intra-hipocampal y 24 h post-T1, fueron evaluados (T2).

La dosis de PD098059, administrada 180 min luego de la reactivación de la memoria, no afectó el desempeño de los animales con respecto al grupo Veh ($p=0.825$, $U=37.5$ $T2_{PD1.0}$ *vs* $T2_{veh}$; Figura 4.8 panel derecho).

En su conjunto, estos resultados sugieren que los efectos de PD098059 administrado en el hipocampo serían específicos de la reactivación de una memoria de evitamiento inhibitorio y presentan una ventana temporal acotada de al menos 3 h.

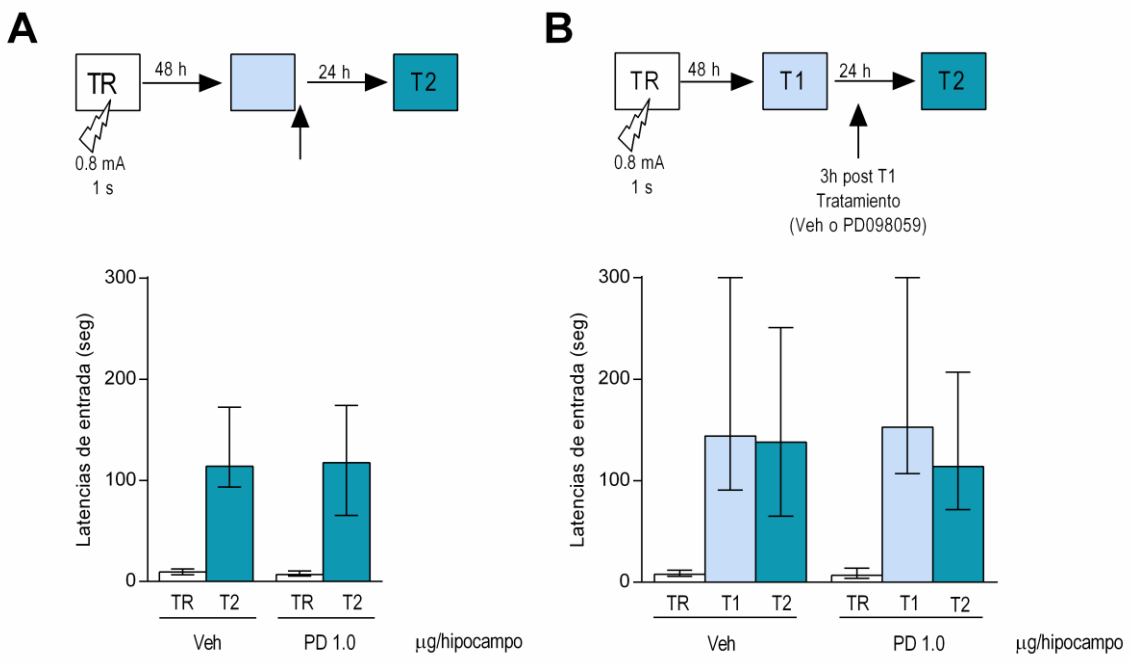

Figura 4.8. La administración de un inhibidor específico de la activación de ERK 1/2 disminuye las latencias de entrada al compartimiento oscuro si y sólo si la memoria es previamente reactivada o se inyecta dentro de la ventana de reconsolidación. Efectos de la administración intra-hipocampal de PD098059 (PD 1.0 µg/hipocampo) o vehículo (Veh) en el desempeño de los animales 48 h luego del entrenamiento en ausencia de la sesión de reactivación **(A)** o 180 min luego de la sesión de reactivación **(B)**. Cada barra representa las medianas ± espacios intercuartiles (n=8-10 ratones/grupo). TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación. El protocolo experimental para cada caso se encuentra representado en la parte superior de la figura.

4.8 ¿ES LA INHIBICIÓN DE ERK2 NECESARIA PARA QUE OCURRA EL PROCESO DE RECONSOLIDACIÓN DE UNA MEMORIA FUERTE?

En las secciones 4.2 y 4.6 de este capítulo concluimos que la reactivación de una memoria de evitamiento inhibitorio en ratón produce un perfil de activación de ERK2 a los 45 min post reactivación que depende del tipo de entrenamiento empleado

(estímulo débil *vs* estímulo fuerte). Específicamente, se observa un aumento de su activación citosólica en animales entrenados con un estímulo débil, mientras que aquellos entrenados con el estímulo fuerte muestran una disminución significativa en la activación citosólica de dicha isoforma. Más aún, vimos en las secciones 4.4 y 4.7 que el bloqueo de la activación de ERK 1/2 mediante el inhibidor PD098059 genera un deterioro en el desempeño, sugiriendo que la activación de ERK2 está involucrada y es necesaria para que ocurra el proceso de reconsolidación de la memoria.

En base a estos resultados nos preguntamos si, la alteración farmacológica de los niveles de activación de ERK 1/2 durante la reconsolidación permitirá modular la fuerza de la memoria adquirida durante el aprendizaje. Si la inhibición de la activación de ERK2 45 min post reactivación de la memoria fuese específica y necesaria para la reconsolidación de una memoria de tipo fuerte, la administración de PD098059 luego de la reactivación de una memoria de tipo débil (LFS) debería inducir latencias similares a las observadas en animales entrenados con un estímulo fuerte (ej., medianas de latencia de alrededor de 300 seg). En otras palabras, sería posible facilitar una memoria débil de largo término al disminuir los niveles de activación de ERK 1/2 a los 45 min luego de la reactivación de la misma.

Con esta hipótesis, 3 grupos de animales fueron entrenados en la tarea de evitamiento inhibitorio. Un grupo recibió un HFS, mientras que los dos restantes fueron entrenados con un LFS. Dos días luego del TR los animales fueron re-expuestos a la arena comportamental (T1). Cuarenta minutos luego, se les administró de manera intra-hipocampal bilateral vehículo (Veh) ó 1.0 µg de PD098059 (PD). Veinticuatro horas luego se realizó la sesión de evaluación mostrada en la Figura 4.9.

La administración de PD098059 40 min luego de la reactivación de una memoria de tipo débil induce un aumento en las latencias de entrada al compartimento oscuro durante la sesión de evaluación (T2) y dichos valores son similares a las observadas cuando los sujetos experimentales son entrenados con un HFS ($p>0.05$; $T2_{HFS + Veh}$ *vs* $T2_{LFS + PD}$). Por otra parte, en aquellos animales entrenados con un LFS, los tratados post-reactivación con PD exhiben un aumento significativo de la latencia de retención comparados con el grupo de animales a los que se les administró Veh ($p=0.006$, $U=55.5$ $T2_{LFS + Veh}$ *vs* $T2_{LFS + PD}$).

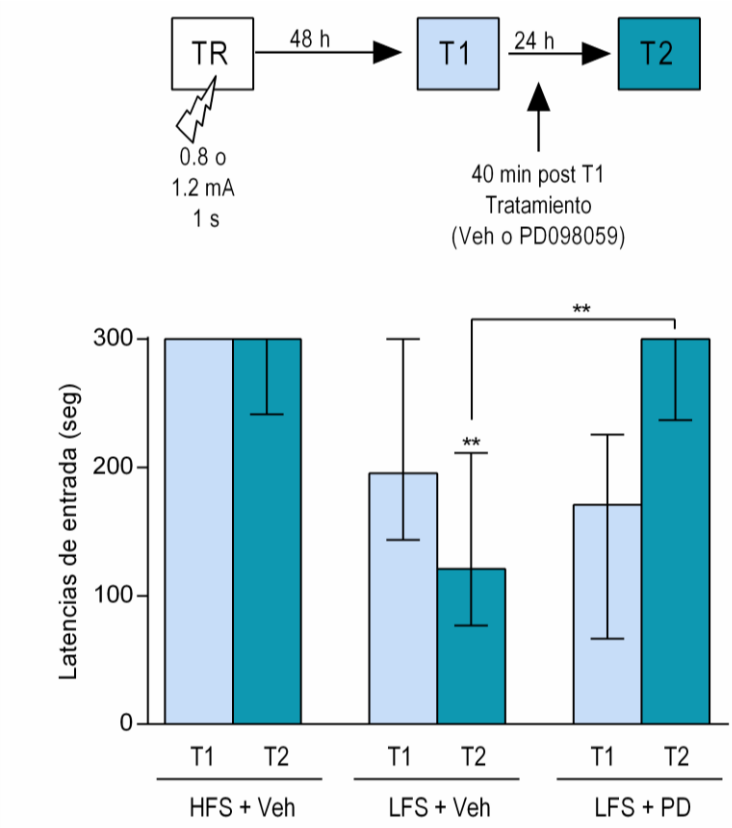

Figura 4.9. La administración de PD098059 40 min luego de la reactivación de una memoria débil aumenta las latencias de entrada al compartimento oscuro. Tres grupos de animales fueron entrenados en la TEI (0.8 o 1.2 mA, 3 seg), recibiendo una dosis de vehículo (Veh) o PD098059 (PD,

1.0 µg/hipocampo) 40 minutos luego de la reactivación de la memoria. Cada barra representa las medianas ± espacios intercuartiles (n=10 ratones/grupo). TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación, HFS: animales entrenados con un estímulo fuerte (1.2 mA), LFS: animales entrenados con un estímulo débil (0.8mA). El protocolo experimental para cada caso se encuentra representado en la parte superior de la figura. ** $p < 0.01$ ($T2_{LFS+Veh}$ vs $T2_{LFS+PD}$ en test de Dunn).

4.9 CINÉTICA DE ACTIVACIÓN DE ERK 1/2 180 MINUTOS LUEGO DE LA REACTIVACIÓN DE LA MEMORIA DE UNA TEI.

En experimentos anteriores demostramos que la administración de un inhibidor específico de la fosforilación ERK 1/2 3 h luego de la reactivación de la memoria (HFS y LFS), no modifica las latencias de retención 24 h luego. Estos resultados sugieren que 3 h post-reactivación la memoria no sería susceptible de ser modificada, al menos en parte, por este inhibidor (ver Figuras 4.4 y 4.7). Teniendo en cuenta estos resultados, esperábamos que a las 3 h de la reactivación de la memoria, ERK 1/2 presentase niveles basales de activación similares a los del grupo NV. Decidimos entonces, evaluar la activación de ERK 1/2 3 h luego de la reactivación de la memoria para ambos tipos de entrenamiento.

Para ello, 5 grupos (n=8 ratones/grupo) fueron entrenados en la tarea de evitamiento inhibitorio (TR). Dos grupos recibieron un LFS al ingresar al compartimento oscuro, dos grupos recibieron un HFS, y el grupo restante no recibió el estímulo aversivo (grupo USh). Cuarenta y ocho horas luego del entrenamiento, un grupo entrenado con un HFS, un grupo entrenado con LFS (grupos R) y el grupo USh fueron re-expuestos a la arena comportamental (T1), y 180 min luego fueron

sacrificados. Los dos grupos restantes no fueron reactivados (grupos NR) y fueron sacrificados al mismo tiempo que los grupos anteriores (respecto del TR). Dos grupos adicionales, llamados grupos *naïve* (NV), fueron incorporados para cada tipo de entrenamiento como grupo control de los niveles basales de activación de ERK 1/2. Se disecaron los hipocampos de cada ratón y se realizaron extractos citosólicos y nucleares para posterior análisis mediante *western blot* con anticuerpos específicos anti- ERK total (ERK_t) y anti- ERK fosforilada (ERK_f). Los resultados se muestran en la Figura 4.10.

Al analizar los grupos entrenados con un LFS, se encuentran cambios significativos en los niveles de activación citosólicos de ERK2 ($F=36.88$, $p< 0.0001$), pero no para ERK1 ($F=2.93$, $p= 0.081$). Dichos cambios se observan específicamente en el grupo R en comparación con el grupo NV ($q=7.28$, $ERK2_R$ *vs* ERK_{NV}).

Con respecto a los grupos entrenados con un HFS, ambas isoformas evidenciaron cambios en los niveles de activación citosólicos entre los grupos estudiados (ERK1: $F=7.94$, $p= 0.003$; ERK2: $F=35.08$, $p<0.0001$). Nuevamente, los cambios se observaron sólo al comparar el grupo R *vs* el NV ($q=3.89$, $ERK1_R$ *vs* $ERK1_{NV}$; $q=8.12$, $ERK2_R$ *vs* $ERK2_{NV}$), demostrando que se trata de una activación inducida por la reactivación de ambos tipos de memoria.

Similar a lo descripto en la sección 4.2, se observó un aumento significativo en la activación ERK2 en el grupo USh ($q=4.06$, $ERK2_{USh}$ *vs* $ERK2_{NV}$).

Finalmente, se analizaron los extractos nucleares obtenidos para todos los grupos (Figura 4.10 B). Independientemente del entrenamiento empleado (LFS y HFS o USh)

no se encontraron diferencias significativas entre los grupos [(LFS: F=1.83, p= 0.19 para ERK1; F=0.1, p=0.9 para ERK2), (HFS: F=0.43, p=0.66 para ERK1; F=0.64, p=0.54 para ERK2)].

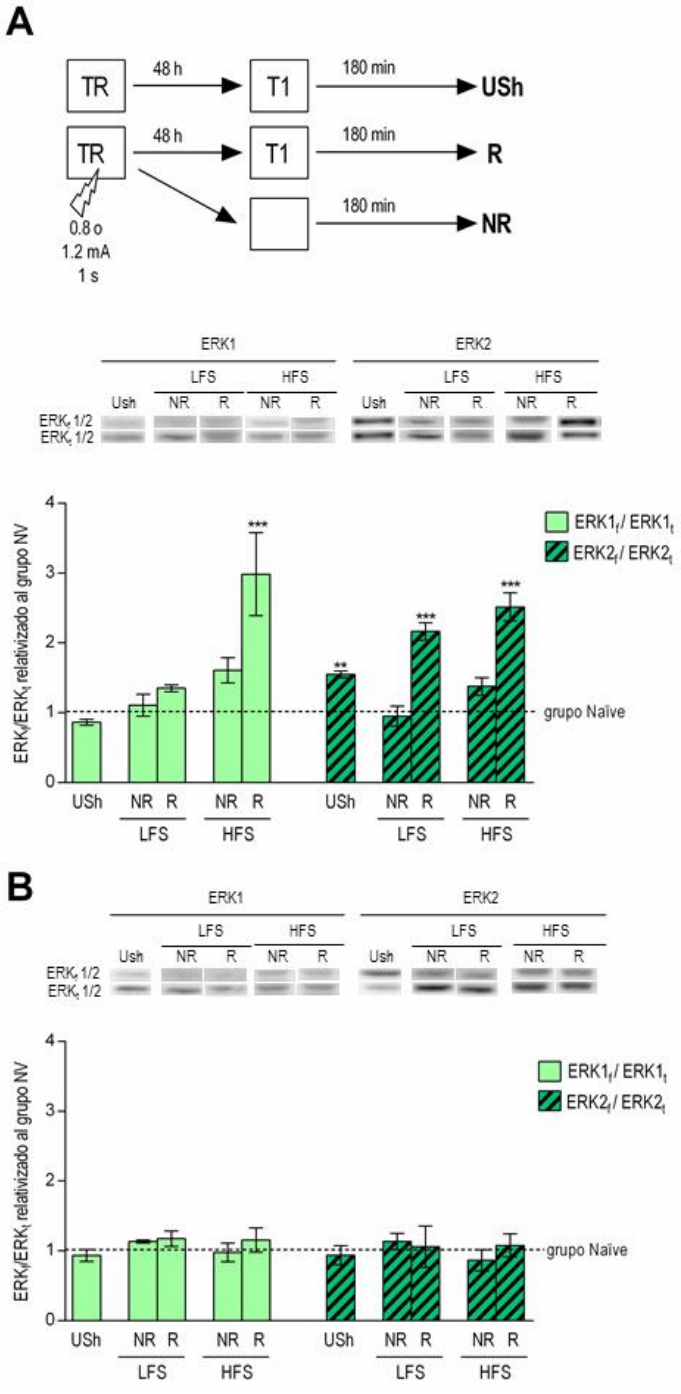

Figura 4.10. Cinética de activación de la vía ERK 1/2 180 minutos luego de la reactivación de

una memoria de evitamiento inhibitorio en ratón. Extractos hipocampales citosólicos (**A**) y nucleares (**B**) de animales sacrificados 180 min luego de la reactivación de una memoria de tipo débil (R_{LFS}: n=8), fuerte (R_{HFS}: n=7), en ausencia del estímulo (USh, n=7) o en ausencia de la sesión de reactivación (NR_{LFS}: n=8; NR_{HFS}: n=8). Las barras indican la densidad óptica media ± error estándar de la relación ERK_f/ERK_t para las bandas específicas de la isoforma 1(barras lisas) y 2 (barras rayadas) obtenidas. ** p<0.01, *** p<0.001 en comparaciones múltiples de Dunnet con el grupo NV. La línea punteada representa la media del grupo *Naïve* (n=8) en cada gráfico. En la parte superior del gráfico A se muestra un diagrama del protocolo experimental. HFS: animales entrenados con un estímulo fuerte (1.2 mA), LFS: animales entrenados con un estímulo débil (0.8mA).

4.10 DISCUSIÓN

En este capítulo se evaluó la participación de la vía de señalización ERK 1/2 en los procesos de reconsolidación de la memoria. Como ensayo conductual se utilizó la TEI, pudiendo caracterizar dos tipos de entrenamientos diferentes. Primero, se observó que la reactivación (T1) de un entrenamiento fuerte (con US de 1.2 mA) induce cambios en los niveles de activación citosólicos de ERK2 en los tres tiempos estudiados (15, 45 y 180 min) respecto de los niveles del grupo control (grupo NV). Específicamente, existe un aumento de la activación ERK2 a los 15 y 180 min, y una disminución a los 45 min de T1 (Figuras 4.1 A y 4.10 A). Además, también se observó un aumento de la activación de ERK1 citosólica a los 180 min de reactivar la memoria. Cuando la misma no fue reactivada (grupo NR), no se observaron cambios significativos en los niveles de fosforilación de ERK 1/2 (Figura 4.2 A), sugiriendo que estos cambios serían inducidos específicamente por la reactivación de la memoria.

Luego, se determinaron los niveles de activación de ERK 1/2 post-T1 en animales entrenados con un estímulo débil (US de 0.8 mA). En este caso, se observaron aumentos significativos de los niveles de activación de ERK2 citosólico a

los 3 tiempos estudiados (Figuras 4.6 A y 4.10 A), sugiriendo que la modulación de la vía 45 min luego de reactivar la memoria sería una característica distintiva del tipo de entrenamiento empleado.

Se buscó, entonces, establecer la dependencia del proceso de reconsolidación de la memoria con la modulación de esta. Para ello, se analizó el efecto de la administración de un inhibidor específico de la activación de ERK 1/2 a distintos tiempos luego de la reactivación de ambos tipos de memorias (fuerte y débil). Los resultados demuestran que los efectos de PD098059 serían dosis-dependiente en ambos casos, alcanzando su máxima respuesta comportamental con la dosis de 1.0 µg/hipocampo (Figuras 4.3 y 4.7, estímulo fuerte y débil respectivamente) cuando es administrado inmediatamente luego de T1. Estos resultados sugieren que la activación de ERK 1/2 a los 15 min de la reactivación de ambos tipos de memoria es necesaria para la re-estabilización de las mismas y mantenimiento de las mismas por 24 h.

Se realizaron experimentos adicionales para evaluar si los efectos de PD098059 en el desempeño de los animales eran específicos de la reactivación de la memoria (Figuras 4.4 y 4.8, estímulo fuerte y débil respectivamente).

La administración de PD en ausencia de la reactivación de la memoria no modificó el desempeño de los sujetos experimentales, sugiriendo que los cambios inducidos por PD sobre la retención, cuando la memoria es reactivada, no podrían atribuirse a efectos inespecíficos del tratamiento farmacológico; o bien a fenómenos desencadenados por el TR observables 48 h luego (ej. aquellos involucrados en una posible consolidación tardía).

En cuanto a la modulación de la vía a los 45 min de la reactivación de la memoria, a partir de los resultados descriptos en la sección 2.5, surgió el interrogante: ¿es la inhibición de ERK2 a los 45 min post T1 específica y necesaria del proceso de reconsolidación de una memoria fuerte? En otras palabras, ¿la activación de ERK2 inducida 45 min luego de la reactivación de una memoria podría modular la expresión comportamental observada 24 h luego? El grupo de animales que recibió PD098059 40 min luego de la reactivación de una memoria débil exhibió latencias de entrada similares a las de los animales entrenados con un estímulo fuerte inyectados con vehículo (Figura 4.9). En consecuencia, podría sugerirse que la inhibición de ERK2 a los 45 min post T1 se relacione con las latencias de retención en sesiones subsiguientes. Esto es, a una mayor disminución en los niveles de activación de ERK2 citosólico, mayores serían las latencias de entrada al compartimento en sesiones subsiguientes. El aumento de la inhibición de ERK2 a los 45 min permitiría reformular una memoria originalmente débil en una memoria de características similares a una memoria fuerte, inferida a partir de una mejora en el desempeño de los animales evaluados en sesiones subsiguientes (grupo LFS + PD).

Con el objeto de comprobar la especificidad de la participación de ERK en la reconsolidación de la memoria, se incluyó un grupo de animales entrenados en ausencia del estímulo aversivo (grupo USh) en simultáneo/paralelo con los grupos entrenados con un estímulo fuerte o débil. Si bien los tres tipos de entrenamiento mostraron activación citosólica de ERK2 15 min post T1; los ratones del grupo USh no mostraron diferencias en dichos niveles con respecto al grupo control (grupo NV) a los 45 min, indicativo de que los cambios en la activación de ERK2 en este punto

temporal podrían explicar la especificidad de la asociación entre el contexto y el tipo de estímulo empleado.

Besnard y colaboradores (2014) estudiaron la relación entre la fuerza de una memoria de condicionamiento de miedo al contexto y el patrón de fosforilación de ERK 1/2 tanto en hipocampo como en amígdala luego de su reactivación. Los niveles de activación de ERK 1/2 fueron analizados inmediatamente luego de la sesión de reactivación en animales entrenados con 1 o 3 descargas en las patas, o en ausencia del estímulo aversivo. En sus resultados, describieron un aumento en el número de células inmunorreactivas para ERK 1/2 en el giro dentado (GD) del hipocampo, en los 3 grupos descriptos (vs grupo control –*naïve*–). Destacamos que el número de células inmunorreactivas del grupo que no recibió el estímulo aversivo fue significativamente mayor a la de los grupos que lo recibieron. Los autores sugieren que la presentación de un “contexto neutral” desencadena la activación de una población de células del GD, representando una “actividad de fondo o basal" en respuesta a la re-exposición a un entorno previamente explorado, aunque no reforzado. Los resultados descriptos hasta el momento, en cuanto a la activación de ERK 1/2, así como resultados previos del laboratorio, donde se analizó la activación de Nf-κB a distintos tiempos luego de la adquisición o reactivación de la memoria (Boccia et al., 2007; Freudenthal et al., 2005; Salles et. al. 2017), son consistentes con esta idea. A los 15 y 180 min luego de la reactivación de la memoria, se observó un aumento en los niveles de activación de ERK2 citosólico en el grupo USh. Estos resultados sugieren que estos animales, si bien no fueron entrenados con un estímulo aversivo, formaron una memoria de la experiencia, susceptible de ser reactivada/labilizada al re-exponerlos al contexto del

entrenamiento, que merece ser estudiada en mayor detalle. Por otro lado, en ambos trabajos se realizaron extractos de hipocampo entero, por lo que, si bien pudimos discriminar la localización subcelular de la activación de ERK, no fue posible determinar qué subárea específica del hipocampo podría estar contribuyendo a dicha activación diferencial de ERK y/o Nf-κB. Futuros estudios en este sentido permitirán aportar respuestas a estos interrogantes.

Habiéndose encontrado diferencias en la activación de ERK citosólica y no a nivel nuclear, destacamos que dicha activación podría preceder a la activación nuclear, o bien, podría tener un papel *per sé* en el citosol. En este sentido, diversos trabajos sugieren que la internalización de las CAM en neuronas sensoriales de *Aplysia* estaría relacionada con el crecimiento sináptico resultante de la facilitación a largo plazo inducida por serotonina. En este modelo de invertebrados se probó que la internalización de estas moléculas podría ser bloqueada por la sobreexpresión de constructos transmembrana con una única mutación puntual en los dos sitios de consenso de fosforilación de MAPKs, así como por la inyección de un inhibidor específico de MAPK en neuronas sensoriales. Estos datos sugieren que la fosforilación de MAPKs en la membrana sería un evento necesario para la internalización de las CAM y, por lo tanto, podría representar un punto de regulación temprano en el crecimiento de nuevas conexiones sinápticas que acompaña a la facilitación a largo plazo (Bailey et al., 1997). En este sentido, trabajos realizados en el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria (FCEN, UBA) han demostrado la importancia de la activación de ERK citosólica en un modelo de memoria en invertebrados (Feld et al., 2005). Más aún, en este modelo la desregulación de la

localización subcelular de dicha activación (necesaria para la consolidación de una memoria de largo término) inducida por la administración de muy bajas concentraciones de péptido β-amiloide (βA) podría explicar el deterioro cognitivo inducido por administración del péptido (Feld et al., 2008).

La activación de ERK citosólica también ha sido asociada con fenómenos de plasticidad de largo término y regulación de la memoria dependiente de la síntesis proteica en ratón (Kelleher et al., 2004); regulación de la función del canal de potasio mediante la fosforilación de la subunidad Kv4.2 del canal tanto *in vivo* como *in vitro* (Adams et al., 2000; Yuan et al., 2002); alteraciones en las interacciones entre dinamina y los microtúbulos en cultivo (Earnest et al., 1996); entre otros.

Estos antecedentes, junto con los resultados presentados en este capítulo, sustentan la idea que la función citosólica de ERK podría ser un evento importante en las MLT y la plasticidad sináptica. Específicamente, en esta tesis se evidenció que la activación de ERK2 citosólica juega un papel importante en la reconsolidación y fortalecimiento inducido por reactivación de memorias de una tarea de evitamiento inhibitorio en ratón.

Por último, se evaluó la fosforilación de ERK 1/2 3 h luego de la reactivación de una memoria en ambos tipos de entrenamiento. En ambos casos observamos un aumento en los niveles de activación de ERK2 en las fracciones citosólicas (Figura 4.10 A). Particularmente, la reactivación de la memoria en ratones entrenados con un LFS indujo sólo la activación de ERK2, mientras que en aquellos entrenados con un HFS indujo la activación de ambas isoformas. Sin embargo, la infusión intra-hipocampal de PD 3 h post T1 no afectó el desempeño de los animales evaluados 24

h luego (T2), independientemente del tipo de entrenamiento empleado (Figuras 4.4 y 4.8, HFS y LFS, respectivamente).

Vía de activación ERK/MAPKs y Persistencia de la memoria

-5-

En esta sección nos ocuparemos del estudio de la vía de activación de ERK/MAPKs en los procesos que ocurren luego de la reactivación de una memoria de evitamiento inhibitorio, específicamente en los procesos de persistencia.

Los resultados mostrados en este capítulo fueron publicados en la revista *Neurobiology of Learning and Memory*, Krawczyk et al., 2016.

5.1 INTRODUCCIÓN

¿Qué lleva a una memoria a durar una vida entera? El atributo más distintivo de las MLT es su capacidad de persistir a lo largo del tiempo. El proceso de persistencia puede definirse entonces como la duración en el tiempo de la modificación de una representación neuronal o conducta, originada como resultado de una experiencia. Un concepto interesante y relacionado con la definición que diéramos oportunamente de memoria es aquel que manifiesta que lo que "se retiene a lo largo del tiempo no es una representación interna del mundo, sino la capacidad de poder generarla". De esta forma, la información estaría almacenada en circuitos neuronales que serían capaces de "expresar" esa representación (Dudai, 2002b). En otras palabras, la memoria no se guardaría "como tal" sino que sería reconstruida toda vez que se evoca, y lo que persistiría como memoria serían los cambios en aquellos sistemas responsables de la reconstrucción. Ya ha sido demostrado que la administración de un inhibidor de la síntesis proteica luego de una sesión de entrenamiento altera el proceso de consolidación de dicha memoria (Bourtchouladze et al., 1998; Meiri and Rosenblum, 1998; Schafe et al., 1999). Si uno asume que los sustratos moleculares de una memoria no perduran toda una vida, la inhibición de la síntesis de proteína podría representar una restricción para la persistencia de memorias de largo término (p-LTM). Consecuentemente, se ha sugerido que distintas olas de síntesis proteicas podrían estar involucradas en la persistencia de la memoria (Bekinschtein et al., 2008a, 2010). Asimismo, se han descripto mecanismos epigenéticos durante el proceso de consolidación de la memoria necesarios para la persistencia de la misma (Federman et al., 2013). Sin embargo, hasta el momento, los mecanismos

moleculares involucrados en la persistencia de la memoria que suceden durante su consolidación/reconsolidación no están comprendidos en su totalidad.

En el capítulo 4 estudiamos la cinética de activación de la vía de ERK 1/2 citosólica y nuclear luego de la reactivación de una memoria de evitamiento inhibitorio en ratón, y observamos una activación diferencial (específica del tipo de memoria) de ERK2 a nivel citosólico. Demostramos también que esta vía es necesaria para los procesos de reconsolidación de ambos tipos de memorias. Más aún, se constató que a los 45 minutos del recordatorio la activación/inhibición de la vía está asociada con la fortaleza de la memoria reconsolidada.

Sin embargo, al evaluar los niveles de activación de ERK 1/2 a las 3 h de la reactivación de la memoria, no se observó un correlato entre dicha activación y el efecto de la inhibición farmacológica sobre la memoria evaluada a las 24 h (ver Figura 4.4 B, 4.8 B y 4.10). Es decir, si bien a las 3h existe un aumento en los niveles de activación de ambas isoformas, la administración del inhibidor PD098059 180 min post T1 fue incapaz de afectar el desempeño de los animales respecto del grupo control (Veh) cuando fueron evaluados 24 h post-reactivación.

Fue entonces cuando nos preguntamos cuál sería la relevancia de este nuevo punto temporal de activación de la vía de ERK en los procesos de memoria. Surgió así una nueva hipótesis de trabajo: La activación de ERK 1/2 citosólica a las 3 h de la reactivación estaría involucrada en el proceso de persistencia de la MLT.

5.2 LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA ERK 1/2 3 HS LUEGO DE LA REACTIVACIÓN DE LA MEMORIA ES NECESARIA PARA LA PERSISTENCIA DE UNA MEMORIA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO.

Tomando como punto de partida los resultados descriptos en la sección 4.8, decidimos evaluar si la activación de ERK2 a las 3h de la reactivación es necesaria para la persistencia de la memoria. Entonces, cuatro grupos de animales fueron entrenados en la tarea de evitamiento inhibitorio, dos de ellos con un LFS y los otros dos con un HFS. Cuarenta y ocho horas luego los animales realizaron el ensayo de reactivación (T1) y 180 min luego recibieron una inyección intra-hipocampal bilateral de vehículo (veh) o PD098059 (PD, 1.0 µg/hipocampo). Siete días post-T1 los animales fueron nuevamente colocados en la arena comportamental para realizar la sesión de evaluación, T2 (Figura 5.1).

Los grupos inyectados con PD098059 exhibieron latencias de entrada al compartimento oscuro significativamente menores a las observadas para los grupos Veh, tanto en el caso de animales entrenados con LFS (U= 11.5, p=0.03, Figura 5.1 panel izquierdo; $T2_{PD}$ *vs* $T2_{Veh}$) como para los entrenados con HFS (U=22, p=0.04, Figura 5.1 panel derecho; $T2_{PD}$*vs* $T2_{Veh}$). Estos resultados sustentan la hipótesis propuesta.

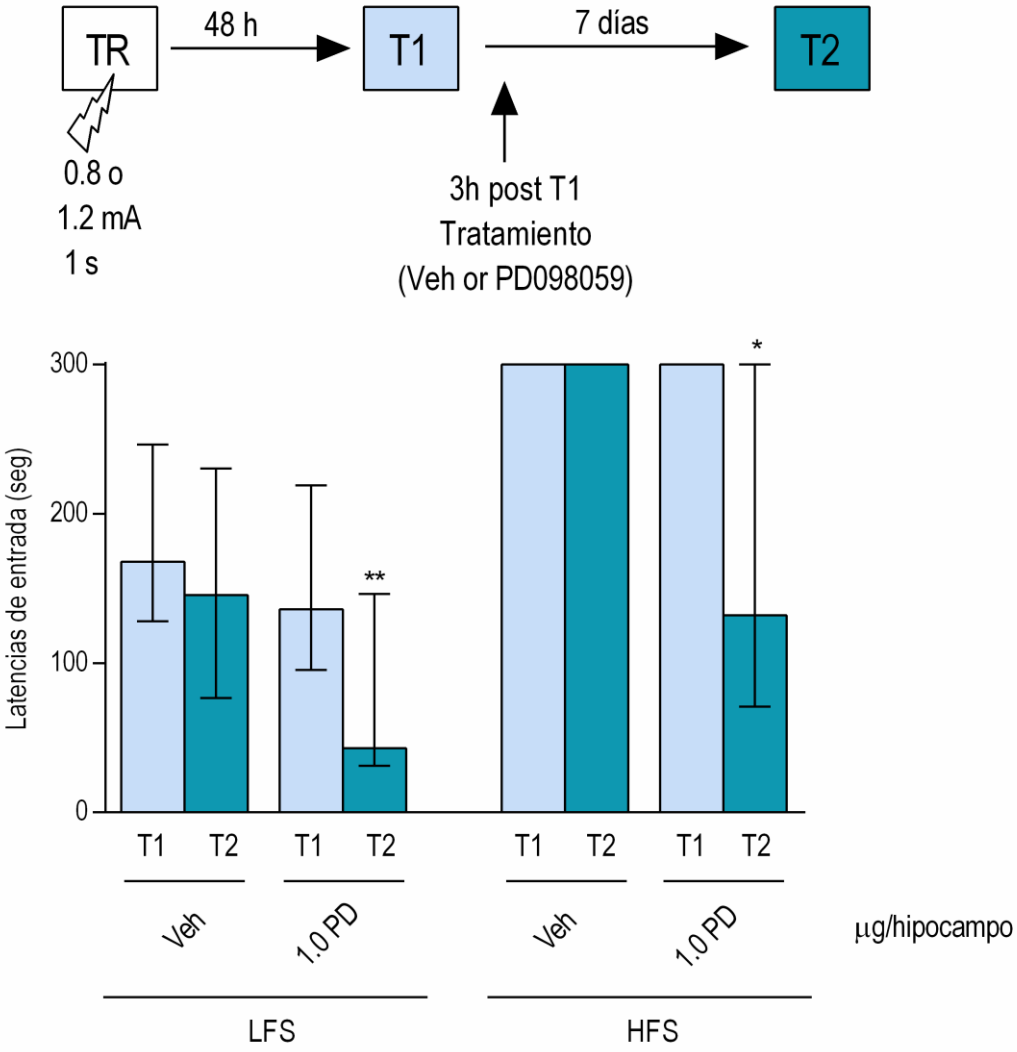

Figura 5.1. La administración de PD098059 3 hs luego de la reactivación de la memoria produce un deterioro en el desempeño de los animales cuando son evaluados a los 7 días. Efectos de la administración de un inhibidor específico de la activación de MEK1/2 (PD098059) en los procesos de persistencia de una memoria de evitamiento inhibitorio de tipo fuerte (HFS) o débil (LFS). Cada barra representa las medianas ± espacios intercuartiles (n=8-10 ratones/grupo).TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación, HFS: animales entrenados con un estímulo fuerte (1.2 mA), LFS: animales entrenados con un estímulo débil (0.8 mA). El protocolo experimental se encuentra representado en la parte superior de la figura. * $p<0.05$, ** $p < 0.01$ ($T2_{Veh}$ *vs* $T2_{PD1.0}$ en contrastes de Dunn).

5.3 EL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE PD098059 SOBRE LA PERSISTENCIA DE UNA MEMORIA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO ES ESPECÍFICO DE LA REACTIVACIÓN DE LA MISMA.

A fin de corroborar que los efectos de la administración de PD098059 180 min post T1 son específicos de los mecanismos que se desencadenan luego de la reactivación de la memoria, realizamos el siguiente experimento: 4 grupos de animales fueron entrenados según lo ya descripto en la sección anterior. Dos de ellos recibieron un LFS y los otros dos un HFS. Cincuenta y un horas post TR (48 h hasta el tiempo al que se hubiera realizado la sesión T1 + 3 h) los animales recibieron una inyección de vehículo (Veh) o PD098059 (PD, 1.0 µg/hipocampo) en ausencia de la sesión de reactivación. Siete días luego de la inyección los animales fueron evaluados, T2 (Figura 5.2).

Independientemente del tipo de entrenamiento recibido, la administración de PD098059 51 h post TR no produjo cambios significativos en las latencias de entrada al compartimiento oscuro, comparados con sus respectivos grupos Veh (LFS: U=4.50, p=0.4; HFS: U=30.0, p=0.88, $T2_{PD}$ *vs* $T2_{Veh}$ en ambos casos).

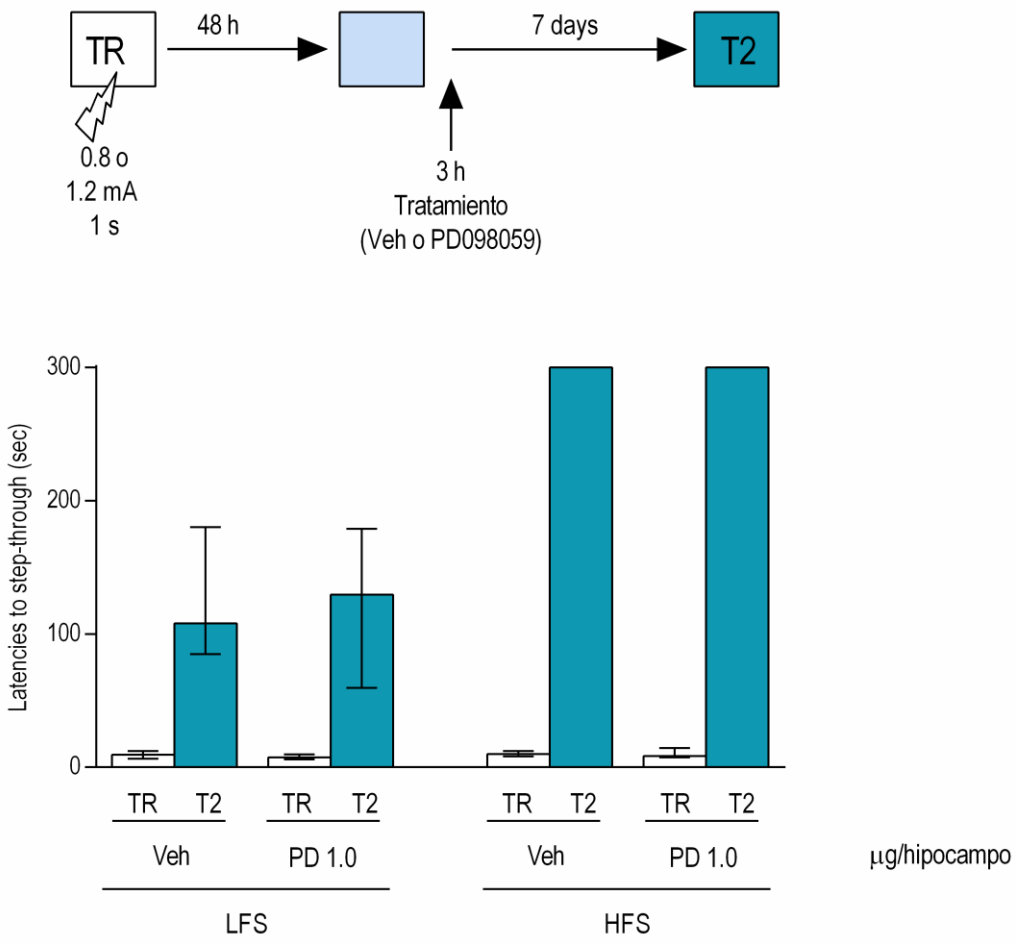

Figura 5.2. El deterioro en el desempeño a 7 días inducido por la administración de PD098059 no ocurre en ausencia de la reactivación de la memoria. Efectos de la administración intrahipocampal de PD098059 (1.0 µg/hipocampo) o vehículo (Veh) en el desempeño de los animales 48 h luego del entrenamiento en ausencia de la sesión de reactivación. Cada barra representa las medianas con sus respectivos espacios intercuartiles (n=10 ratones/grupo).TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación, HFS: animales entrenados con un estímulo fuerte (1.2 mA), LFS: animales entrenados con un estímulo débil (0.8 mA). El protocolo experimental se encuentra representado en la parte superior de la figura.

5.4 DISCUSIÓN

Como se describió en la introducción general de esta tesis, no existe una definición o distinción clara entre los procesos de consolidación y persistencia de la memoria. Sin embargo, ha sido propuesta la existencia de dos procesos coexistentes durante la consolidación de la memoria: consolidación sináptica y consolidación sistémica. La primera, que ocurre dentro de los primeros minutos a horas, involucra diferentes procesos dependientes de eventos moleculares y celulares tempranos (consolidación sináptica o celular) mientras que la consolidación sistémica es más lenta e involucra la interacción entre estructuras del lóbulo temporal medial y estructuras neocorticales (consolidación sistémica, Squire et al., 2015). Hasta el día de hoy, no existe una determinación precisa de las ventanas temporales para cada uno de estos procesos.

Una vez que se consolida una memoria, puede persistir durante días, meses o años (McGaugh, 2000). Varios factores son capaces de modular la fuerza de la memoria; sin embargo, poco es sabido acerca de los eventos moleculares y celulares que median la duración de las memorias o su persistencia. Hasta el momento, se ha descripto que la activación de las células dopaminérgicas en el área tegmental ventral (VTA), inmediatamente y 12 h luego del entrenamiento, constituiría un evento crítico en la persistencia de la memoria (Rossato et al., 2009). Existen evidencias que tras la activación dopaminérgica de la VTA, la producción del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el hipocampo posterior, 12 h después del entrenamiento, sería un paso molecular determinante para las MLT de larga duración o persistentes (ej., 7 días; Bekinschtein et al., 2008a). La persistencia inducida por BDNF es dependiente

de ERK, ya que la administración de inhibidores de ERK 15 min antes de las infusiones de BDNF (12 h después del TR) previno los efectos de este factor de crecimiento sobre la duración de la memoria.

En la tarea de evitamiento inhibitorio en roedores, la administración intra-hipocampal de PD inmediatamente luego de un entrenamiento impide la formación de MCT, sin alterar a las MLT. Sin embargo, la administración del mismo inhibidor 3 h luego del entrenamiento provocó un deterioro de la MLT a 24 h, sin afectar a la MCT (Walz et al., 1999). Además, la administración de una variedad de drogas que afectan a determinados sustratos moleculares en distintas áreas del cerebro, fueron capaces de modular diferencialmente a las MCT y a las MLT en un paradigma de evitamiento inhibitorio en rata (Cammarota et al., 2007). En este escenario, la formación de MCT no podría ser vista como una condición necesaria para la formación de MLT, siendo los eventos moleculares para cada proceso independientes y paralelos en el tiempo, y responsables de la respuesta comportamental observada (Izquierdo et al., 2002). El mismo razonamiento podría aplicarse a aquellos procesos que ocurren luego de la reactivación de la memoria, aunque en este caso para la reconsolidación de memorias evaluadas a las 24 h y 7 días post reactivación.

Se observó que la administración de PD098059 3 h luego de la reactivación de una memoria disminuye las latencias de entrada al compartimento oscuro en animales evaluados a los 7 días, pero no en aquellos evaluados a las 24 h. El efecto observado es independiente del tipo de estímulo empleado durante el entrenamiento (LFS o HFS), sugiriendo que éste podría ser un mecanismo general del proceso de persistencia de la memoria de evitamiento inhibitorio en ratón. Surgió entonces la

pregunta de si el efecto de PD observado a los 7 días post T1 se debía a un proceso de consolidación prolongado, desencadenado en la sesión de aprendizaje, o si dependía de la reactivación/labilización de la memoria.

Sabiendo que el aumento en los niveles de fosforilación de ERK2 citosólico a las 3 h post T1 sólo fue observado en los grupos reactivados (Figura 4.10), y que la administración del inhibidor en ausencia de la sesión de reactivación no afectó el desempeño de los animales al ser evaluados 7 días luego de la administración (Figura 5.2), podemos afirmar que el efecto de PD098059 fue específico sobre los procesos desencadenados por la reactivación de la memoria, y que los mismos, en última instancia, determinarían la persistencia de dicha traza mnésica. En otras palabras, 51 h luego del TR (tiempo equivalente al utilizado para administrar la droga 3 h luego de T1 en los casos en los que se reactivó la memoria) el proceso de persistencia inducido por la adquisición original de la memoria no sería vulnerable a esta intervención farmacológica.

En su conjunto, los resultados del presente capítulo proporcionan la primera evidencia respecto de los mecanismos de persistencia dependientes de los procesos de reactivación/ reconsolidación de la memoria. Asimismo, se describió la importancia crítica de la vía de ERK 1/2 en estos procesos, sugiriendo que su activación podría ser un evento necesario en la persistencia de la MLT. No obstante, permanece aún como interrogante qué señales río-arriba podrían ser responsables de su activación.

Interacción entre el Sistema Colinérgico y la Vía de Señalización ERK/MAPKs

-6-

En esta sección nos ocuparemos del estudio de la interacción de la vía de activación de ERK/MAPKs y el sistema colinérgico en los procesos que ocurren luego de la reactivación de una memoria de evitamiento inhibitorio.

6.1 INTRODUCCIÓN

En el capítulo 4 se realizó un estudio detallado de la participación de la vía de ERK 1/2 en los procesos de reconsolidación de una memoria de evitamiento inhibitorio. A continuación, se evaluará la posible interacción de la vía de ERK 1/2 hipocampal y el Sistema Colinérgico en los procesos de reconsolidación de la memoria.

Los RcN son considerados un blanco potencial para el descubrimiento de nuevos tratamientos farmacológicos contra trastornos neurodegenerativos tales como el Alzheimer, el Parkinson y la Esquizofrenia. Entre ellos, los RcN α7 son de gran interés por encontrarse en áreas asociadas con déficits cognitivos observados en pacientes con Esquizofrenia y Alzheimer; como el tálamo, el hipocampo y la corteza, entre otras. Así, la administración de agonistas específicos de dichos receptores mejoró el desempeño cognitivo en sujetos experimentales, posiblemente mediante cambios en la plasticidad sináptica del hipocampo (Bitner et al., 2007). Asimismo, los RcN α7 son capaces de modular a nivel pre-sináptico la liberación de los neurotransmisores GABAérgicos y glutamatérgicos, así como mediar el imput excitatorio a nivel post-sináptico (Gray et al., 1996; Radcliffe et al., 1999). Además, animales *knock-down* para la expresión de RcN α7 en el hipocampo y corteza mostraron déficits en la adquisición de tareas como el laberinto de Morris (Curzon et al., 2006).

Sumado a estas evidencias, estudios previos del laboratorio, obtenidos durante la realización de mi Tesis de Licenciatura defendida en el año 2011, evaluaron la participación de los RcN α7 en los procesos de reconsolidación de la memoria de evitamiento inhibitorio en ratón. Mediante la administración intra-hipocampal de

agonistas y antagonistas específicos de dicho receptor (Colina y Metilaconitina, respectivamente) se determinó un papel crítico del receptor en la modulación de la reconsolidación de la memoria (Boccia et al., 2010).

En base a los antecedentes citados, donde se evidencia la participación de los RcN en procesos de aprendizaje y memoria, uno podría hipotetizar que la actividad de estos receptores desencadenaría en la activación de vías de señalización requeridas para el procesamiento cognitivo. Un ejemplo podría ser la vía de activación de Ca^{++} mediada por la cascada de señalización ERK/MAPKs.

Como antecedentes previos a la realización de la tesis de doctorado, se estudiaron los cambios que producía la administración de Colina (Ch) y Metilaconitina (MLA) en el desempeño de los ratones, al ser inyectadas vía intra-hipocampal luego de la reactivación de una memoria de evitamiento inhibitorio débil y fuerte. Los resultados más relevantes se resumen en la Figura 6.1 A y B. La administración del agonista específico Ch generó una mejora en el desempeño de los animales entrenados con un LFS ($p=0.0027$, $U=5.5$ $T2_{Ch}$ *vs* $T2_{Veh}$), mientras que disminuyó las latencias de entrada al compartimento oscuro en aquellos animales entrenados con un HFS ($p=0.02$, $U=18$ $T2_{Ch}$ *vs* $T2_{Veh}$). La administración del antagonista específico MLA disminuyó las latencias de entrada al compartimento para ambos tipos de entrenamiento (LFS: $p=0.003$, $U=3.0$; HFS: $p=0.0001$, $U=0$ $T2_{MLA}$ *vs* $T2_{Veh}$).

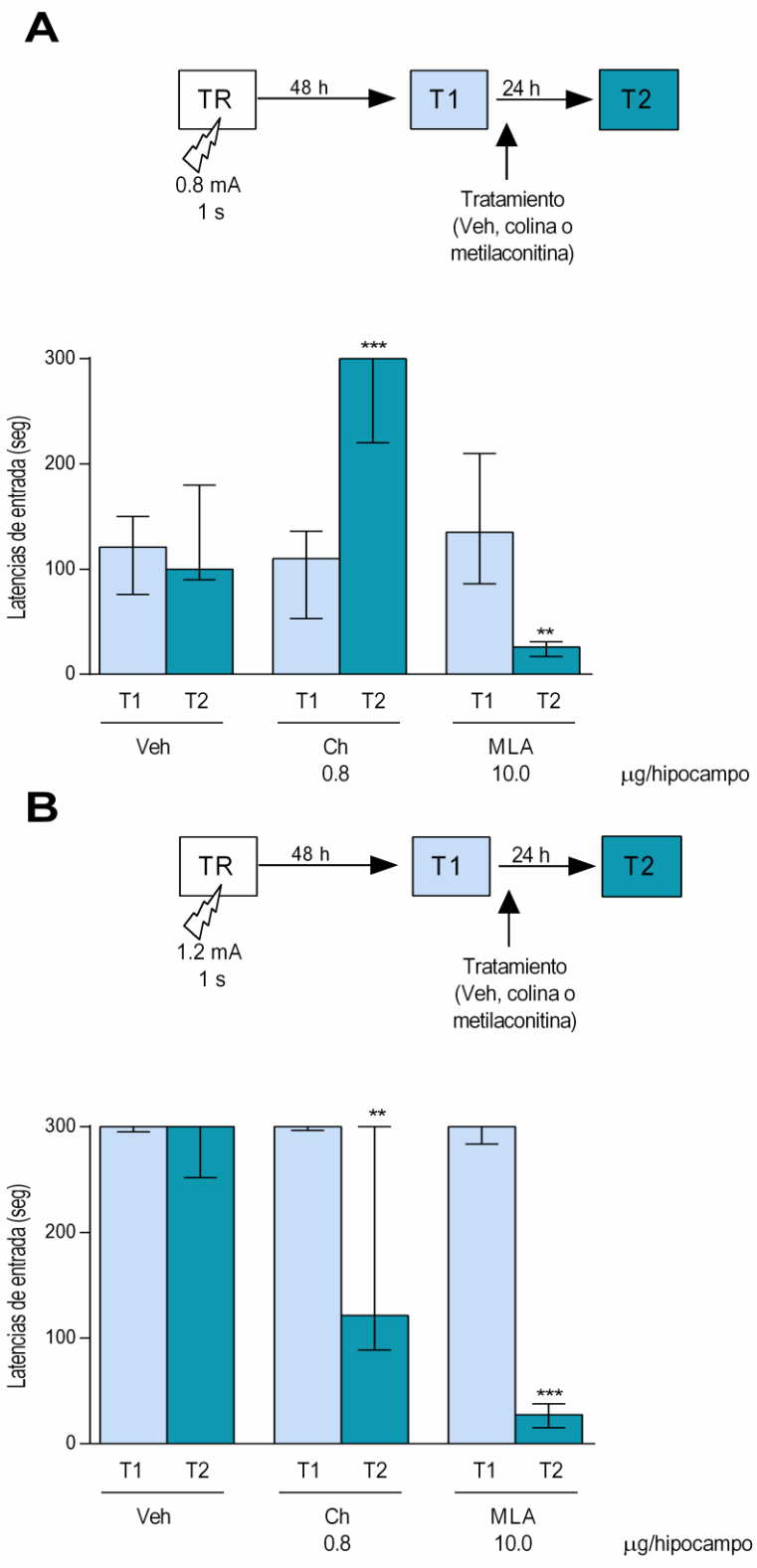

Figura 6.1. La administración de colina y metilaconitina luego de la reactivación de la memoria generan cambios en el desempeño de los animales dependiendo del tipo de entrenamiento

empleado. Efectos de la administración intrahipocampal de vehículo (Veh) colina (Ch, 0.8 µg/hipocampo) o metilaconitina (MLA, 10.0 µg/hipocampo) inmediatamente post reactivación de la memoria (T1) en el desempeño de animales entrenados con un LFS **(A)** o HFS **(B)**. Cada barra representa las medianas con sus respectivos espacios intercuartiles (n=10 ratones/grupo).TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación, Ch: colina, MLA: metilaconitina. El protocolo experimental para cada caso se encuentra representado en la parte superior de la figura. ** $p < 0.01$ (T2 vs T2 Veh en contrastes de Dunn). Adaptado de Krawczyk, 2011 (Tesis de licenciatura).

6.2 LA ADMINISTRACIÓN DE COLINA Y METILACONITINA PRODUCE UN CAMBIO EN LOS NIVELES DE ACTIVACIÓN DE ERK 1/2 EN EL HIPOCAMPO DE RATÓN.

A partir de los resultados obtenidos en mi tesis de licenciatura, decidimos evaluar la posible interacción entre la vía colinérgica, en particular de los RcN, y la vía de señalización de ERK 1/2.

En una primera aproximación evaluamos la interacción propuesta entre los RcN α7 y la vía de señalización de ERK 1/2. Entonces, 6 grupos de animales fueron entrenados en la TEI con un LFS. A las cuarenta y ocho horas se realizó la sesión de reactivación (T1). Inmediatamente luego, se administró por vía intra-hipocampal bilateral solución salina (Veh), Ch (0.8 µg/hipocampo) o MLA (10.0 µg/hipocampo). A los 15 o 45 min los animales fueron sacrificados y se realizaron los extractos hipocampales citosólicos y nucleares tal y como se detalló en la sección de materiales y métodos y en la sección 5.1. Para cada tiempo estudiado se incluyeron sendos grupos *Naïve* (NV) como control de los niveles basales de activación de la quinasa.

Como puede observarse en la Figura 6.2 A, cuando los animales fueron entrenados con un LFS, la administración de Veh, Ch o MLA sólo produjo cambios estadísticamente significativos en la activación de ERK2 a nivel de citosol, 15 min luego de la reactivación de la memoria (ERK1: F=1.37, p=0.27; ERK2: F=6.47, p=0.001). En particular, a los 15 min se evidenciaron aumentos significativos en la activación de ERK2 para los grupos inyectados con Veh y Ch con respecto al grupo NV (q=5.98, p=0.01, $ERK2_{Veh}$ *vs* $ERK2_{NV}$; q=3.96, p=0.05, $ERK2_{Ch}$ *vs* $ERK2_{NV}$). El nivel de activación de ERK2 en el grupo Veh fue, además, significativamente mayor al nivel de activación del grupo tratado con MLA (q=3.61, p=0.05 $ERK2_{MLA}$ *vs* $ERK2_{Veh}$).

En el caso de los extractos realizados a 45 min, se encontraron cambios en los niveles de fosforilación de ERK1 y ERK2 citosólicas (ERK1: F=6.49, p=0.003; ERK2: F=15.52, p<0.0001). Específicamente, los niveles de activación de ERK1 en los grupos Veh y MLA resultaron significativamente mayores a los del grupo NV (q=5.74, p=0.01 $ERK1_{Veh}$ *vs* $ERK1_{NV}$; q=4.56, p=0.05 $ERK1_{MLA}$ *vs* $ERK1_{NV}$). Asimismo, dichos grupos también mostraron niveles de activación de ERK2 significativamente mayores al grupo NV (q=4.7, p=0.01 $ERK2_{Veh}$ *vs* $ERK2_{NV}$; q=9.59, p=0.001 $ERK2_{MLA}$ *vs* $ERK2_{NV}$). Más aún, la activación de ERK2 citosólica del grupo Ch fue significativamente mayor a la del grupo control (q=3.58, p=0.05). Por último, cabe destacar que los valores de activación de ERK2 del grupo MLA fueron significativamente mayores a la de los grupos Veh y Ch (q=4.95, p=0.01 $ERK2_{Veh}$ *vs* $ERK2_{MLA}$; q=5.98, p=0.01 $ERK2_{Ch}$ *vs* $ERK2_{MLA}$).

La Figura 4.2 B detalla los niveles de activación de ERK 1/2 para los distintos grupos en los extractos nucleares. Se observaron diferencias significativas

únicamente en los niveles de activación de ERK2 nuclear a los 15 y 45 min (F=4.25, p=0.01; F=7.5, p=0.001; respectivamente). Sólo el grupo MLA presentó aumentos significativos de la activación de ERK2 con respecto al grupo control en los extractos realizados 15 min post T1 (q=4.81, p=0.01). Finalmente, a los 45 min se observaron diferencias significativas específicamente entre los grupos NV, Ch y MLA *vs* Veh (q=5.76, p=0.1 $ERK2_{NV}$ *vs* $ERK2_{Veh}$; q=5.86, p=0.01 $ERK2_{Ch}$ *vs* $ERK2_{Veh}$; q=3.15, p=0.05 $ERK2_{MLA}$ *vs* $ERK2_{Veh}$).

A continuación, se realizaron los mismos experimentos arriba descriptos con la diferencia del tipo de entrenamiento empleado, siendo ahora un HFS. Los resultados se muestran en la Figura 6.3. Se encontraron diferencias significativas en la activación de ERK2 a los 15 min de la reactivación de la memoria (F=11.03, p=0.0003, Figura 6.3 A). Los niveles de activación de ERK2 del grupo Veh fueron significativamente mayores a los del grupo NV en este punto temporal (q=6.39, p=0.001, $ERK2_{Veh}$ *vs* $ERK2_{NV}$). A su vez, los niveles de ERK2 del grupo Veh fueron significativamente mayores a la de los grupos Ch y MLA (q=4.34, p=0.01; q=7.61, p=0.001; $ERK2_{Ch}$ / $ERK2_{MLA}$ *vs* $ERK2_{Veh}$, respectivamente).

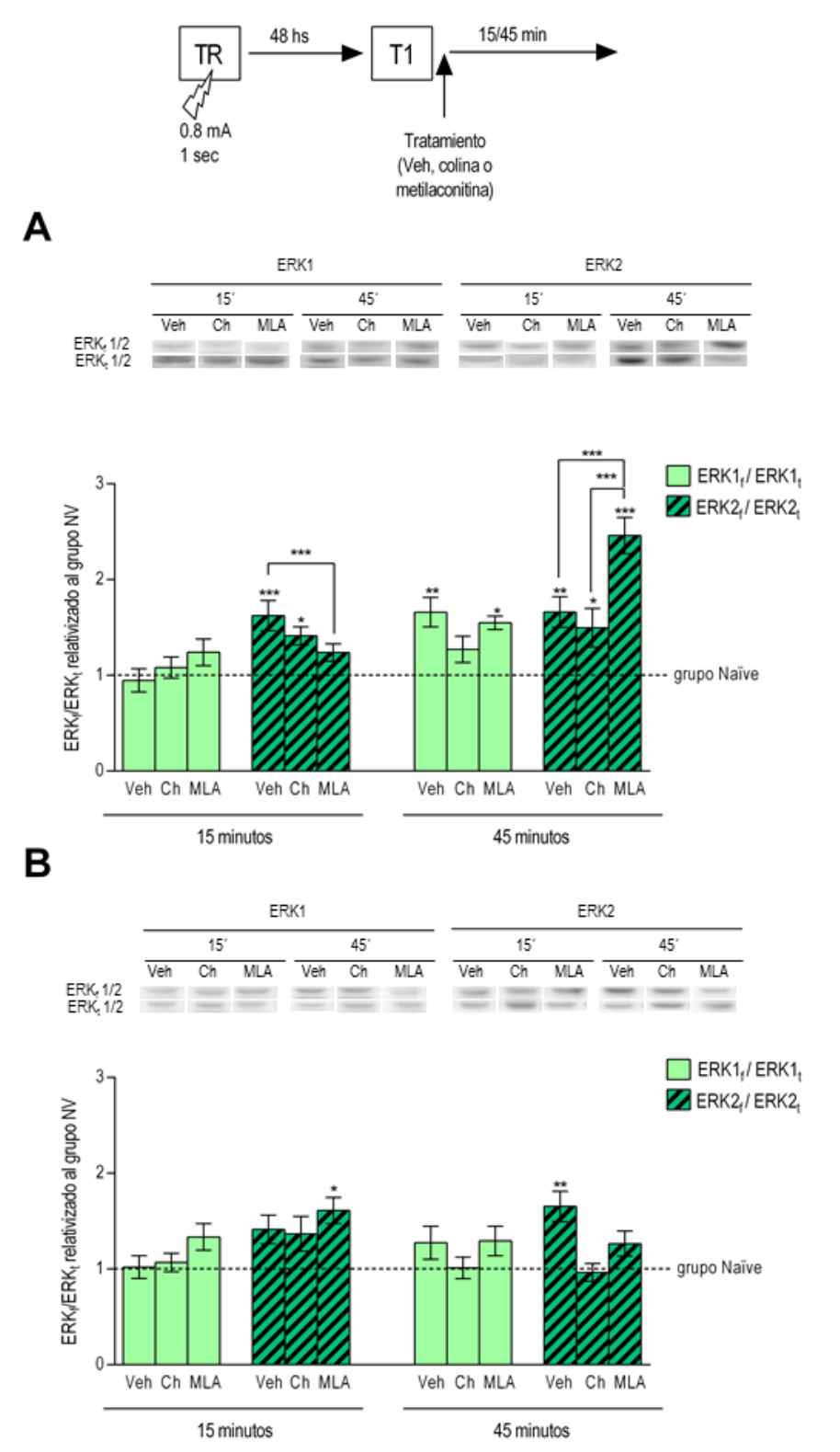

Figura 6.2. Activación de ERK 1/2 post administración de un agonista o antagonista específico RcNα7 inmediatamente luego de la reactivación de una memoria de evitamiento inhibitorio

débil. Extractos citosólicos **(A)** y nucleares **(B)** de animales administrados con Vehículo (Veh), colina (Ch, 0.8 µg/hipocampo) o metilaconitina (MLA, 10.0 µg/hipocampo), realizados 15 (panel izquierdo) o 45 (panel derecho) minutos luego de la reactivación de la memoria de tipo débil. Las barras indican la densidad óptica media ± error estándar de la relación ERK_f/ERK_t para las bandas específicas de la isoforma 1(barras lisas) y 2 (barras rayadas) obtenidas. *** $p<0.001$ R_{ERK1},R_{ERK2} en relación al grupo NV, test de comparaciones múltiples de Dunnet. La línea punteada representa la media del grupo *Naïve* (n=8) en cada gráfico. En la parte superior de los gráficos A y B se muestra un diagrama del protocolo experimental.

Al analizar los resultados obtenidos a los 45 min en animales entrenados con un HFS, se observaron diferencias significativas en los niveles de activación de ERK1 y ERK2 citosólicas (ERK1: F=3.72, p=0.025; ERK2: F=19.76, p<0.0001). Puntualmente, en el caso de ERK1, se observó un aumento significativo luego de la administración de MLA (q=3.33, p=0.01 $ERK1_{MLA}$ *vs* $ERK1_{NV}$), mientras que en el caso de ERK2, tanto los grupos inyectados con Veh como MLA presentaron niveles de activación significativamente mayores que el grupo NV (q=4.96, p=0.01 $ERK2_{Veh}$ *vs* $ERK2_{NV}$; q=10.6, p=0.001 $ERK2_{MLA}$ *vs* $ERK2_{NV}$). Los niveles de activación del grupo MLA fueron, a su vez, significativamente mayores a los de los grupos Veh y Ch (q=5.58, p=0.001; q=7.75, p=0.001; $ERK2_{Veh}$ / $ERK2_{Ch}$ *vs* $ERK2_{MLA}$). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de activación de ERK 1/2 por la administración de Ch.

Al analizar los resultados de los extractos nucleares para los grupos entrenados con un HFS (Figura 6.3 B), se encontraron diferencias significativas sólo para ERK2 en los extractos realizados 15 min post T1 (ERK1: F=1.0, p=0.42; ERK2: F=11.71, p=0.0004), no así a los 45 min (ERK1: F=1.24, p=0.32 y ERK2: F=2.56, p=0.08). A los 15 min, el grupo MLA fue significativamente mayor al resto de los grupos (q=6.89,

p=0.001; q=6.15, p=0.001; q=7.54, p=0.001; $ERK2_{NV}$ / $ERK2_{Veh}$ / $ERK2_{Ch}$ *vs* $ERK2_{MLA}$, respectivamente).

Los datos de la Figura 6.3 A mostraron un aumento significativo de los niveles de activación de ERK2 citosólico a los 45 min en el grupo de animales entrenados con HFS. Sin embargo, en la Figura 4.1 A del capítulo 4 (activación de ERK 1/2 15 y 45 min post-T1 en animales entrenados con HFS), se observó una disminución en la activación de ERK2 citosólico a los 45 min.

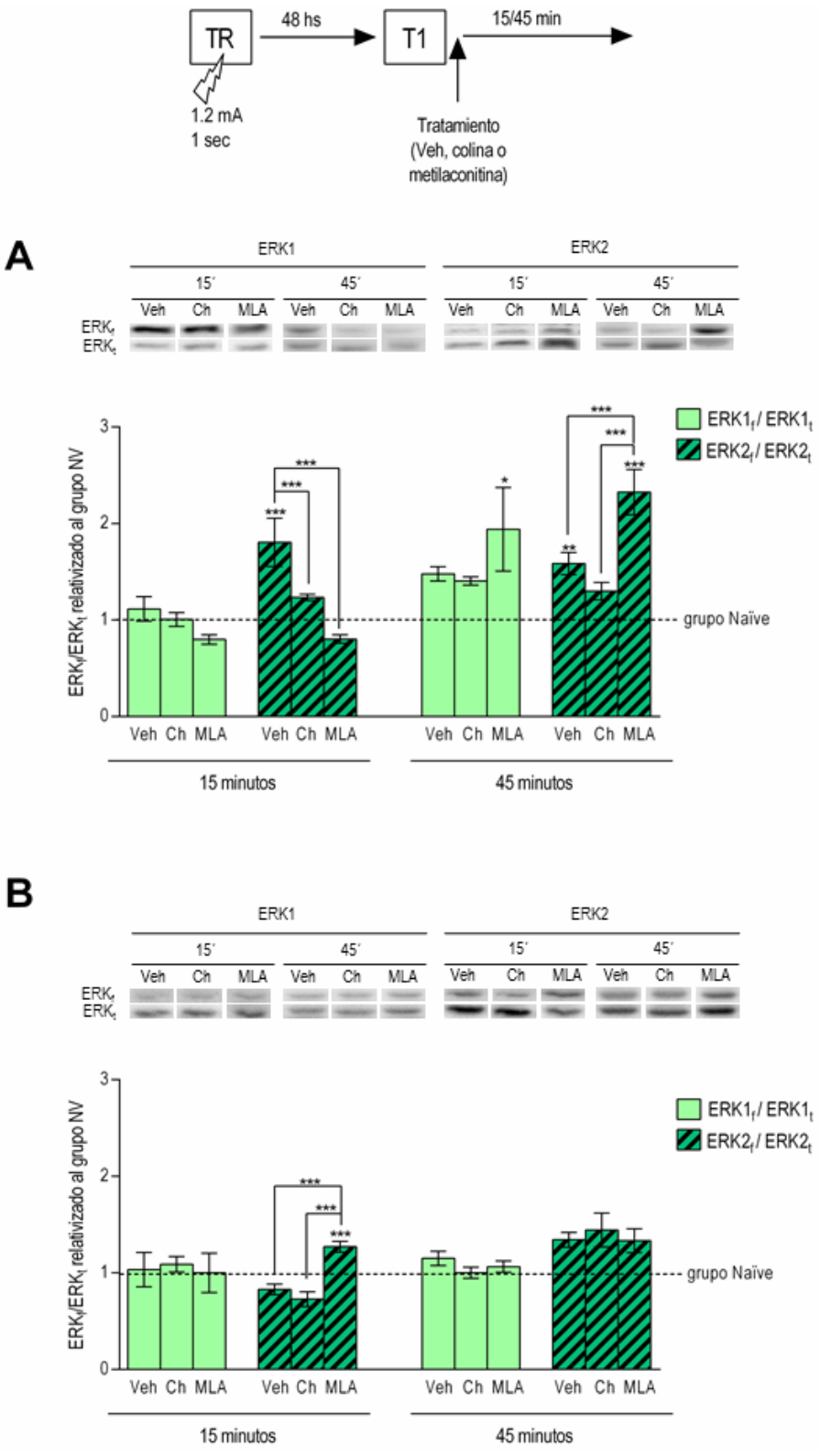

Figura 6.3. Activación de ERK 1/2 post administración de un agonista o antagonista específico

RcNα7 inmediatamente luego de la reactivación de una memoria de evitamiento inhibitorio fuerte. Extractos citosólicos **(A)** y nucleares **(B)** de animales administrados con Vehículo (Veh), colina (Ch, 0.8 µg/hipocampo) o metilaconitina (MLA, 10.0 µg/hipocampo), realizados 15 (panel izquierdo) o 45 (panel derecho) minutos luego de la reactivación de la memoria de tipo fuerte. Las barras indican la densidad óptica media ± error estándar de la relación ERK_f/ERK_t para las bandas específicas de la isoforma 1(barras lisas) y 2 (barras rayadas) obtenidas. *** $p<0.001$ R_{ERK1}, R_{ERK2} en relación al grupo NV, test de comparaciones múltiples de Dunnet. La línea punteada representa la media del grupo *Naïve* (n=8) en cada gráfico. En la parte superior de los gráficos A y B se muestra un diagrama del protocolo experimental.

Consideramos que una potencial explicación a esta diferencia observada podría atribuirse a la cirugía realizada para la administración de las drogas. Con el fin de estudiar el eventual efecto de este procedimiento sobre los niveles de activación de ERK2 citosólicos, se realizó el siguiente experimento. Dos grupos (n=8 ratones/grupo) fueron entrenados en la TEI con un HFS. Cuarenta y ocho horas luego se realizó la sesión de reactivación (T1). Inmediatamente post T1, un grupo fue sometido a la cirugía (tal y como se realizó en los experimentos descriptos en esta sección); grupo T1 Op. Dos grupos fueron añadidos como controles *naïve* (NV), uno de los cuales también fue sometido a la cirugía (NV Op). Se realizaron extractos citosólicos 45 min luego y se analizaron mediante *western blot*. Como se observa en la Figura 6.4, sólo los animales entrenados y reactivados, pero no sometidos a la cirugía, mostraron niveles de activación de ERK2 significativamente menores al grupo NV ($F=3.65$, $p=0.02$; $q=4.014$, $p=0.01$ $ERK2_{T1}$ *vs* $ERK2_{NV}$); replicando los datos detallados en la Figura 4.1 A.

No se encontraron diferencias entre los niveles de activación de ERK para los grupos NV Op y NV. Sin embargo, la activación de ERK2 citosólica del grupo T1 Op no difirió

significativamente del grupo NV, sugiriendo que el procedimiento *per se* podría estar alterando los niveles de activación de ERK 1/2 en animales entrenados y reactivados.

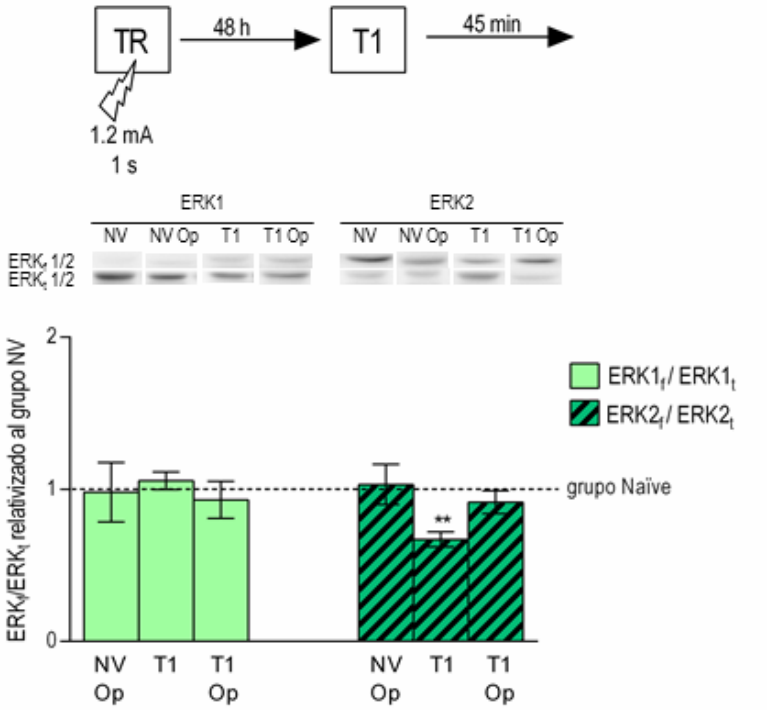

Figura 6.4. Efectos de la cirugía en la activación de ERK 1/2 citosólica. Extractos citosólicos 15 min post reactivación de una memoria fuerte de animales operados (T1 Op) *vs* no operados (T1). Además, se agregó un grupo operado que no fue sometido a la tarea comportamental (NV Op). Las barras indican la densidad óptica media ± error estándar de la relación ERK_f/ERK_t para las bandas específicas de la isoforma 1(barras lisas) y 2 (barras rayadas) obtenidas. ** $p<0.01$, ERK2 en relación al grupo NV, test de comparaciones múltiples de Dunnet. La línea punteada representa la media del grupo *Naïve* (n=8) en cada gráfico. En la parte superior del gráfico se muestra un diagrama del protocolo experimental.

6.3 LA CO-ADMINISTRACIÓN DE COLINA Y PD098059 REVIERTE EL DETERIORO EN EL DESEMPEÑO PRODUCTO DE LA SOLA ADMINISTRACIÓN DE COLINA.

En la sección anterior se estudió la posibilidad de que el sistema colinérgico estuviera modulando la activación de la vía de ERK/MAPKs. Por otra parte, la administración de Ch inmediatamente post T1 generaba una disminución de la latencia de entrada al compartimento oscuro, con respecto a su control inyectado con Veh en animales entrenados con HFS (Figura 6.1B).

En base a estos resultados, el siguiente paso fue evaluar si la administración de un cocktail del inhibidor de la fosforilación de ERK 1/2 y Colina (PD098059 + Ch) podría revertir el efecto observado por la administración de Ch. Para ello, 4 grupos de 10 animales fueron entrenados en la TEI con un HFS. Cuarenta y ocho horas luego se realizó la sesión de reactivación (T1), e inmediatamente luego se administró Veh, Ch (0.8 µg/hip), PD098059 (0.1 µg/hip) o Ch + PD098059 (Ch: 0.8 µg/hip; PD: 0.1 µg/hip). Veinticuatro horas luego se realizó el ensayo de evaluación (T2, Figura 6.5). La administración de 0.1 µg/hip de PD (dosis 10 veces menor a la empleada en los experimentos anteriores) no generó diferencias en el comportamiento de los animales con respecto al grupo Veh ($H=15.99$, $p=0.001$; DRS=4.67, $p>0.05$, $T2_{PD\ 0.1}$ *vs* $T2_{Veh}$). La administración de Ch post reactivación disminuyó significativamente las latencias de entrada al compartimiento oscuro comparadas con el grupo Veh (DRS=15, $p=0.01$, $T2_{Ch}$ *vs* $T2_{Veh}$), como se esperaba en base a resultados previos. Sorprendentemente, la co-administración de 0.1 µg/hip de PD con 0.8 µg/hip de Ch (cocktail) revirtió la amnesia observada en el grupo Ch (DRS= -10.35, $p=0.05$, $T2_{Ch+PD}$ *vs* $T2_{Ch}$).

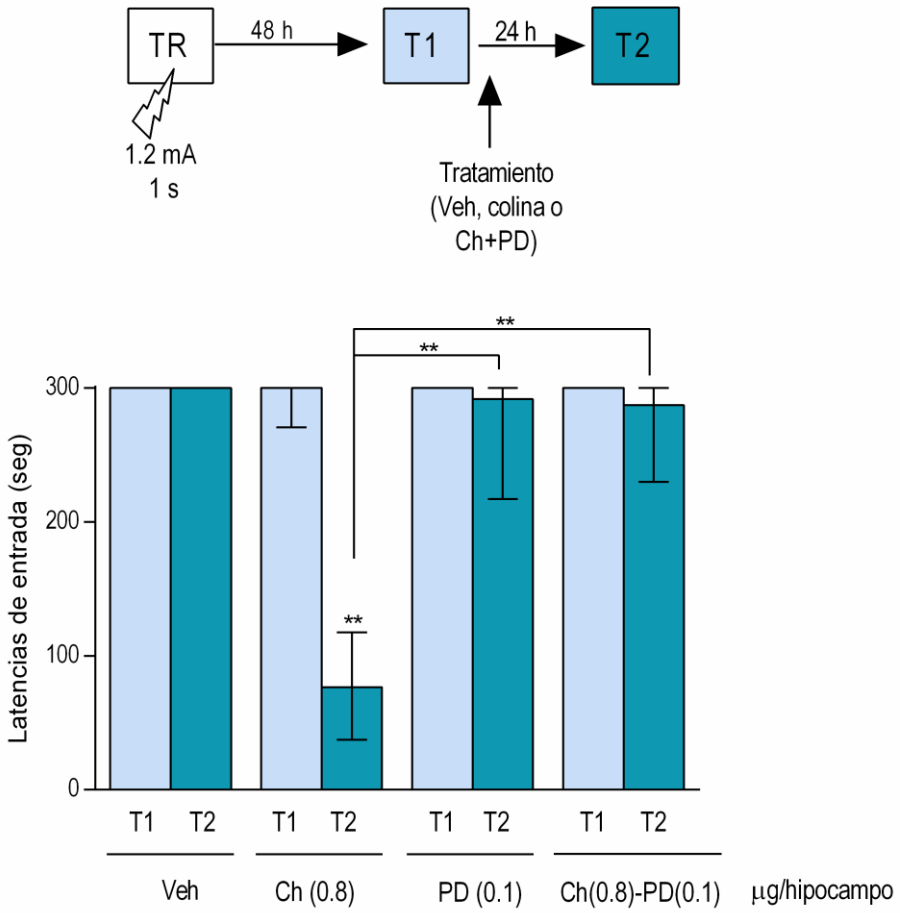

Figura 6.5. La co-administración de PD098059 y de colina, revierte los efectos de la sola administración del agonista. Efecto de la administración de vehículo (Veh), colina (Ch, 0.8µg/hipocampo), PD098059 (PD, 0.1µg/hipocampo) o una combinación de colina y PD098059 (Ch: 0.8µg/hipocampo + PD: 0.1µg/hipocampo) luego de la reactivación de la memoria. Cada barra representa las medianas con sus respectivos espacios intercuartiles.TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación, HFS: animales entrenados con un estímulo fuerte (1.2 mA), Ch: colina, PD: PD098059. El protocolo experimental se encuentra representado en la parte superior de la figura. ** $p < 0.01$ (T2 *vs* $T2_{Veh}$ y $T2_{Ch+\ PD}$ *vs* $T2_{Ch}$; Dunn´s test).

6.4 DISCUSIÓN

En la introducción se discutió la importancia de la vía de ERK 1/2 en la formación de memorias de largo término; específicamente de su activación en el hipocampo (Adams and Sweatt, 2002) y la corteza pre-frontal (Runyan and Dash, 2004). Asimismo, existe bibliografía donde se vincula la mejora en el desempeño comportamental con el aumento de los niveles de ERK 1/2 en hipocampo de ratones inducidos por la administración de un agonista novedoso de los RcN α7, sugiriendo un efecto modulador de la vía colinérgica sobre la memoria (Bitner et al., 2007; Giovannini et al., 2015).

En este capítulo se evaluó la regulación ejercida por el sistema colinérgico sobre la activación de la vía de ERK 1/2 luego de la reactivación de la memoria de evitamiento inhibitorio. Para ello, en primera instancia, se administró un agonista y un antagonista de los RcN α7 inmediatamente luego de la reactivación de una memoria débil o fuerte de la TEI y se realizaron extractos proteicos a 15 y 45 min luego de la inyección. Independientemente del tiempo en que se realizaron los extractos y el tipo de entrenamiento empleado, tanto la Ch como la MLA alteraron los niveles de activación de ERK 1/2 citosólicos y nucleares.

El aumento observado de los niveles de activación de ERK2 en el grupo Veh, tanto a los 15 como 45 min post T1 en animales entrenados con un LFS, concuerda con la activación de ERK2 descripta luego de la reactivación de dicha memoria (sección 4.5). La administración de Ch (0.8 µg/hipocampo) aumentó los niveles de activación de ERK2 citosólico respecto del NV para los dos tiempos estudiados. Al inicio de este capítulo se describió el efecto de la administración de la dosis de Ch

sobre la reconsolidación de una memoria débil de evitamiento inhibitorio. La misma induce un aumento significativo de las latencias de entrada al compartimento oscuro en animales evaluados 24 h luego de T1. Si la Ch facilita la reconsolidación de la memoria, a la luz de nuestros resultados, se podría hipotetizar que, a nivel molecular, deberían producirse cambios significativos en los niveles de activación de ERK2 con respecto al grupo Veh. Si bien se observó una tendencia a la disminución de la activación de ERK2 a los 15 y 45 min con respecto al grupo Veh, las mismas no fueron significativas. Sin embargo, en los animales entrenados con un HFS, la Ch fue capaz de prevenir la activación de ERK2 observada en los grupos Veh a 15 ($p<0.001$) y 45 min (ver comparación $ERK2_{Veh}$ *vs* $ERK2_{NV}$ y $ERK2_{Ch}$ *vs* $ERK2_{NV}$), sugiriendo que los RcNα7 estarían involucrado en la regulación de la vía de ERK 1/2 en los procesos de reconsolidación de la memoria.

La administración de MLA post T1 disminuyó significativamente el desempeño de los animales al ser evaluados a las 24 h post inyección para ambos tipos de entrenamiento. En ambas situaciones, el antagonista del RcNα7 fue capaz de revertir el incremento en la activación de ERK2 a los 15 min, mientras que a los 45 min indujo una sobre activación de la vía a nivel citosólico. Más aún, a los 15 min también se observó un incremento en los niveles nucleares de ERK2, sugiriendo una desregulación de la vía.

En la determinación de la activación de ERK2 citosólica 45 min post-T1, se obtuvo un resultado distinto al esperado: los niveles de activación citosólica de ERK2 del grupo Veh fueron significativamente mayores a los del grupo NV. Es importante destacar que la inhibición observada en extractos de animales entrenados con HFS

(que se esperaba observar nuevamente en estos extractos) fue un resultado replicado en experimentos independientes que no requirieron procedimientos quirúrgicos (ej. Figuras 4.1 A; 4.2 A). Con el propósito de determinar si este resultado podría explicarse por un efecto inespecífico de la cirugía sobre los niveles de activación de ERK 1/2, se entrenaron 2 grupos de animales y se compararon los niveles de activación de la quinasa con sendos grupos NV. Uno de los pares de grupos entrenado-NV fue sometido al mismo procedimiento quirúrgico que en los experimentos del capítulo 6. La cirugía realizada en animales reactivados (T1 Op), a diferencia del grupo NV (NV Op) indujo un aumento de los niveles de activación de ERK2 citosólico a los 45 min similares a los del grupo NV (Figura 6.4). Estos resultados podrían explicar, al menos en parte, la activación inesperada en el grupo Veh de la Figura 6.3 A. Diversos estudios han determinado que los niveles de activación de ERK son alterados como consecuencia de la respuesta inflamatoria (Feng and Li, 2011; Rafiee et al., 1995). Continuando con este razonamiento, se podría suponer que la activación de ERK evaluada en los distintos compartimentos celulares, debería ser menor a la observada, de omitirse el procedimiento quirúrgico.

Finalmente se llevó a cabo un estudio comportamental, cuyo objetivo fue evidenciar una posible interacción entre la vía colinérgica y la activación de ERK 1/2. La administración conjunta de una dosis comportamentalmente no efectiva *per sé* de PD (0.1 µg/hipocampo) con la dosis de Ch que genera un deterioro en el desempeño de los animales (0.8 µg/hipocampo) fue capaz de revertir el efecto de la administración solo del agonista de RcN.

En los extractos nucleares, se observaron diferencias en la activación de ERK2 a los 15 min en aquellos animales tratados con MLA y entrenados con un HFS. Esta activación es coincidente con una inhibición citosólica, sugiriendo una desregulación en la localización subcelular de la actividad de la vía, que podría aportar a explicar, al menos en parte, los efectos conductuales.

Los resultados del presente capítulo no permiten concluir definitivamente cómo el sistema colinérgico, particularmente el mediado por RcNα7, modula las cascadas de activación de proteínas ERK 1/2 en el hipocampo. Sin embargo, resaltamos que se evidencia una potencial interacción entre ambos sistemas. Esto es, los resultados sugieren que los agonistas y antagonistas de RcNα7, modulan a los procesos de reconsolidación de la memoria, al menos en parte, regulando la vía responsable de la fosforilación de ERK2 a nivel citosólico. Esto reviste importancia pues el Laboratorio ha demostrado que la sobreactivación de dicha vía en la corteza prefrontal podría contribuir al deterioro cognitivo observado en ratones que constituyen un modelo de la enfermedad de Alzheimer (3xTg). Asimismo, la reversión farmacológica de dicha sobreactivación de la vía, es capaz de revertir dicho deterioro (Feld et al., 2014).

Por otra parte, los resultados de la Figura 5.3 sugieren que la Ch es capaz de prevenir la activación de ERK 1/2 citosólica. Esta modulación podría, al menos en parte, explicar el deterioro conductual observado en animales entrenados con HFS (ver Figura 6.5). Sin embargo, la administración conjunta de PD+Ch es capaz de revertir dicho deterioro. Una posible explicación a esta observación podría atribuirse al requerimiento de niveles de inhibición de ERK 1/2 en determinados tiempos, responsables de los procesos de reconsolidación de este tipo de memoria,

determinantes para una posterior expresión conductual. Un resultado similar fue observado en el capítulo 4 (Figura 4.8) donde la administración de un inhibidor de la fosforilación de ERK 1/2 a los 40 min produjo un incremento en el desempeño de los animales comparados con aquellos tratados con Veh y entrenados con un HFS.

El Sistema Colinérgico

Y

La reconsolidación de la memoria

-7-

En esta sección nos ocuparemos de continuar con el estudio de la participación del Sistema Colinérgico en los procesos que ocurren luego de la reactivación de una memoria de evitamiento inhibitorio. Para ello, estudiaremos la participación de la vía Colinérgica muscarínica.

7.1 INTRODUCCIÓN

La Acetilcolina juega un papel esencial en los fenómenos mnésicos (Blokland, 1995; Decker and McGaugh, 1991).

A lo largo de estos últimos 10 años, el laboratorio ha demostrado la participación del sistema colinérgico en los distintos procesos de memoria. Entre ellos, se comprobó que la ACh endógena es necesaria para que ocurran los procesos de: consolidación de la memoria a largo término (Boccia et al., 2004), reactivación de la memoria (Boccia et al., 2003), extinción (Boccia et al., 2009) y reconsolidación (Boccia et al., 2004, 2006) de la memoria.

A nivel mundial, se han realizado estudios acerca de la participación de los distintos subtipos de receptores colinérgicos (RcM y RcN) en los procesos de memoria, mediante el uso de agonistas y antagonistas generales (Fibiger, 1991; Power et al., 2003; Quirarte et al., 1993). Sin embargo, poco se sabe hasta el momento acerca de qué tipos específicos de RcM y RcN son los que juegan un rol preponderante en los procesos de reconsolidación de la memoria. Continuando con los estudios de la participación de la vía colinérgica en los distintos procesos de la memoria, se demostró que los RcN α7 hipocampales son capaces de modular los procesos de reconsolidación de la memoria en una tarea de evitamiento inhibitorio (Boccia et al., 2010). Dicho trabajo formó parte de mi tesina de Licenciatura (Krawczyk 2011) y los resultados fueron presentados como antecedentes en el capítulo 6. En el presente capítulo nos centraremos en la participación de la vía colinérgica muscarínica en los procesos de reconsolidación de la memoria.

Hasta el momento, se encuentran descriptos 5 subtipos de receptores muscarínicos (RcM) denominados M1-M5 respectivamente. Cada subtipo posee una distribución específica en el sistema nervioso central y periférico, siendo expresados tanto a nivel pre- como post- sináptico (Levey, 1993). Los RcM M1 se encuentran predominantemente expresados en las áreas mayores del cerebro anterior, incluyendo al hipocampo, corteza cerebral, cuerpo estriado y el tálamo. Por su parte, los RcM M2 se encuentran en gran abundancia en neuronas no colinérgicas que proyectan hacia todo el cerebro, incluyendo el hipocampo y el neo córtex. Los RcM M3 están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, encontrándose tanto en el hipotálamo con en muchas otras regiones que incluyen al hipocampo. En contraposición, los RcM M4 se expresan principalmente en el cuerpo estriado dentro del sistema nervioso central. También se los puede encontrar en las terminales nerviosas de la periferia. Finalmente, los RcM M5 están distribuidos en la pars compacta y en la sustancia nigra, así como también en el área tegmental ventral.

7.2 PARTICIPACIÓN DE LA VÍA COLINÉRGICA MUSCARÍNICA EN LOS PROCESOS DE RECONSOLIDACIÓN DE UNA MEMORIA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO.

En primera instancia, estudiamos la posible participación del sistema colinérgico vía receptores muscarínicos en los procesos de reconsolidación de la memoria en una tarea de evitamiento inhibitorio. Para ello realizamos los dos experimentos que se detallan a continuación, evaluando la administración de un agonista y de un

antagonista no selectivo de los RcM, llamados Oxotremorina y Escopolamina respectivamente (Co Tui and Debruille, 1945; Ringdahl and Jenden, 1983).

En el primer experimento 8 grupos (n=10 ratones/grupo) fueron entrenados en la tarea de evitamiento inhibitorio. La mitad recibió un LFS y el resto de los grupos un HFS. Cuarenta y ocho horas post TR se realizó el ensayo de reactivación (T1) e inmediatamente luego los animales recibieron una administración intra-hipocampal bilateral de solución salina (Veh) u Oxotremorina (OXO, 1.0; 3.0 ó 10.0 ng/hipocampo). Los animales fueron nuevamente evaluados 24 h post T1 (T2, Figura 7.1 A, B).

Como se ve en la Figura 7.1 A, la administración intra-hipocampal de 10.0 ng/hipocampo de OXO luego de la sesión de reactivación produce un aumento significativo de las latencias de entrada al compartimento oscuro con respecto al grupo control (Veh) en animales entrenados con un LFS (H=8.14, p=0.04; DRS= -13.07, p=0.05 $T2_{Veh}$ *vs* $T2_{OXO10}$). Por el contrario, en animales entrenados con HFS, la inyección de 3.0 ng/hipocampo produjo una disminución significativa de las latencias de entrada al compartimento (DRS= 14.69, p=0.01, $T2_{Veh}$ *vs* $T2_{OXO3.0}$, Figura 7.1 B).

En base a estos resultados, la OXO, tendría un efecto dosis-dependiente sobre la reconsolidación de la memoria para ambas condiciones de entrenamiento.

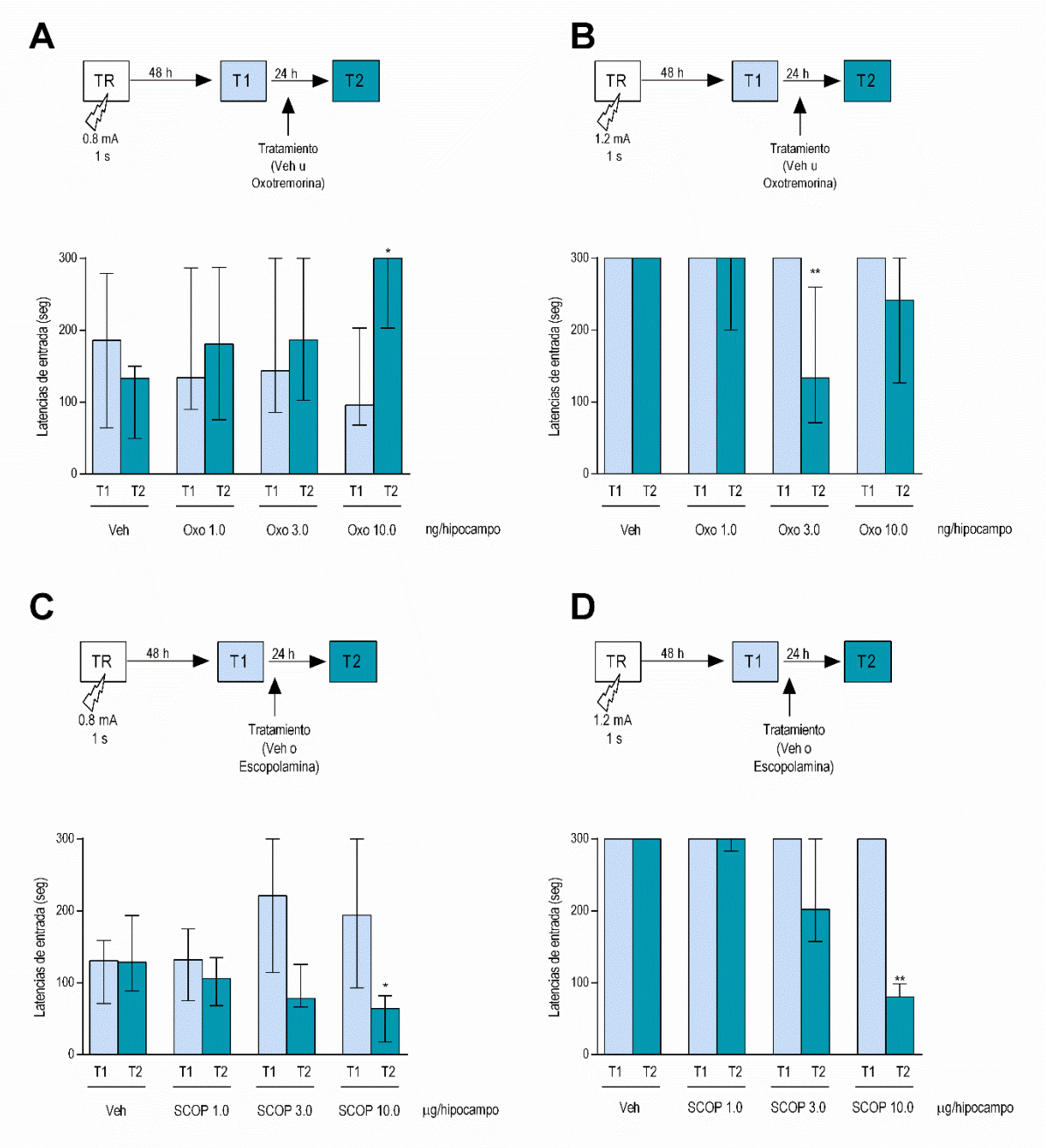

Figura 7.1. La administración de oxotremorina (agonista no selectivo de los RcM) o escopolamina (antagonista no selectivo de los RcM) luego de la reactivación de la memoria, facilita o deteriora el desempeño de los animales dependiendo del tipo de entrenamiento empleado. Efectos de la administración intra-hipocampal de vehículo (Veh), oxotremorina (**A**,**B**; 1.0, 3.0, y 10.0 µg/hipocampo) o escopolamina (**C**, **D**; SCOP 1.0, 3.0, y 10.0 µg/hipocampo) inmediatamente post reactivación (T1) en el desempeño de animales entrenados con un LFS **(A**, **C)** o HFS **(B**, **D)**. Cada barra representa las medianas con sus respectivos espacios intercuartiles (n=10 ratones/grupo).TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación, HFS: animales

entrenados con un estímulo fuerte (1.2 mA), LFS: animales entrenados con un estímulo débil (0.8 mA), OXO: Oxotremorina. El protocolo experimental para cada caso se encuentra representado en la parte superior de la figura. * p<0.05, ** p < 0.01 (T2 vs $T2_{Veh}$; Test de comparaciones múltiples Dunn).

Se realizó el mismo protocolo del experimento anterior variando la droga empleada luego del ensayo de reactivación (T1). En este caso se administró solución salina (Veh) o Escopolamina (SCOP, 1.0; 3.0 ó 10.0 µg/hipocampo, Figura 7.1 C, D). La administración de 10.0 µg/hipocampo de SCOP disminuyó significativamente las latencias de entrada al compartimento en animales entrenados con un LFS al comparar los valores con los del grupo Veh (H=7.9, p=0.048; DRS=12.13, p=0.05,$T2_{Veh}$ *vs* $T2_{SCOP10}$; Figura 7.1C). Más aún, al evaluar a los animales entrenados con un HFS, la inyección de 3.0 µg/hipocampo de SCOP indujo una disminución significativa de las latencias de entrada al compartimento oscuro (H=23.8, p<0.0001; DRS=19.38, p<0.001, $T2_{SCOP3}$ *vs* $T2_{Veh}$, Figura 7.1D).

7.3 LOS EFECTOS DE OXOTREMORINA Y ESCOPOLAMINA SON OBSERVADOS ESPECÍFICAMENTE A PARTIR DE LA REACTIVACIÓN DE LA MEMORIA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO.

El siguiente paso fue evaluar si las variaciones en el desempeño de los animales observadas por la administración del agonista (OXO) y del antagonista (SCOP) no selectivo de los RcM son específicas y están dadas a partir de la reactivación de la memoria. Para ello, 6 grupos (n=10 ratones/grupo) fueron entrenados en la tarea de evitamiento inhibitorio, la mitad con un LFS y los grupos restantes con un HFS.

Cuarenta y ocho horas luego del TR los animales recibieron una inyección intra-hipocampal bilateral de solución salina (Veh), OXO (3.0 y 10.0 ng/hipocampo) o SCOP (10.0 µg/hipocampo) en ausencia de la sesión de reactivación. Se administraron las dosis efectivas para cada tipo de entrenamiento según los experimentos llevados a cabo en la sección 7.2. Veinticuatro horas luego de la inyección se realizó la sesión de evaluación (T2), Figura 7.2.

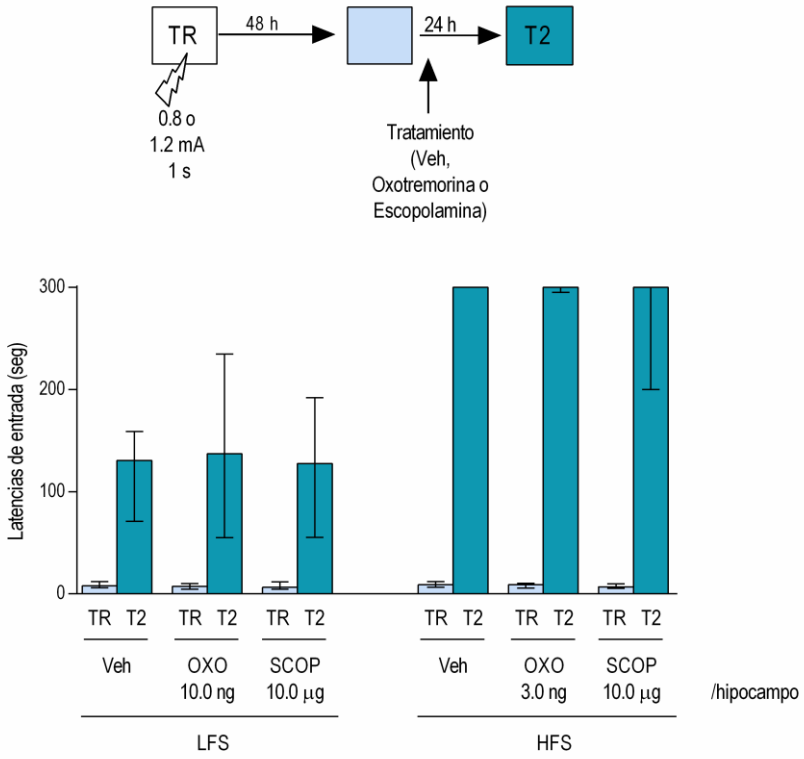

Figura 7.2. La administración tanto de OXO como SCOP modifica la latencia de entrada al compartimento oscuro sólo si la memoria es previamente reactivada. Efectos de la administración intrahipocampal de OXO (10.0 ng/hipocampo), SCOP (10.0 µg/hipocampo) o vehículo (Veh) en el desempeño de los animales 48 h luego de un entrenamiento débil (LFS, panel izquierdo) o fuerte (HFS, panel derecho) en ausencia de la sesión de reactivación. Cada barra representa las medianas con sus respectivos espacios intercuartiles.TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación, HFS: animales entrenados con un estímulo fuerte (1.2 mA), LFS: animales entrenados

con un estímulo débil (0.8 mA), OXO: Oxotremorina, SCOP: escopolamina. El protocolo experimental se encuentra representado en la parte superior de la figura.

Si evaluamos los resultados de los grupos entrenados con un LFS, ni la administración de OXO ni la de SCOP modificaron las latencias de entrada ($H=0.24$, $p=0.89$, Figura 7.2 panel izquierdo). Resultados similares se encontraron al evaluar el desempeño de los animales entrenados con un HFS, donde la inyección de OXO o SCOP sin reactivar la memoria no altera las latencias de entrada con respecto al grupo Veh ($H=4.66$, $p=0.098$, panel derecho).

7.4 LOS EFECTOS DE OXOTREMORINA Y ESCOPOLAMINA EN LOS PROCESOS DE RECONSOLIDACIÓN DE UNA MEMORIA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO SON TIEMPO-ESPECÍFICOS LUEGO DE LA REACTIVACIÓN DE LA MISMA.

A continuación, evaluamos si los efectos de la administración de OXO ó SCOP en los procesos inducidos por la reactivación de la memoria son tiempo-dependientes o no. Seis grupos de animales se entrenaron en una tarea de evitamiento inhibitorio, la mitad con un LFS y los grupos restantes con un HFS. Cuarenta y ocho horas post TR se realizó la sesión de reactivación (T1). Tres horas luego, los animales recibieron una inyección intra-hipocampal bilateral de solución salina (Veh), OXO (3.0-10.0 ng/hipocampo) o SCOP (10.0 µg/hipocampo). Veinticuatro horas post T1 se realizó la sesión de evaluación (T2, Figura 7.3).

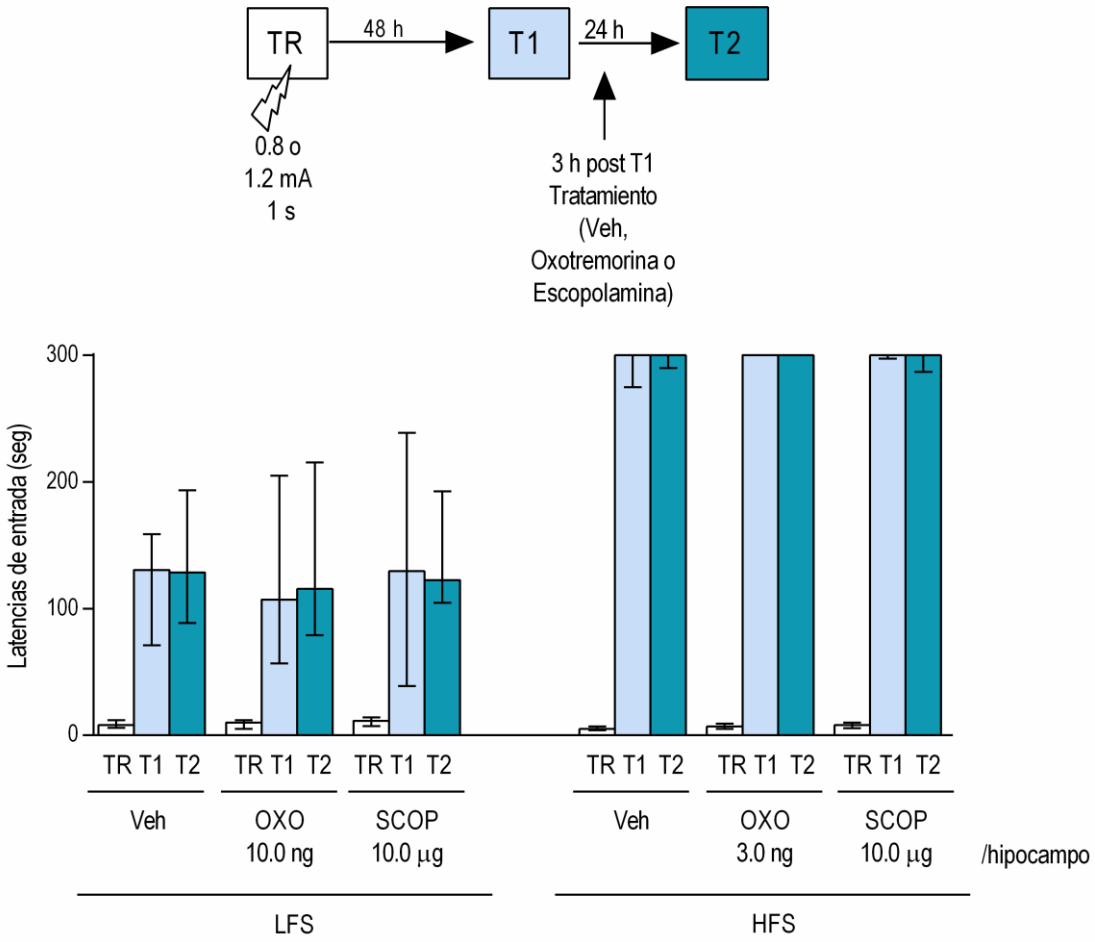

Figura 7.3. Los efectos producidos por la administración de OXO y de SCOP luego de la reactivación de la memoria son tiempo-dependientes. Efectos de la administración intrahipocampal de OXO (10.0 ng/hipocampo), SCOP (10.0 µg/hipocampo) ó vehículo (Veh) en el desempeño de los animales 180 min luego de la sesión de reactivación de animales entrenados con un LFS (panel izquierdo) o HFS (panel derecho). Cada barra representa las medianas con sus respectivos espacios intercuartiles.TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación, HFS: animales entrenados con un estímulo fuerte (1.2mA), LFS: animales entrenados con un estímulo débil (0.8mA), OXO: Oxotremorina, SCOP: escopolamina. El protocolo experimental se encuentra representado en la parte superior de la figura.

Independientemente del tipo de entrenamiento, la administración de OXO o SCOP 3 h luego de la reactivación de la memoria y evaluado a las 24 h, no alteró las latencias de entrada al compartimento oscuro (LFS: H=0.10, p=0.95; HFS: H=1.5, p=0.47). Estos datos sugieren que el efecto de la administración de OXO o SCOP sobre los procesos inducidos por la reactivación de la memoria presenta una ventana temporal acotada.

7.5 INTERACCIÓN FARMACOLÓGICA ENTRE OXOTREMORINA Y ESCOPOLAMINA.

Tomando en cuenta los resultados descriptos a lo largo de este capítulo, se podría sugerir que OXO y SCOP tendrían efectos en los procesos de reconsolidación de la memoria al ser administrados inmediatamente luego de la sesión de reactivación. Con el fin de profundizar en estos estudios, el siguiente paso fue corroborar si los efectos antes descriptos convergen en los RcM.

En ésta sección, utilizamos dos estrategias diferentes: en la primera, administramos una dosis fija de SCOP (10.0 µg/hipocampo) con dosis crecientes de OXO (0.3-30.0 ng/hipocampo); la segunda fue administrar una dosis fija de OXO (LFS: 10.0, HFS: 3.0 ng/hipocampo) con dosis crecientes de SCOP (1.0-30.0 µg/hipocampo).

Entonces, para la primera estrategia 7 grupos (n=10 ratones/grupo) fueron entrenados con un HFS en la tarea de evitamiento inhibitorio (TR). Cuarenta y ocho

horas luego se realizó el ensayo de retención (T1) e inmediatamente luego se administró de manera intra-hipocampal bilateral solución salina (Veh + Veh), SCOP (10.0 µg/hipocampo, grupo "10 + Veh") o un *cocktail* de SCOP y OXO (SCOP: 10.0 µg/hip, OXO: 0.3-30.0 ng/hip).

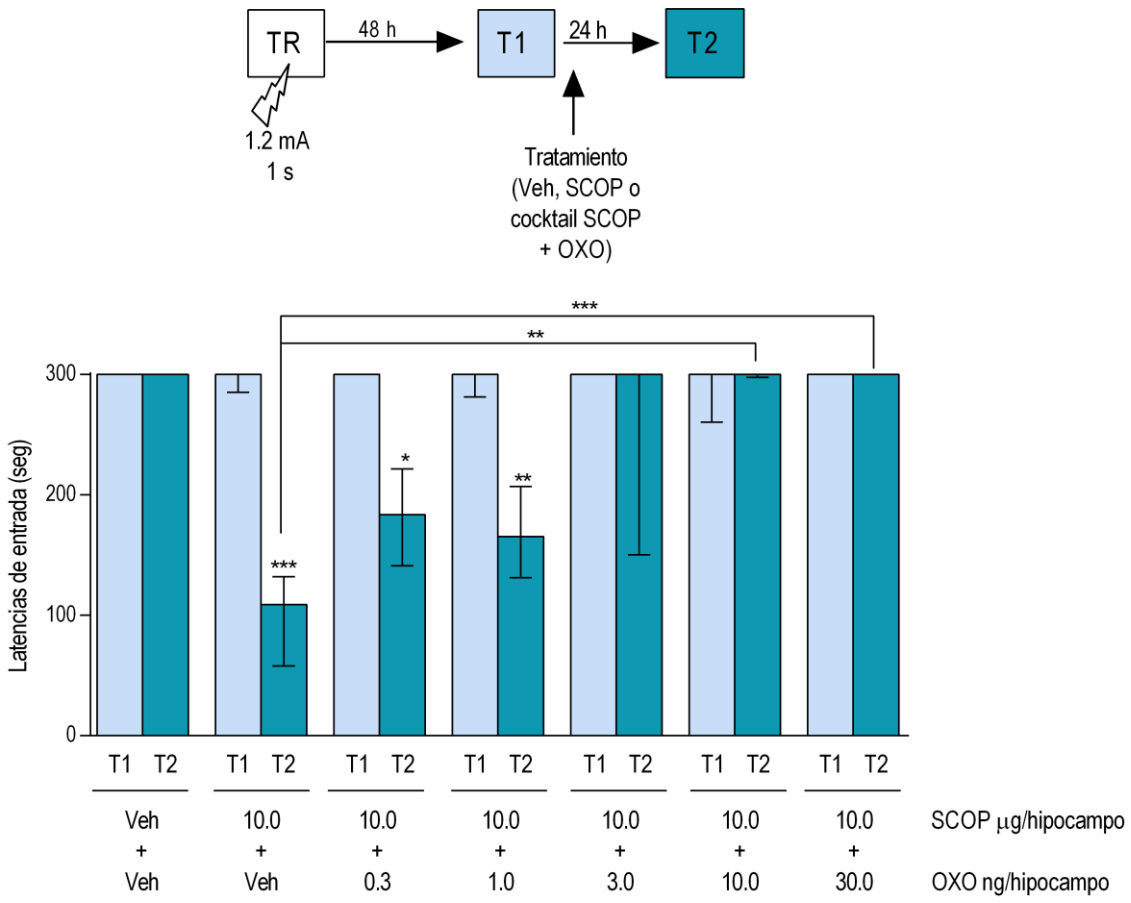

Figura 7.4. La co-administración de dosis crecientes de Oxotremorina revierte el deterioro en el desempeño causado por la administración de Escopolamina. Administración de vehículo (Veh + Veh) o una dosis fija de SCOP (10.0 µg/hipocampo) con dosis crecientes de OXO (0.3-30 ng/hipocampo) inmediatamente luego de la sesión de reactivación (T1). Cada barra representa las medianas con sus respectivos espacios intercuartiles.TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación, HFS: animales entrenados con un estímulo fuerte (1.2 mA),

LFS: animales entrenados con un estímulo débil (0.8mA), OXO: Oxotremorina, SCOP: escopolamina. El protocolo experimental se encuentra representado en la parte superior de la figura. * $p<0.05$, ** $p < 0.01$ ($T2$ vs $T2_{Veh}$; Test de comparaciones múltiples Dunn).

Veinticuatro horas luego, los distintos grupos fueron evaluados (T2, Figura 7.4). Como ya se había visto en la sección 7.2, la inyección de SCOP (10.0 µg/hipocampo; $H=39.24$, $p<0.0001$; $DRS=39.22$, $p=0.001$ $T2_{Veh}$ *vs* $T2_{SCOP10}$) disminuyó las latencias de entrada al comportamiento. Dicho efecto fue revertido de manera dosis-dependiente al administrar en conjunto dosis crecientes de OXO ($DRS= 32.92$, $p=0.01$; $DRS=39.35$, $p=0.001$; $T2_{SCOP+OXO\ 10}$/ $T2_{SCOP+OXO\ 30}$ *vs* $T2_{SCOP+Veh}$, respectivamente). Es decir, al inyectar una mezcla de SCOP (10.0 µg/hipocampo) y OXO (0.3-30 ng/hipocampo) se evidenció un aumento "progresivo" de las latencias de entrada, llegando a valores similares a los observados para el grupo Veh + Veh. Según lo analizado en la Figura 7.1B, la administración de OXO en animales entrenados con un HFS inducía un deterioro en el desempeño. Dicho efecto no fue observado en este experimento, pudiendo deberse a la interacción farmacológica de la OXO y la SCOP a nivel del receptor colinérgico muscarínico.

Del mismo modo, se realizaron dos experimentos de 6 y 5 grupos (n= 10 ratones/grupo) respectivamente. En el primer experimento los animales fueron entrenados en la tarea de evitamiento inhibitorio con un HFS mientras que en segundo se utilizó un LFS. En ambos casos, los animales recibieron una dosis de solución salina (Veh + Veh), OXO (LFS: 10.0 ng/hipocampo, grupo "10.0 + Veh"; HFS: 3.0 ng/hipocampo, grupo "3.0 + veh") o un cocktail de OXO y SCOP (LFS: OXO: 10.0 ng/hip, SCOP: 1.0-30.0 µg/hip; HFS: OXO: 3.0 ng/hip, SCOP: 3.0-30.0 µg/hip)

inmediatamente luego de la reactivación de la memoria (T1). Veinticuatro horas luego se realizó la sesión de evaluación (T2, Figura 7.5).

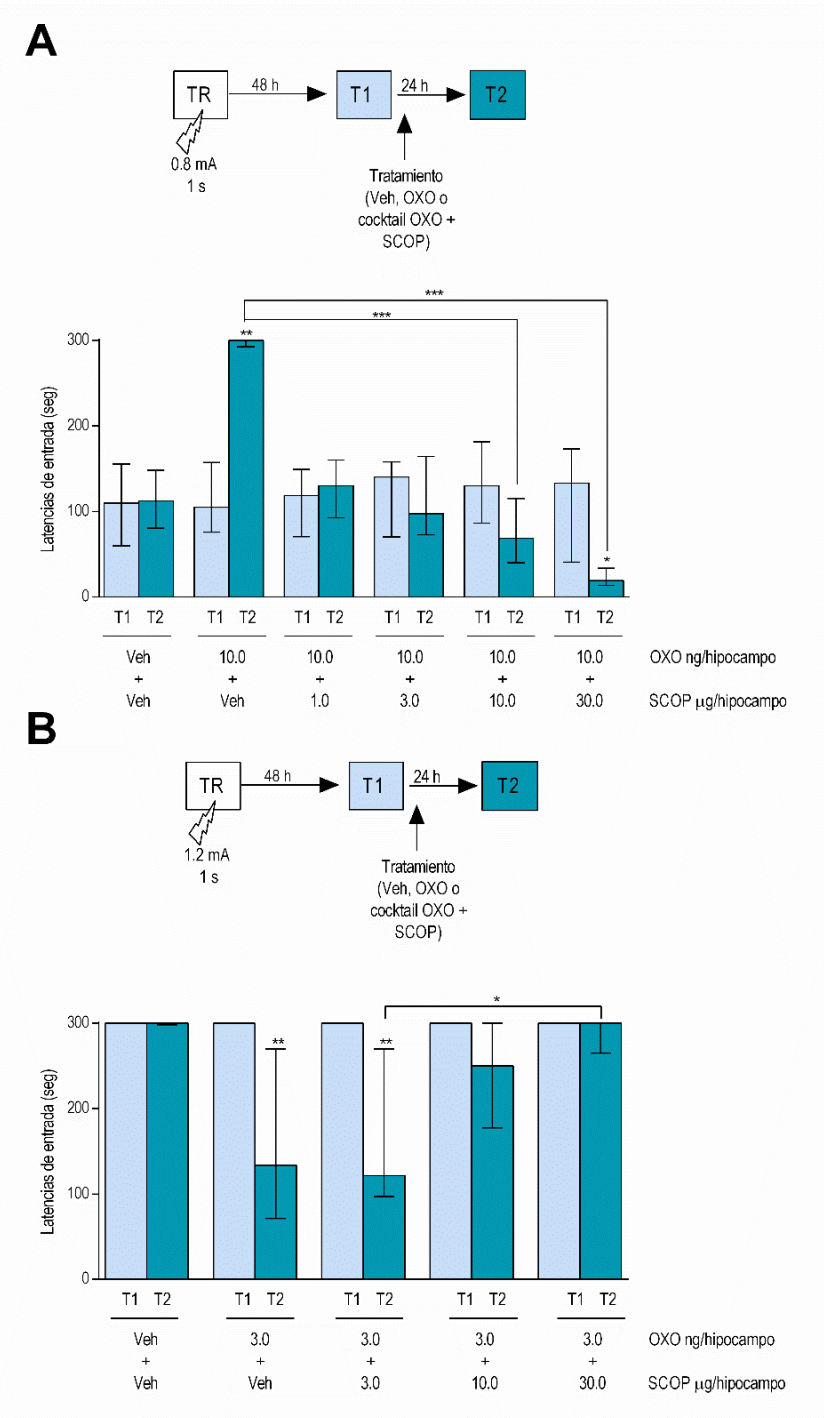

Figura 7.5. La co-administración de dosis crecientes de Escopolamina revierte el deterioro en el desempeño causado por la administración de Oxotremorina. Administración de vehículo (Veh +

Veh) o una dosis fija de OXO (10.0 ng/hipocampo) con dosis crecientes de SCOP (1.0-30 µg/hipocampo) inmediatamente luego de la sesión de reactivación (T1) en animales entrenados con un LFS **(A)** o HFS **(B)**. Cada barra representa las medianas con sus respectivos espacios intercuartiles. TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación, HFS: animales entrenados con un estímulo fuerte (1.2 mA), LFS: animales entrenados con un estímulo débil (0.8 mA), OXO: Oxotremorina, SCOP: escopolamina. El protocolo experimental se encuentra representado en la parte superior de la figura. * $p<0.05$, ** $p < 0.01$ (T2 vs T2 Veh; Test de comparaciones múltiples Dunn).

La administración de OXO inmediatamente luego de la reactivación de una memoria débil (Figura 7.5 A) aumentó significativamente las latencias de entrada al comparar los datos con los del grupo Veh ($H=40.9$, $p<0.0001$; $DRS=-22.15$, $p=0.01$). No obstante, la administración de dosis crecientes de SCOP en conjunto con OXO (10.0 ng/hipocampo) previno el efecto del agonista no selectivo, llevando a valores estadísticamente significativos para las dosis de SCOP de 10.0 y 30.0 µg/hip ($DRS=31.24$, $p=0.001$; $DRS=44.55$, $p=0.001$ $T2_{OXO+SCOP\ 10}$ / $T2_{OXO+SCOP\ 30}$ *vs* $T2_{OXO}$). La dosis de 10.0 ng/hip OXO + 30.0 µg/hip SCOP disminuyó significativamente las latencias de entrada con respecto al grupo control ($DRS=22.4$, $p=0.05$). Al analizar los datos de los grupos entrenados con un HFS, la administración de OXO post T1 disminuyó significativamente las latencias de entrada con respecto al grupo Veh ($H=17.78$, $p=0.001$; $DRS=19.56$, $p=0.01$ $T2_{OXO}$ *vs* $T2_{Veh}$, Figura 7.5 B). Aquí, la administración conjunta de OXO con dosis crecientes de SCOP fueron capaces de prevenir el efecto del agonista, alcanzando valores de latencias de entrada similares a las del grupo Veh, y significativamente distintas a las del grupo OXO para la dosis de 30.0 µg/hipocampo de SCOP ($DRS=16.67$, $p=0.05$ $T2_{OXO+SCOP\ 30}$ *vs* $T2_{OXO}$). Los efectos de la administración conjunta de las drogas no pueden explicarse

simplemente por la convergencia de sendos efectos sobre un mismo sistema de RcM, ya que la administración de SCOP *per se* induce un deterioro en los niveles de retención en animales entrenados con un HFS (Figura 7.1 D).

7.6 LOS SUBTIPOS DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS M1 Y M2 ESTARÍAN INVOLUCRADOS EN LOS PROCESOS DESENCADENADOS POR LA REACTIVACIÓN DE UNA MEMORIA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO.

Los resultados de la sección anterior sugieren que tanto la OXO como la SCOP tendrían efecto sobre los procesos de reconsolidación de la memoria, sugiriendo un rol en dichos procesos de los RcM. Sin embargo, no revelan qué subtipo de receptor muscarínico podría estar involucrado en estos procesos. Como ya se mencionó en la introducción de este capítulo, existen 5 subtipos de RcM de los cuales sólo los subtipos M1, M2 y M3 se encuentran expresados en el hipocampo.

Con el fin de evaluar cuál de estos subtipos de receptores estaría involucrado en la reconsolidación de la memoria, estudiamos los efectos de tres tipos de antagonistas de RcM: la pirenzepina (antagonista M1), el AF-DX116 (antagonista M2) y la solifenacina (antagonista M3), en las dos condiciones de entrenamiento que venimos empleando (Uchida and Yoshida, 1990).

En un primer paso, 8 grupos (n=10 ratones/grupo) fueron entrenados en la tarea de evitamiento inhibitorio, la mitad recibieron un LFS y la otra mitad un HFS. Cuarenta y ocho horas post TR se realizó el primer ensayo de retención (T1) e inmediatamente luego los animales recibieron una inyección intra-hipocampal bilateral de solución salina (Veh) o pirenzepina (1.0-10.0 µg/hipocampo, Piren). Veinticuatro horas luego se

realizó el ensayo de evaluación (T2).

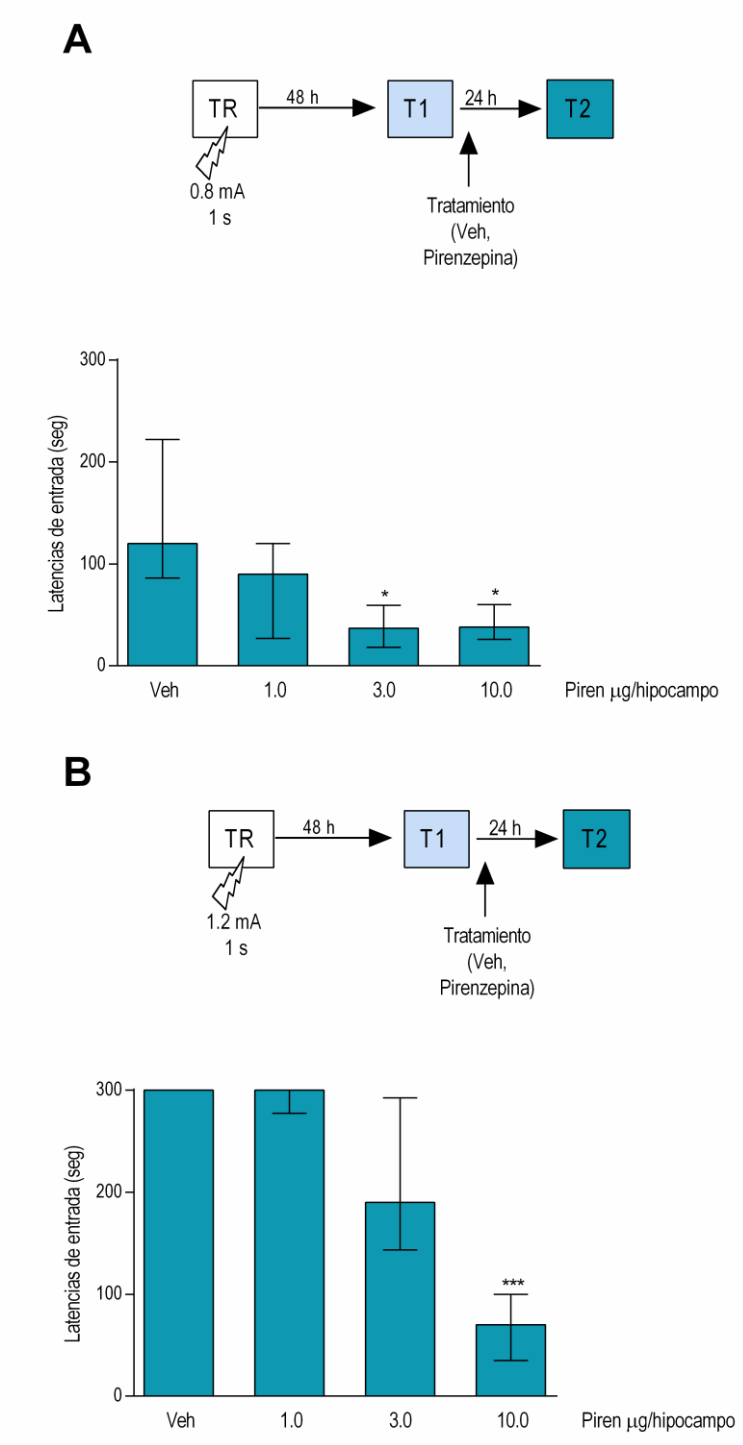

Figura 7.6. La administración de un antagonista selectivo RcM M1 luego de la reactivación de la memoria, deteriora el desempeño de los animales de manera dosis-dependiente. Efectos de la

administración intrahipocampal de vehículo (Veh) o Pirenzepina (Piren, 1.0, 3.0, y 10.0 µg/hipocampo) inmediatamente post reactivación de la memoria (T1) en el desempeño de animales entrenados con un LFS **(A)** y HFS **(B)**. Cada barra representa las medianas con sus respectivos espacios intercuartiles (n=10 ratones/grupo).TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación, Piren: pirenzepina. El protocolo experimental para cada caso se encuentra representado en la parte superior de la figura. * $p<0.05$, *** $p < 0.001$ (T2 vs T2 Veh; Dunn´s test).

La administración de dosis crecientes del antagonista específico de RcM M1, la pirenzepina (Figura 7.6), disminuyó significativamente las latencias de entrada al compartimento oscuro de manera dosis-dependiente para los grupos entrenados con un LFS (H=9.75, p=0.02; DRS=14.48, p= 0.01 y DRS=13.15, p=0.05 $T2_{Piren3.0}$ / $T2_{Piren10}$ *vs* $T2_{Veh}$, respectivamente, Figura 7.6 A). Con respecto a los grupos entrenados con un HFS, se evidenció una disminución significativa de las latencias de retención producto de la administración de una dosis de 10.0 µg/hipocampo de Pirenzepina (H=23.51, $p<0.0001$; DRS=19.56, p=0.001 $T2_{Piren10}$ *vs* $T2_{Veh}$, Figura 7.6 B).

Se realizó el mismo experimento, pero utilizando AF-DX116 como antagonista. Los distintos grupos recibieron una inyección intra-hipocampal de vehículo (Veh) o distintas dosis de AF-DX116 (1.0-7.0 µg/hipocampo, AF-DX), Figura 7.7. Similar a lo observado para la pirenzepina, la inyección del antagonista específico del RcM M2, el AF-DX116, produjo un cambio en el desempeño de los animales que recibieron un LFS durante el entrenamiento, (H=9.12, p=0.028, Figura 7.7 A). Sin embargo, a diferencia de lo discutido para la pirenzepina, la administración de AF-DX116 facilitó la retención de la memoria, obteniendo una respuesta máxima en la dosis de 3.5 µg/hipocampo (DRS=-13.63, p=0.05 $T2_{AF\text{-}DX\ 3.5}$ *vs* $T2_{Veh}$). La administración de este

antagonista de RcM M2 en animales entrenados con un HFS disminuyó las latencias de entrada de manera dosis-dependiente (Figura 7.7 B), siendo las dosis de 3.5 y 7.0 µg/hipocampo, significativamente diferentes al grupo Veh (H=25.71, p<0.0001; DRS=16.25, p =0.01$T2_{AF\text{-}DX\ 3.5}$ *vs* $T2_{Veh}$; DRS=17.25, p=0.001 $T2_{AF\text{-}DX\ 7.0}$ *vs* $T2_{Veh}$).

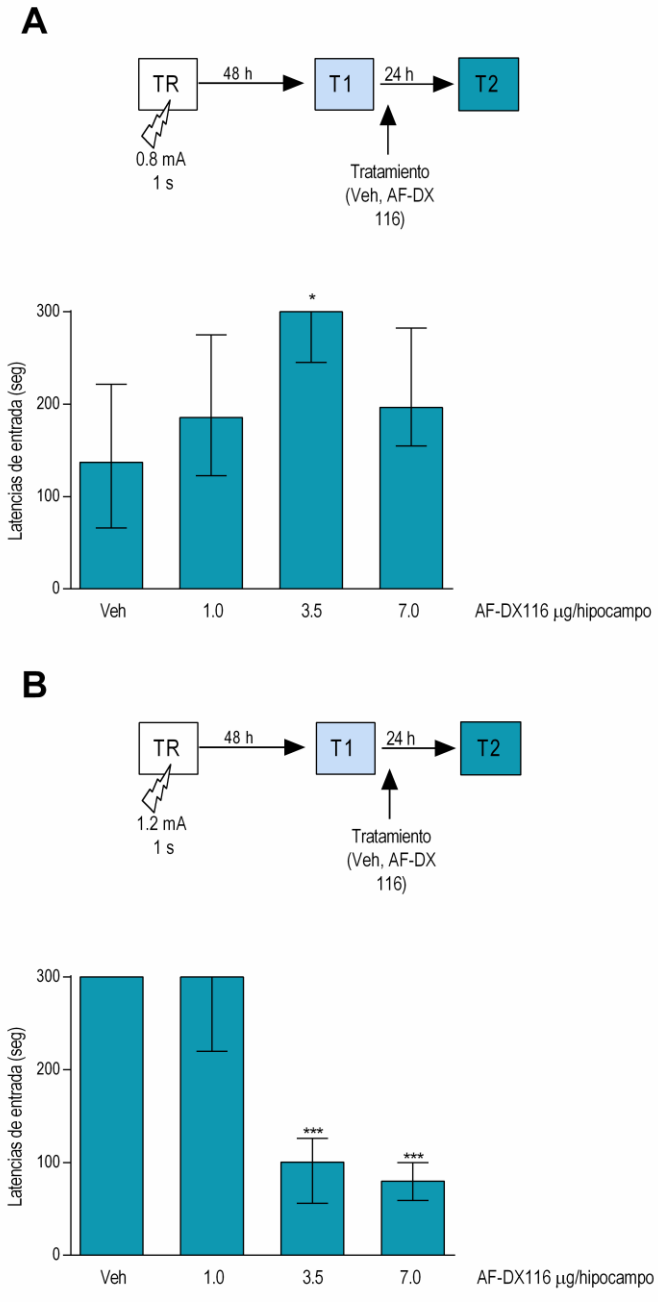

Figura 7.7. La administración de un antagonista selectivo RcM M2 luego de la reactivación de la

memoria, facilita o deteriora el desempeño de los animales dependiendo del tipo de entrenamiento empleado. Efectos de la administración intrahipocampal de vehículo (Veh) o AF-DX116 (1.0, 3.5, y 7.5 µg/hipocampo) inmediatamente post reactivación de la memoria (T1) en el desempeño de animales entrenados con un LFS **(A)** y HFS **(B)**. Cada barra representa las medianas con sus respectivos espacios intercuartiles (n=10 ratones/grupo). TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación, Piren: pirenzepina. El protocolo experimental para cada caso se encuentra representado en la parte superior de la figura. * $p<0.05$, *** $p < 0.001$ (T2 vs $T2_{Veh}$; Dunn´s test).

Como ya se discutió en secciones anteriores, el siguiente paso fue evaluar si los efectos de la Piren y el AF-DX son específicos de la reactivación de la memoria y suceden dentro de una ventana temporal determinada.

En una primera etapa, 6 grupos de animales fueron entrenados en la tarea de evitamiento inhibitorio, la mitad con un LFS y el resto con un HFS. Cuarenta y ocho horas luego los animales recibieron una inyección de solución salina (Veh), Piren (10.0 µg/hipocampo) o AF-DX (3.5 µg/hipocampo) en ausencia de la reactivación de la memoria. Veinticuatro horas luego se realizó la sesión de evaluación (T2, Figura 7.8 A). La administración de Pirenzepina o AF-DX116 en ausencia de la sesión de reactivación, no produjo cambios en el desempeño de los animales con respecto al grupo Veh sin importar el tipo de entrenamiento empleado (LFS: $H=0.045$, $p=0.98$; HFS: $H=1.58$, $p=0.45$).

Luego se realizó el mismo protocolo descripto para el experimento anterior, solo que 48 h post TR se realizó el ensayo de retención (T1), administrando solución salina (Veh), Piren (10.0 µg/hipocampo) o AF-DX (3.5 µg/hipocampo) 3 hs luego. Un día después, todos los grupos fueron sometidos a la sesión de evaluación (T2, Figura 7.8 B), no encontrando diferencias significativas con respecto al Veh (LFS: $H=0.35$,

p=0.84; HFS: H=0.64, p=0.89). En su conjunto, estos resultados sugieren que los efectos de la pirenzepina y el AF-DX116 serían dosis - dependientes; inducidos específicamente por la reactivación de la memoria y acotados a una ventana temporal definida de hasta al menos 3 h.

Por último, se entrenaron 4 grupos (n=10 ratones/grupo) en la tarea de evitamiento inhibitorio con un HFS. Cuarenta y ocho horas después se realizó la sesión T1 e inmediatamente luego se administró solución salina (Veh) o Solifenacina (Antagonista del RcM M3) (1.5-15.0 µg/hipocampo) intra-hipocampal bilateral. La sesión de evaluación se realizó 24 h post T1 (T2). La Figura 7.9 muestra que la inyección de solifenacina inmediatamente post-T1 no produce cambios en las latencias de entrada al compartimento oscuro, independientemente de la dosis de droga empleada (H=3.64, p=0.3). Los resultados de este experimento sugieren que los RcM M3 no estarían, en principio, involucrados en los procesos que se desencadenan luego de la reactivación de una memoria de evitamiento inhibitorio.

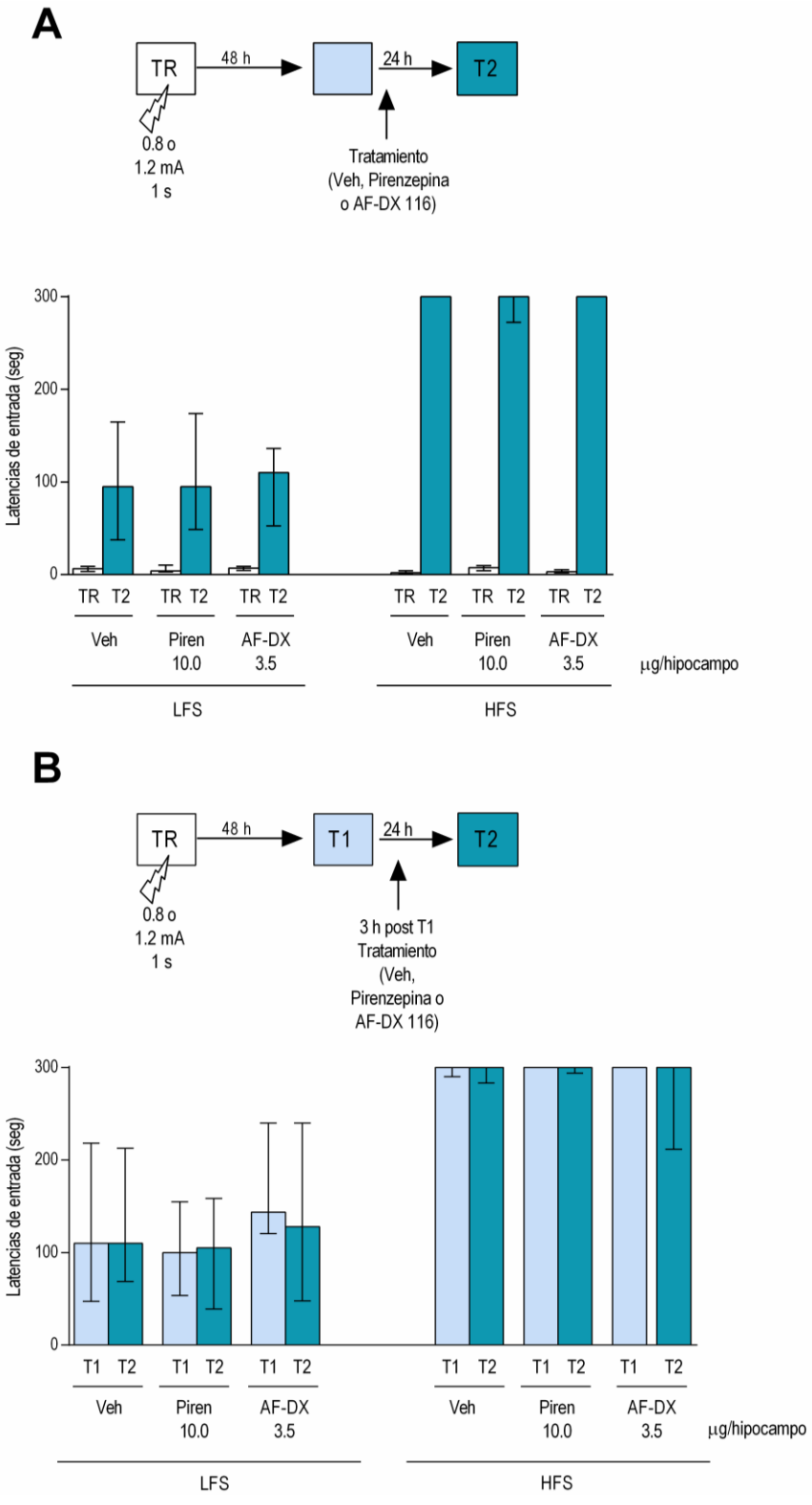

Figura 7.8. Los efectos de pirenzepina y AF-DX116 son observables solo si la memoria es previamente reactivada o se administra dentro de la ventana de reconsolidación. Efectos de la

administración intrahipocampal de vehículo (Veh), pirenzepina (Piren,10.0 µg/hipocampo) ó AF-DX116 (AF-DX, 3.5 µg/hipocampo) en el desempeño de los animales 48 h luego de un entrenamiento débil (LFS, panel izquierdo) o fuerte (HFS, panel derecho) en ausencia de la sesión de reactivación **(A)** ó 180 min luego de la misma **(B)**. Cada barra representa las medianas con sus respectivos espacios intercuartiles (n=8 ratones/grupo).TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación, HFS: animales entrenados con un estímulo fuerte (1.2 mA), LFS: animales entrenados con un estímulo débil (0.8mA), Piren: pirenzepina, AF-DX: AF-DX116. El protocolo experimental para cada caso se encuentra representado en la parte superior de la figura.

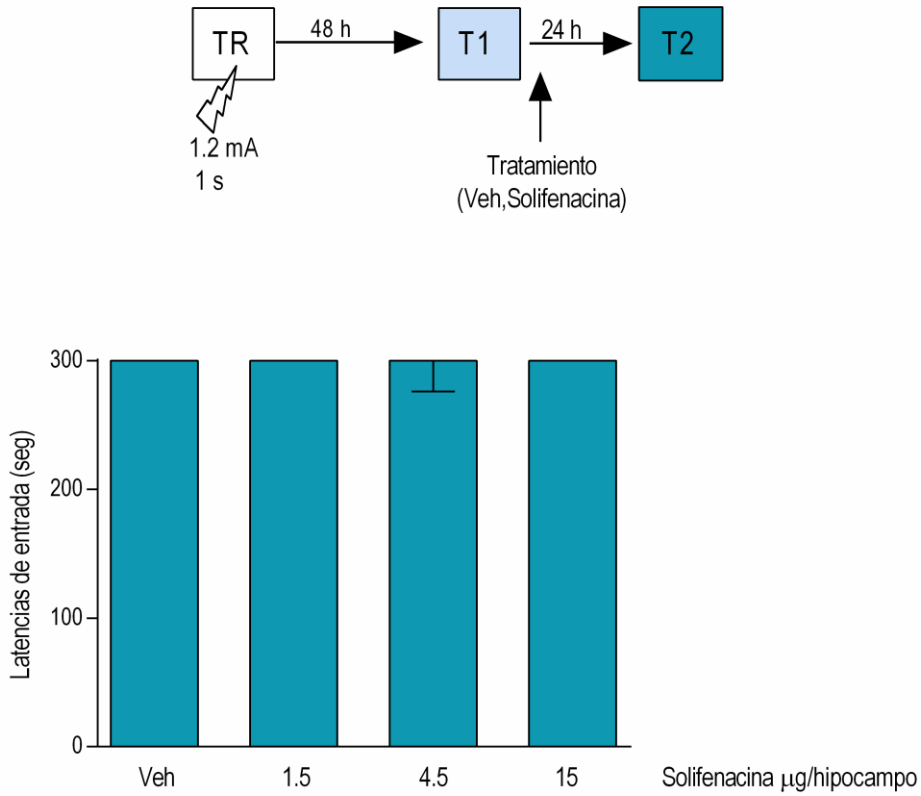

Figura 7.9. La administración de un antagonista selectivo RcM M3 luego de la reactivación de la memoria, no genera cambios en el desempeño de los animales. Efectos de la administración intrahipocampal de vehículo (Veh) o Solifenacina (1.0, 4.5, y 15 µg/hipocampo) post T1 en animales entrenados con un HFS. Cada barra representa las medianas con sus respectivos espacios intercuartiles (n=10 ratones/grupo).TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2: sesión de evaluación. El protocolo experimental se encuentra representado en la parte superior de la figura.

7.7 LOS EFECTOS DE PIRENZEPINA Y AF-DX116 PERDURAN AL MENOS POR 21 DÍAS

Por último, quisimos corroborar que los efectos de la administración de Piren y AF-DX inmediatamente pos T1 en animales entrenados con un HFS y evaluados 24 h luego se debieran a una inhibición del proceso de renconsolidación de la memoria y no a una facilitación de la consolidación de una nueva memoria (memoria de extinción). Para ello, 3 grupos (n=9 ratones/grupo) fueron entrenados con un HFS en la TEI. A las 24 h se realizó el ensayo de reactivación (T1) e inmediatamente luego los animales recibieron una inyección intra-hipocampal de vehículo (Veh), Piren (10.0 µg/hipocampo) o AF-DX (3.5 µg/hipocampo). A las 24 h (T2) y 21 d (T3) post T1 se realizaron las sesiones de evaluación (Figura 7.10).

Tal y como se observó en las Figuras 7.6 B y 7.7 B, la administración de Piren y AF-DX produjo un deterioro en el desempeño de los animales 24 h luego de la inyección de una u otra droga ($H=19.02$, $p<0.0001$). El deterioro también fue observado 21 d post T1 ($H=18.56$, $p<0.001$). Dichos resultados sugieren que, al menos hasta los 21 d no habría recuperación espontánea y que el efecto de Piren y AF-DX estaría siendo ejercido a través de la modulación de los procesos de reconsolidación de la memoria.

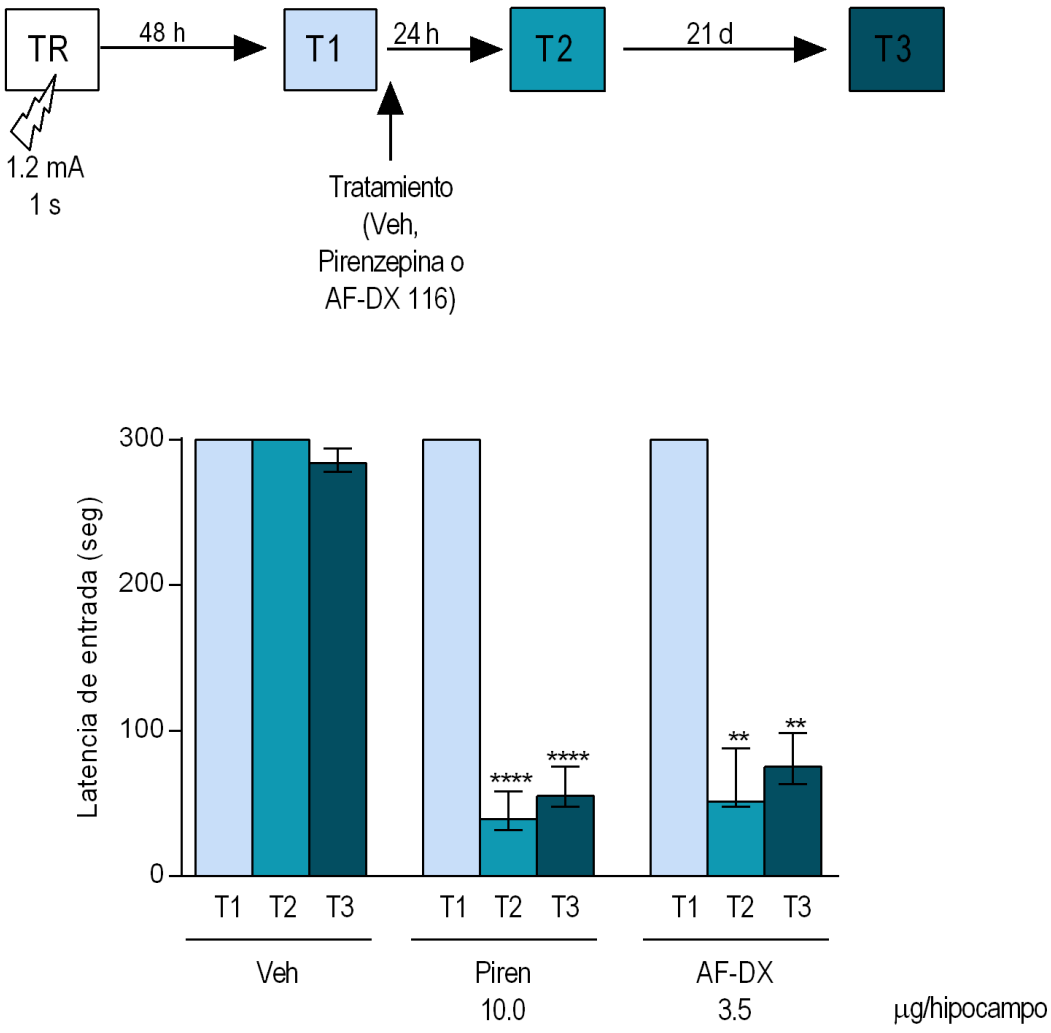

Figura 7.10. Los efectos de Pirenzepina y AF-DX116 sobre el desempeño de los animales perdurarían al menos 21 días post reactivación de la memoria. Efectos de la administración intrahipocampal de vehículo (Veh), pirenzepina (Piren, 10.0 µg/hipocampo) ó AF-DX116 (AF-DX, 3.5 µg/hipocampo) en el desempeño de los animales 48 h luego de un HFS y evaluado 24 h y 21 d post T1. Cada barra representa las medianas con sus respectivos espacios intercuartiles (n=8 ratones/grupo).TR: sesión de entrenamiento, T1: sesión de reactivación, T2-T3: sesión de evaluación, Piren: pirenzepina, AF-DX: AF-DX116. El protocolo experimental para cada caso se encuentra representado en la parte superior de la figura. **** $p<0.0001$, ** $p<0.01$ T2 *vs* T2 Veh y T3 *vs* T3 Veh, Test de Dunn.

7.8 DISCUSIÓN

Actualmente, no se discute la participación de la ACh en distintas etapas de los procesos mnésicos, como puede ser la consolidación, la reactivación, la extinción y la reconsolidación de la memoria (Boccia et al., 2003, 2004, 2009; Decker and McGaugh, 1991; Fibiger, 1991; Gallagher and Colombo, 1995).

En este sentido, la administración de drogas colinérgicas en el estriado antes o después de un entrenamiento en la tarea de evitamiento inhibitorio en ratas modificó el desempeño de los animales con respecto al control, evidenciando un efecto del sistema colinérgico muscarínico en ésta tarea comportamental (Packard et al., 1996; Prado-Alcala et al., 1980; Quirarte et al., 1994). Asimismo, varios laboratorios han demostrado un efecto de la modulación del sistema colinérgico muscarínico en el desempeño de los sujetos experimentales, al administrar distintas drogas en el hipocampo dorsal luego del TR en una TEI. Así, la administración de OXO produjo una mejora del desempeño de los sujetos experimentales (Izquierdo et al., 1992; Jerusalinsky et al., 1993, 1995; Rosat et al., 1992); mientras que la administración de SCOP bloqueó la mejora en el desempeño causada por la previa administración de un agonista del RcM M1 (Jerusalinsky et al., 1993, 1995) [revisado en (Power et al., 2000)].

Sin embargo, no se ha estudiado a la fecha, qué subtipos de receptores colinérgicos RcN y RcM podrían estar implicados en los procesos de reconsolidación de la memoria. En este sentido, y como parte de mi tesina de licenciatura, hemos caracterizado los efectos modulatorios de la memoria de agonistas y antagonistas no

selectivos de RcN así como específicos de los RcN α7 en procesos desencadenados a partir de la reactivación de la memoria (Boccia et al., 2010). En este capítulo nos centramos en el estudio de los subtipos de RcM y su participación en los procesos inducidos por la reactivación/labilización de la memoria de evitamiento inhibitorio en ratón, los procesos de reconsolidación.

Se evaluó, en primera instancia, la administración de un agonista (OXO) y un antagonista (SCOP) no selectivo de los RcM inmediatamente luego de la reactivación de la memoria, observando variaciones significativas en el desempeño de los animales dependiendo de la dosis y el tipo de estímulo empleado en el entrenamiento. Similar a lo descripto para los RcN, mientras que la administración del agonista aumentó o disminuyó significativamente las latencias de entrada dependiendo del estímulo empleado durante el TR (LFS y HFS, respectivamente); la administración del antagonista disminuyó significativamente las latencias de entrada, independientemente del estímulo empleado. Estos resultados sugieren que la OXO podría estar facilitando o deteriorando el proceso de reconsolidación de la memoria dependiendo del tipo de entrenamiento. Resultados similares fueron presentados años atrás por Gold y Van Buskirk en 1975, administrando epinefrina luego de la sesión de entrenamiento en grupos entrenados con un estímulo aversivo de variada intensidad (Gold and Van Buskirk, 1975).

Si uno quisiera argumentar que una determinada droga genera un cambio en la reconsolidación de las memorias, existen ciertos criterios que deben cumplirse (Alberini et al., 2006): primero, la administración de la droga no debería inducir cambios inespecíficos en el desempeño, sino que los mismo sólo deberían

observarse previa reactivación de la memoria (Nader et al., 2000a); en segundo lugar, es necesario demostrar la existencia de una ventana temporal de susceptibilidad a la droga post reactivación de la memoria. Pasada dicha ventana temporal, la administración de la droga no debería generar cambios en el desempeño de los animales con respecto al grupo control. Ambos criterios se cumplen para todas las drogas empleadas a lo largo de este capítulo (Figuras 7.2, 7.3 y 7.8). Estos mismos controles se realizaron en el capítulo 5 con el fin de evaluar los efectos de PD098059 sobre los procesos de reconsolidación de la memoria.

Como se describiera, la SCOP generó un deterioro en el desempeño de los animales al ser administrada inmediatamente luego de la sesión de reactivación, para ambos tipos de estímulo. Más aún, sus efectos variaron según la dosis de droga administrada. La co-administración de dosis creciente de OXO con la dosis que produce la respuesta máxima de SCOP revirtió el deterioro causado por la sola administración del antagonista (Figura 7.4). Sus efectos fueron revertidos de manera dosis-dependiente por la OXO. De manera similar, la co-administración de dosis crecientes de SCOP fue capaz de prevenir el efecto inducido por dosis de OXO que *per se* produce la máxima respuesta comportamental. Estos resultados estarían sugiriendo una posible interacción de ambas drogas a nivel del RcM, así como destacan un rol crítico de dichos receptores en los procesos de reconsolidación de la memoria de evitamiento inhibitorio en ratón. Efectos similares fueron observados al estudiar la participación de los RcN α7 en los procesos de reconsolidación de la memoria (Boccia et al., 2010). En este trabajo, la co-administración de MLA con dosis

crecientes de Ch en animales entrenados con un HFS, revirtió el efecto de la sola administración de MLA.

Una vez demostrada la participación de los RcM en los procesos de reconsolidación de la memoria, ahondamos en el estudio de estos receptores buscando los subtipos de RCM que podrían estar actuando específicamente en estos procesos a nivel del hipocampo. Los RcM están formados por 5 subtipos de receptores (M1-M5) capaces de activar o inhibir a la actividad neuronal dependiendo de la estructura del receptor y de la locación del mismo en la sinapsis (Bonner et al., 1987; Kubo et al., 1986). Los RcM M1, M3 y M5 se localizan a nivel de la post-sinapsis y, frente a la llegada de la ACh, promueven la transmisión neuronal. Los RcM M2 y M4, en cambio, se localizan tanto en la pre- como en la post-sinapsis actuando como autorreceptores, capaces de restringir la actividad sináptica al frenar la liberación o síntesis del neurotransmisor (Zhang et al., 2002). Al ser activados, los RcM M2 y M4 reducen o inhiben la actividad mediada por la ACh (Eglen, 2005, 2006).

Se estudió el efecto de la administración de tres tipos de antagonistas de RcM específicos de los subtipos RcM M1, M2 y M3 (la Pirenzepina, el AF-DX116 y la Solifenacina respectivamente) en ambos tipos de aprendizaje. Sólo la pirenzepina y el AF-DX116 tuvieron efectos significativos sobre el desempeño de los animales.

La administración de pirenzepina inmediatamente luego de la sesión de reactivación, en animales entrenados con un HFS o LFS, disminuyó significativamente las latencias de entrada al compartimento oscuro de manera dosis-dependiente. Dichos efectos eran específicos de la reactivación de la memoria y enmarcados

dentro de una ventana temporal de acción post T1. Estos resultados, en su conjunto, apuntan a la participación de los RcM M1 en los procesos de reconsolidación de la memoria. Por su parte, la administración de AF-DX116, antagonista de RcM M2, alteró las latencias de entrada al compartimento de manera diferente, dependiendo del tipo de entrenamiento empleado. Es decir, la administración de AF-DX116 inmediatamente post T1 en animales entrenados con un LFS mejoró significativamente el desempeño de los animales; mientras que en animales entrenados con un HFS produjo un deterioro en el desempeño. Estos resultados fueron similares a los descriptos en la administración de OXO, agonista de la vía muscarínica, concordando con la ubicación y función de los RcM M2. Brevemente, se dijo que los RcM M2 se encuentran en la pre-sinapsis y median la actividad sináptica de la neurona. Al inhibir a dicho receptor, por la administración de AF-DX116, su inactividad estaría favoreciendo la liberación del neurotransmisor y, por consiguiente, la transmisión sináptica. Entonces, AF-DX116 estaría actuando como un “agonista de la vía colinérgica” mediante la inhibición del autorreceptor M2.

Al realizar la curva dosis-respuesta para AF-DX116 en animales entrenados con un LFS, se observó una forma de U invertida. Este tipo de curva se observa típicamente en tratamientos donde la droga se administra inmediatamente luego de la sesión de aprendizaje (McGaugh and Roozendaal, 2009) donde sería el resultado de los cambios neuromodulatorios, ejercidos por la administración de las drogas (McGaugh, 2000; McGaugh and Roozendaal, 2009). Estos efectos modulatorios podrían ocurrir durante la reconsolidación de memorias explicando, en parte, lo observado al administrar AF-DX116 inmediatamente luego de la

reactivación/labilización de la memoria. Efectos similares fueron previamente presentados por otros grupos de investigación (Gordon, 1977; Horne et al., 1997; Rodriguez et al., 1999). Estos resultados podrían sugerir que los tratamientos realizados post reactivación de la memoria tendrían un gran valor como moduladores de los procesos de memoria que ocurren luego de la reactivación/ labilización de las mismas, siendo similares, pero no idénticos a los ocurridos luego de un aprendizaje.

DISCUSIÓN GENERAL

8.1 RECAPITULACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL PRESENTE TRABAJO

Con el objetivo general de estudiar los mecanismos que subyacen a los procesos inducidos/gatillados por la reactivación de la memoria, se estudió la participación de la vía colinérgica hipocampal (específicamente, los RcM) y la cascada de señalización intracelular ERK 1/2, utilizando la TEI en ratón.

En primer lugar, estudiamos la cinética de activación de ERK 1/2 a distintos tiempos luego de la reactivación de la memoria (15, 45 y 180 min) para ambos tipos de entrenamiento. Los resultados se resumen en la Figura 8.1 A. Se evidenció una activación diferencial de ERK2 hipocampal en extractos citosólicos, dependiente del tipo de entrenamiento empleado. Así en animales entrenados con un LFS hubo un aumento de la activación de ERK2 a los 3 tiempos estudiados; mientras que aquellos entrenados con un HFS mostraron un aumento de la activación de ERK2 a los 15 y 180 min, pero una disminución de dichos valores a los 45 min. En tanto que la activación de ERK 1/2 a los 15 min post-reactivación sería necesaria para la re-estabilización de la memoria (independientemente del tipo de entrenamiento); el estado de activación a los 45 min sería un punto crítico en la determinación de la fuerza de la memoria inferida a partir de los cambios en el desempeño observados 24 h luego (Figura 8.1 B). Finalmente, la activación de ERK 1/2 a las 3 h, si bien no reviste importancia para la retención evaluada a las 24 h, estaría implicada en los procesos de persistencia de la memoria evaluada a los 7 días.

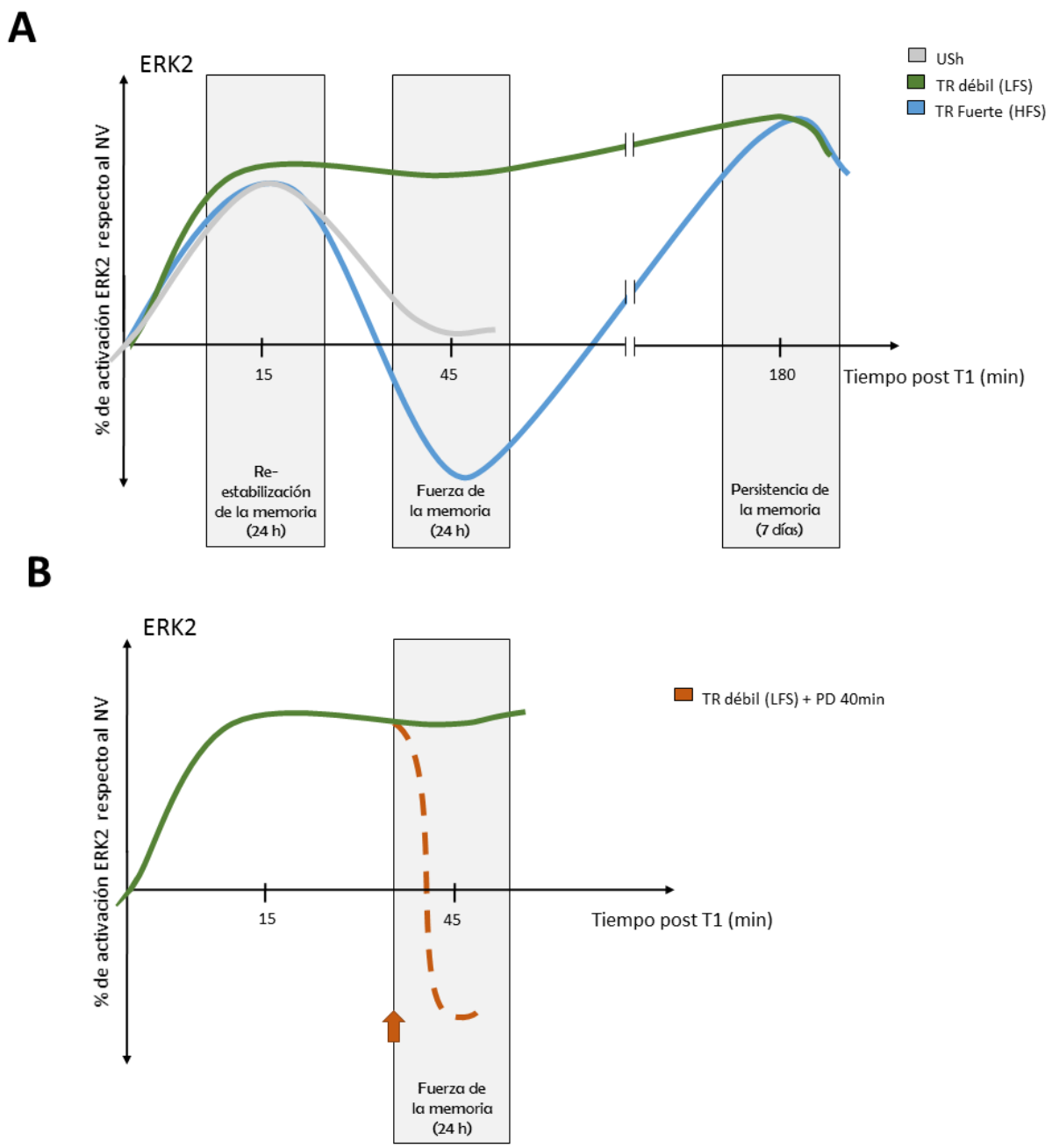

Figura 8.1. Esquema representativo del porcentaje de activación de ERK2 hipocampal respecto del grupo NV, en el hipocampo de ratón. (A) Cada línea representa la activación de ERK2 a distintos tiempos luego de la reactivación de la memoria (15, 45 y 180 min) para cada grupo estudiado (USh, $Sh_{débil}$, Sh_{fuerte}). **(B)** Niveles de activación de ERK2 en animales inyectados con PD, 40 min post reactivación de la memoria.

El siguiente paso fue evaluar la interacción entre el sistema colinérgico y la vía de activación de ERK 1/2 en los procesos de reconsolidación de la memoria (Figura 8.2). La administración tanto del agonista como del antagonista de RcN α7 modificó los niveles de activación de ERK2 respecto del control (grupo Veh), sugiriendo una modulación de la vía ERK 1/2 ejercida por el Sistema Colinérgico a través de estos receptores en el hipocampo. Estos cambios se observaron para los dos tipos de entrenamiento.

Por último, se continuó con la caracterización de los receptores colinérgicos involucrados en los procesos de reconsolidación de la memoria, específicamente a través del estudio de los distintos subtipos de los RcM. La administración de OXO y SCOP alteraron significativamente el comportamiento de los animales observado 24 h luego de la administración. La co-administración de la dosis efectiva de SCOP junto con dosis crecientes de OXO (y viceversa) revirtió el efecto de la primera, sugiriendo una posible interacción entre estas drogas a nivel del receptor. La administración de Pirenzepina y AF-DX116, antagonistas de los subtipos de RcM M1 y M2 respectivamente, modificaron significativamente el desempeño de los animales. Estos resultados nos permitieron concluir que existe una participación específica de los RcM M1 y M2, no así M3, sobre los procesos de reconsolidación de la memoria en ratón.

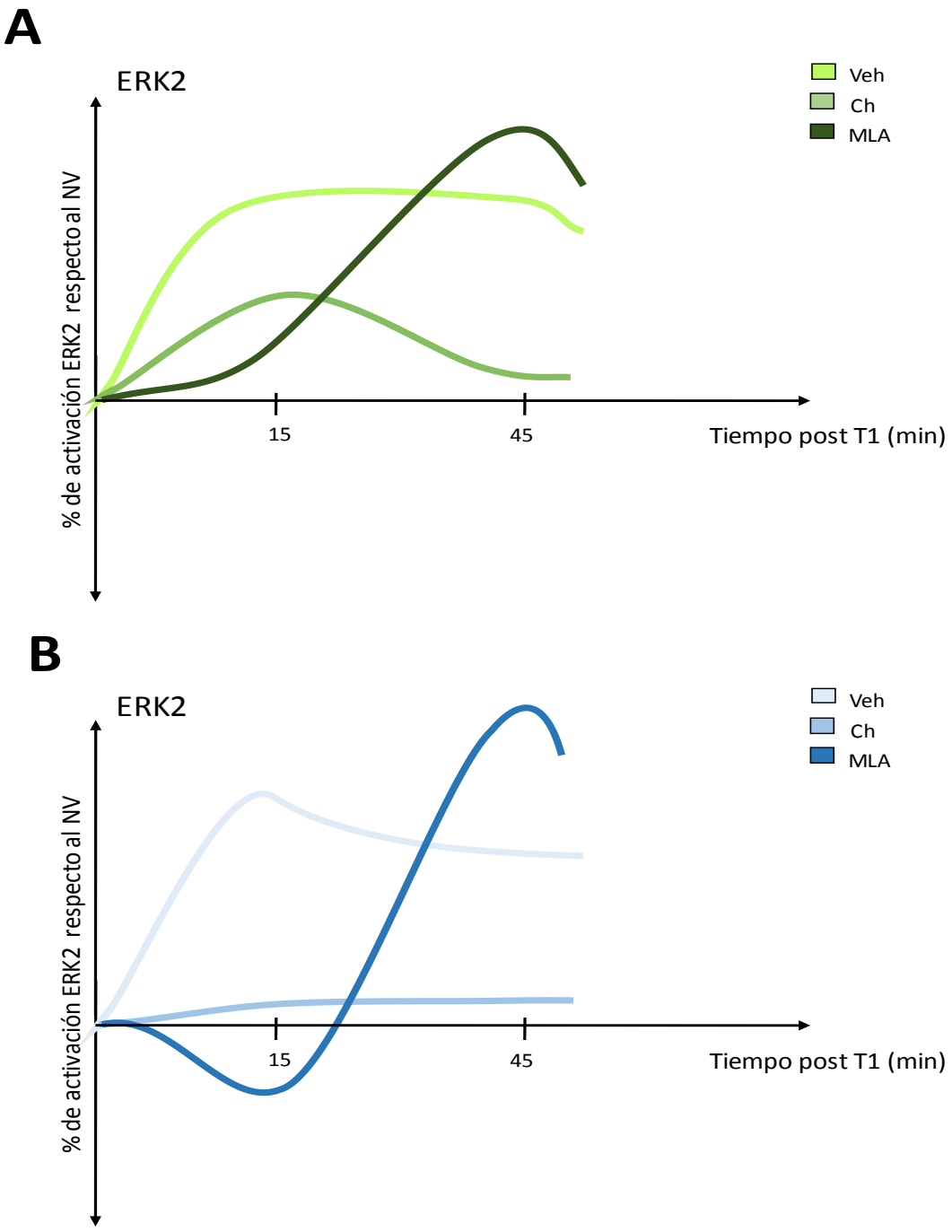

Figura 8.2. Esquema representativo del porcentaje de activación de ERK2 hipocampal, respecto del grupo NV, luego de la administración de un agonista y antagonista del RcN α7 para un entrenamiento débil (A) o fuerte (B). Cada línea representa los niveles de activación de ERK2 luego de la administración de Veh, Ch o MLA inmediatamente post T1.

8.2 ¿POR QUÉ ESTUDIAR EL PROCESO DE RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA?

En situaciones normales, nuestro cerebro es capaz de actualizar en contenido, fuerza y / o expectativas las representaciones que tiene almacenadas mediante el proceso de reconsolidación de la memoria (Dudai, 2012; Fernández et al., 2016a; Forcato et al., 2014; Lee, 2009; Nader et al., 2000; Sara, 2000). La capacidad para generar un cambio implica, en primera instancia, que la memoria se encuentre en un estado lábil (activo) y, en segunda instancia, que ocurra la re-estabilización de la misma para que el cambio persista en el tiempo (reconsolidación). Ahora bien, si cada vez que uno recordase una experiencia se desencadenara la labilización y posterior reconsolidación de la memoria, la misma podría sufrir daños irreversibles (como la eliminación de dicha experiencia). Es por ello que existen condiciones o requisitos necesarios para que el proceso de reconsolidación tenga lugar (por ejemplo, la presentación de un recordatorio específico de la experiencia almacenada). En este marco, trabajos realizados por Lewis y colaboradores demostraron que no siempre que una memoria es reactivada, y su consecuente pasaje al estado activo, es entonces modificada [revisado en (Lewis, 1976, 1979)]. Así, el proceso responsable de la reelaboración de la traza generada a partir de la reactivación de la memoria, sólo ocurriría de cumplirse ciertos requisitos que tendrían que ver con: la fuerza del entrenamiento (Boccia et al., 2004; Suzuki et al., 2004), la edad de la memoria (Boccia et al., 2006; Milekic and Alberini, 2002), la duración del CS (Pedreira and Maldonado, 2003), el desajuste entre lo que se espera y lo que realmente sucede (Exton-McGuinness et al., 2015; Mackintosh, 1975; Pearce and Bouton, 2001; Pedreira et al., 2004).

La reconsolidación de la memoria es un fenómeno universal (Dudai, 2012; Finnie and Nader, 2012; Lee, 2009; Nader and Hardt, 2009) que depende de las condiciones del contexto en que se estudie. En el marco de un laboratorio, el proceso de reconsolidación se dispara cuando el resultado o la experiencia vivida difiere de la predicha (Dudai, 2012; Exton-McGuinness et al., 2015; Pedreira et al., 2004; Reichelt and Lee, 2013; Rescorla and Wagner, 1972; Sevenster et al., 2013). Entonces, la re-exposición al contexto puede: generar un cambio no previsto con respecto a la sesión original de entrenamiento, presentar nueva información, generar una nueva sesión de aprendizaje.

El estudio del proceso de reconsolidación de la memoria generó nuevas ideas en el marco de la medicina traslacional. La neurociencia cognitiva, a partir de sus contribuciones al área de la psiquiatría (Bouton et al., 2001; Eysenck, 1976; Mineka and Zinbarg, 2006; Rachman, 1991), permitió dilucidar una estrecha relación entre la memoria (su formación, almacenamiento y utilización) y distintos desórdenes mentales como esquizofrenia, ansiedad, depresión, trastornos por déficit de atención e hiperactividad (Halligan and David, 2001; Nader et al., 2013). En este contexto, el proceso de reconsolidación de la memoria fue considerado tanto como mecanismo del mantenimiento de la misma, como una potencial herramienta terapéutica dependiendo de la psicopatología en estudio (Corlett et al., 2009; Debiec, 2012; Pitman, 2011; Sevenster et al., 2013; Taylor et al., 2009). De esta forma, intervenciones farmacológicas o comportamentales sobre el proceso de reconsolidación podrían conformar potenciales terapias para dichas enfermedades (Das et al., 2015; Debiec et al., 2002; Lee et al., 2005; Schiller et al., 2010; Soeter and

Kindt, 2015). Más aún, dado que la reconsolidación de la memoria actúa como un proceso de re-guardado, podría constituir una herramienta promisoria para el “editado de memorias”. Sin embargo, fuera del ámbito del laboratorio aún es incierto cómo el proceso de reconsolidación podría estar funcionando.

8.3

8.4 VÍAS COLINÉRGICA Y ERK/MAPKS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza, a nivel neuropatológico, por la acumulación extracelular de placas amiloides (principalmente formadas por un pequeño péptido llamado β-amiloide – βA –) e intracelular de ovillos neurofibrilares (inclusiones formados por el agregado de proteínas tau hiperfosforiladas) (Oddo and LaFerla, 2006).

Además de estas alteraciones, existen otros cambios que son característicos de esta enfermedad, como la pérdida de neuronas colinérgicas y de RcN (Burghaus et al., 2000; Perry et al., 1978; Schliebs and Arendt, 2006). Investigaciones llevadas a cabo por Quirion y colaboradores demostraron una reducción de la actividad colinérgica en pacientes con la EA en estadíos iniciales de la enfermedad, al evidenciarse alteraciones en varios marcadores de la vía (Quirion, 1993). Particularmente, existe una reducción de los subtipos de RcN α4β2 y RcN α7, aunque en menor proporción (Court et al., 2001; Perry et al., 1995). Sin embargo, en estadíos avanzados el deterioro es más profundo, abarcando otros sistemas neuroquímicos

además del colinérgico, junto con una notable pérdida de neuronas corticales (Neugroschl and Wang, 2011).

Hasta el momento existen muy pocos trabajos en donde se evalúe cuál sería la conexión entre la formación de βA, la disminución de la actividad colinérgica y el deterioro cognitivo observado (Oddo and LaFerla, 2006). Foidl y colaboradores, a partir de estudios realizados en un modelo de la EA en ratones transgénicos, sugirieron que la formación de βA podría estar induciendo la neurodegeneración colinérgica observada, que se manifiesta en el sujeto experimental como deterioro cognitivo (Foidl et al., 2016; Wang et al., 2000; Wevers et al., 1999).

Al día de hoy se desconoce el mecanismo de acción de βA en la modulación de la actividad del RcN α7. Estudios realizados apuntan al rol de βA como agonista y antagonista del receptor, evidenciando la compleja interacción entre ambos (Dineley et al., 2001; Fodero et al., 2004; Freir et al., 2001; Ji et al., 2001; Liu et al., 2001); siendo el estado de agregación del péptido (monómero, oligómero, fibrilar) una posible explicación para este comportamiento [revisado en (Oddo and LaFerla, 2006)]. En estudios llevados a cabo *in vivo* e *in vitro*, investigadores observaron un aumento en los niveles de activación de ERK2 al agregar cantidades de βA soluble por medio de la vía de activación específica de los RcN α7 (Dineley et al., 2001).

En base a lo expuesto en esta sección, una de las características más relevantes de la EA es la marcada reducción de los RcN en corteza e hipocampo (Kulshreshtha and Piplani, 2016). El mecanismo por el cual estaría ocurriendo este fenómeno es aún desconocido, aunque de gran importancia para el uso de estos receptores como potenciales blancos farmacológicos en el tratamiento de esta enfermedad. De ello se

desprende la relevancia de estudios que caractericen el perfil del receptor y las vías involucradas en los procesos de memoria.

Los resultados descriptos en esta tesis demostraron una participación crítica de los RcN α7 hipocampales en la modulación de los procesos de reconsolidación de la memoria, así como de la vía de señalización de ERK/MAPKs, aportando nuevos conocimientos al campo de la neurobiología del aprendizaje y la memoria que pudieran ser relevantes para un eventual uso terapéutico.

BIBLIOGRAFÍA

Adams, J.P., and Sweatt, J.D. (2002). Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *42*, 135–163.

Adams, J.P., Anderson, A.E., Varga, A.W., Dineley, K.T., Cook, R.G., Pfaffinger, P.J., and Sweatt, J.D. (2000). The A-type potassium channel Kv4.2 is a substrate for the mitogen-activated protein kinase ERK. J. Neurochem. *75*, 2277–2287.

Alberini, C.M. (2005). Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? Trends Neurosci. *28*, 51–56.

Alberini, C.M., Milekic, M.H., and Tronel, S. (2006). Mechanisms of memory stabilization and de-stabilization. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *63*, 999–1008.

Albuquerque, E.X., Pereira, E.F.R., Alkondon, M., and Rogers, S.W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. Physiol. Rev. *89*, 73–120.

Alonso, M., Vianna, M.R.M., Depino, A.M., Mello e Souza, T., Pereira, P., Szapiro, G., Viola, H., Pitossi, F., Izquierdo, I., and Medina, J.H. (2002). BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. Hippocampus *12*, 551–560.

Anokhin, K.V., Tiunova, A.A., and Rose, S.P.R. (2002). Reminder effects - reconsolidation or retrieval deficit? Pharmacological dissection with protein synthesis inhibitors following reminder for a passive-avoidance task in young chicks. Eur. J. Neurosci. *15*, 1759–1765.

Atkins, C.M., Selcher, J.C., Petraitis, J.J., Trzaskos, J.M., and Sweatt, J.D. (1998). The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. Nat. Neurosci. *1*, 602–609.

Baddeley, A. (2012). Working memory: theories, models, and controversies. Annu. Rev. Psychol. *63*, 1–29.

Bailey, C.H., Kaang, B.K., Chen, M., Martin, K.C., Lim, C.S., Casadio, A., and Kandel, E.R. (1997). Mutation in the phosphorylation sites of MAP kinase blocks learning-related internalization of apCAM in Aplysia sensory neurons. Neuron *18*, 913–924.

Baratti, C.M., and Kopf, S.R. (1996). A nitric oxide synthase inhibitor impairs memory storage in mice. Neurobiol. Learn. Mem. *65*, 197–201.

Baratti, C.M., Faiman, C.P., and de Erausquin, G.A. (1989). Facilitation of inhibitory avoidance by hypertonic saline is reversed by a vasopressin and a nicotinic antagonist. Behav. Neural Biol. *51*, 424–435.

Baratti, C.M., Opezzo, J.W., and Kopf, S.R. (1993). Facilitation of memory storage by the acetylcholine M2 muscarinic receptor antagonist AF-DX 116. Behav. Neural Biol. *60*, 69–74.

Baratti, C.M., Boccia, M.M., and Blake, M.G. (2009). Pharmacological effects and behavioral interventions on memory consolidation and reconsolidation. Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol. *42*, 148–154.

Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katche, C., Slipczuk, L., Rossato, J.I., Goldin, A., Izquierdo, I., and

Medina, J.H. (2008a). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 2711–2716.

Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I., and Medina, J.H. (2008b). BDNF and memory formation and storage. Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry *14*, 147–156.

Bekinschtein, P., Katche, C., Slipczuk, L., Gonzalez, C., Dorman, G., Cammarota, M., Izquierdo, I., and Medina, J.H. (2010). Persistence of long-term memory storage: new insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures. Neurotox. Res. *18*, 377–385.

Berman, D.E., and Dudai, Y. (2001). Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. Science *291*, 2417–2419.

Berman, D.E., Hazvi, S., Rosenblum, K., Seger, R., and Dudai, Y. (1998). Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *18*, 10037–10044.

Besnard, A., Caboche, J., and Laroche, S. (2013). Recall and reconsolidation of contextual fear memory: differential control by ERK and Zif268 expression dosage. PloS One *8*, e72006.

Besnard, A., Laroche, S., and Caboche, J. (2014). Comparative dynamics of MAPK/ERK signalling components and immediate early genes in the hippocampus and amygdala following contextual fear conditioning and retrieval. Brain Struct. Funct. *219*, 415–430.

Bevilaqua, L.R., Medina, J.H., Izquierdo, I., and Cammarota, M. (2008). Reconsolidation and the fate of consolidated memories. Neurotox. Res. *14*, 353–358.

Bitner, R.S., Bunnelle, W.H., Anderson, D.J., Briggs, C.A., Buccafusco, J., Curzon, P., Decker, M.W., Frost, J.M., Gronlien, J.H., Gubbins, E., et al. (2007). Broad-spectrum efficacy across cognitive domains by alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonism correlates with activation of ERK1/2 and CREB phosphorylation pathways. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *27*, 10578–10587.

Blake, M.G., Boccia, M.M., Krawczyk, M.C., Delorenzi, A., and Baratti, C.M. (2012). Choline reverses scopolamine-induced memory impairment by improving memory reconsolidation. Neurobiol. Learn. Mem. *98*, 112–121.

Blake, M.G., Boccia, M.M., Krawczyk, M.C., and Baratti, C.M. (2013). Hippocampal α7-nicotinic cholinergic receptors modulate memory reconsolidation: a potential strategy for recovery from amnesia. Neurobiol. Learn. Mem. *106*, 193–203.

Blokland, A. (1995). Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? Brain Res. Brain Res. Rev. *21*, 285–300.

Blum, S., Moore, A.N., Adams, F., and Dash, P.K. (1999). A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *19*, 3535–3544.

Blümcke, I., Aronica, E., Miyata, H., Sarnat, H.B., Thom, M., Roessler, K., Rydenhag, B., Jehi, L., Krsek, P., Wiebe, S., et al. (2016). International recommendation for a comprehensive neuropathologic workup

of epilepsy surgery brain tissue: A consensus Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. Epilepsia *57*, 348–358.

Boccia, M., Freudenthal, R., Blake, M., de la Fuente, V., Acosta, G., Baratti, C., and Romano, A. (2007). Activation of hippocampal nuclear factor-kappa B by retrieval is required for memory reconsolidation. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *27*, 13436–13445.

Boccia, M.M., Blake, M.G., Acosta, G.B., and Baratti, C.M. (2003). Atropine, an anticholinergic drug, impairs memory retrieval of a high consolidated avoidance response in mice. Neurosci. Lett. *345*, 97–100.

Boccia, M.M., Acosta, G.B., Blake, M.G., and Baratti, C.M. (2004). Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance response in mice: effects of i.c.v. injections of hemicholinium-3. Neuroscience *124*, 735–741.

Boccia, M.M., Blake, M.G., Acosta, G.B., and Baratti, C.M. (2006). Post-retrieval effects of icv infusions of hemicholinium in mice are dependent on the age of the original memory. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *13*, 376–381.

Boccia, M.M., Blake, M.G., Baratti, C.M., and McGaugh, J.L. (2009). Involvement of the basolateral amygdala in muscarinic cholinergic modulation of extinction memory consolidation. Neurobiol. Learn. Mem. *91*, 93–97.

Boccia, M.M., Blake, M.G., Krawczyk, M.C., and Baratti, C.M. (2010). Hippocampal α7 nicotinic receptors modulate memory reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice. Neuroscience *171*, 531–543.

Boggio, E.M., Putignano, E., Sassoè-Pognetto, M., Pizzorusso, T., and Giustetto, M. (2007). Visual stimulation activates ERK in synaptic and somatic compartments of rat cortical neurons with parallel kinetics. PloS One *2*, e604.

Bonner, T.I., Buckley, N.J., Young, A.C., and Brann, M.R. (1987). Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. Science *237*, 527–532.

Botreau, F., and Gisquet-Verrier, P. (2006). Memory reactivation, dissociated from behavioural expression, decreases ERK phosphorylation in the rat prefrontal cortex and amygdala. Behav. Brain Res. *169*, 176–180.

Boulton, T.G., and Cobb, M.H. (1991). Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. Cell Regul. *2*, 357–371.

Boulton, T.G., Gregory, J.S., and Cobb, M.H. (1991). Purification and properties of extracellular signal-regulated kinase 1, an insulin-stimulated microtubule-associated protein 2 kinase. Biochemistry (Mosc.) *30*, 278–286.

Bourtchouladze, R., Abel, T., Berman, N., Gordon, R., Lapidus, K., and Kandel, E.R. (1998). Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *5*, 365–374.

Bouton, M.E., Mineka, S., and Barlow, D.H. (2001). A modern learning theory perspective on the etiology of panic disorder. Psychol. Rev. *108*, 4–32.

Brown, J., and Taylor, P. Muscarinic receptor agonists and antagonists. In Goodman and Gilman´s the Pharmacological Basis of Therapeutics, P. Molinoff, and R. Ruddon, eds. (New York: McGraw-Hill), pp. 155–173.

Burghaus, L., Schütz, U., Krempel, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., Wevers, A., Lindstrom, J., and Schröder, H. (2000). Quantitative assessment of nicotinic acetylcholine receptor proteins in the cerebral cortex of Alzheimer patients. Brain Res. Mol. Brain Res. *76*, 385–388.

Cahill, L., and McGaugh, J.L. (1998). Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. Trends Neurosci. *21*, 294–299.

Cahill, L., McGaugh, J.L., and Weinberger, N.M. (2001). The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember. Trends Neurosci. *24*, 578–581.

Cain, C.K., Blouin, A.M., and Barad, M. (2004). Adrenergic transmission facilitates extinction of conditional fear in mice. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *11*, 179–187.

Cammarota, M., Bevilaqua, L.R.M., Medina, J.H., and Izquierdo, I. (2007). Studies of Short-Term Avoidance Memory (CRC Press/Taylor & Francis).

Carbó Tano, M., Molina, V.A., Maldonado, H., and Pedreira, M.E. (2009). Memory consolidation and reconsolidation in an invertebrate model: the role of the GABAergic system. Neuroscience *158*, 387–401.

Cestari, V., Costanzi, M., Castellano, C., and Rossi-Arnaud, C. (2006). A role for ERK2 in reconsolidation of fear memories in mice. Neurobiol. Learn. Mem. *86*, 133–143.

Co Tui, null, and Debruille, C. (1945). The comparative toxicity and effectiveness of scopolamine hydrobromide (C17H21O4N.HBr) and scopolamine aminoxide hydrobromide (C17H21O5N HBr). Am. J. Pharm. Sci. Support. Public Health *117*, 319–326.

Corlett, P.R., Krystal, J.H., Taylor, J.R., and Fletcher, P.C. (2009). Why do delusions persist? Front. Hum. Neurosci. *3*, 12.

Courcelles, M., Frémin, C., Voisin, L., Lemieux, S., Meloche, S., and Thibault, P. (2013). Phosphoproteome dynamics reveal novel ERK1/2 MAP kinase substrates with broad spectrum of functions. Mol. Syst. Biol. *9*, 669.

Court, J., Martin-Ruiz, C., Piggott, M., Spurden, D., Griffiths, M., and Perry, E. (2001). Nicotinic receptor abnormalities in Alzheimer's disease. Biol. Psychiatry *49*, 175–184.

Crow, T., Xue-Bian, J.J., Siddiqi, V., Kang, Y., and Neary, J.T. (1998). Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase by one-trial and multi-trial classical conditioning. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *18*, 3480–3487.

Curzon, P., Anderson, D.J., Nikkel, A.L., Fox, G.B., Gopalakrishnan, M., Decker, M.W., and Bitner, R.S.

(2006). Antisense knockdown of the rat alpha7 nicotinic acetylcholine receptor produces spatial memory impairment. Neurosci. Lett. *410*, 15–19.

Das, R.K., Lawn, W., and Kamboj, S.K. (2015). Rewriting the valuation and salience of alcohol-related stimuli via memory reconsolidation. Transl. Psychiatry *5*, e645.

Davies, P., and Maloney, A.J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. Lancet Lond. Engl. *2*, 1403.

Debiec, J. (2012). Memory reconsolidation processes and posttraumatic stress disorder: promises and challenges of translational research. Biol. Psychiatry *71*, 284–285.

Debiec, J., LeDoux, J.E., and Nader, K. (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. Neuron *36*, 527–538.

Decker, M.W., and McGaugh, J.L. (1991). The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory. Synap. N. Y. N *7*, 151–168.

DeVietti, T.L., and Kirkpatrick, B.R. (1976). The amnesia gradient: inadequate as evidence for a memory consolidation process. Science *194*, 438–440.

Dineley, K.T., Westerman, M., Bui, D., Bell, K., Ashe, K.H., and Sweatt, J.D. (2001). Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *21*, 4125–4133.

Dong, H.-W., Swanson, L.W., Chen, L., Fanselow, M.S., and Toga, A.W. (2009). Genomic-anatomic evidence for distinct functional domains in hippocampal field CA1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 11794–11799.

Dossani, R.H., Missios, S., and Nanda, A. (2015). The Legacy of Henry Molaison (1926-2008) and the Impact of His Bilateral Mesial Temporal Lobe Surgery on the Study of Human Memory. World Neurosurg. *84*, 1127–1135.

Dudai, Y. (2000). Neurobiology. The shaky trace. Nature *406*, 686–687.

Dudai, Y. (2002a). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. Curr. Opin. Neurobiol. *12*, 211–216.

Dudai, Y. (2002b). Memory from A to Z: keywords, concepts and beyond. Y. Dudai. Oxford University Press, Oxford, 2002. No. of pages 331. ISBN 0-19-850267-2. Price £37.50 (hardback). Appl. Cogn. Psychol. *18*, 777–778.

Dudai, Y. (2012). The restless engram: consolidations never end. Annu. Rev. Neurosci. *35*, 227–247.

Duvarci, S., Nader, K., and LeDoux, J.E. (2005). Activation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning. Eur. J. Neurosci. *21*, 283–289.

Earnest, S., Khokhlatchev, A., Albanesi, J.P., and Barylko, B. (1996). Phosphorylation of dynamin by

ERK2 inhibits the dynamin-microtubule interaction. FEBS Lett. *396*, 62–66.

Eglen, R.M. (2005). Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. Prog. Med. Chem. *43*, 105–136.

Eglen, R.M. (2006). Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. Auton. Autacoid Pharmacol. *26*, 219–233.

Eichenbaum, H., and Cohen, N. (2004). From Conditioning to Conscious Recollection (Canada: Oxford University Press).

English, J.D., and Sweatt, J.D. (1997). A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. J. Biol. Chem. *272*, 19103–19106.

Exton-McGuinness, M.T.J., Lee, J.L.C., and Reichelt, A.C. (2015). Updating memories--the role of prediction errors in memory reconsolidation. Behav. Brain Res. *278*, 375–384.

Eysenck, H.J. (1976). The learning theory model of neurosis—a new approach. Behav. Res. Ther. *14*, 251–267.

Fanselow, M.S., and Dong, H.-W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? Neuron *65*, 7–19.

Federman, N., Fustiñana, M.S., and Romano, A. (2009). Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *16*, 600–606.

Federman, N., de la Fuente, V., Zalcman, G., Corbi, N., Onori, A., Passananti, C., and Romano, A. (2013). Nuclear factor κB-dependent histone acetylation is specifically involved in persistent forms of memory. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *33*, 7603–7614.

Feld, M. (2007). Rol de la vía de MAPKs en distintas fases de la memoria. Implicancias en la señalización intracelular de ß-amiloide.

Feld, M., Dimant, B., Delorenzi, A., Coso, O., and Romano, A. (2005). Phosphorylation of extra-nuclear ERK/MAPK is required for long-term memory consolidation in the crab Chasmagnathus. Behav. Brain Res. *158*, 251–261.

Feld, M., Galli, C., Piccini, A., and Romano, A. (2008). Effect on memory of acute administration of naturally secreted fibrils and synthetic amyloid-beta peptides in an invertebrate model. Neurobiol. Learn. Mem. *89*, 407–418.

Feld, M., Krawczyk, M.C., Sol Fustiñana, M., Blake, M.G., Baratti, C.M., Romano, A., and Boccia, M.M. (2014). Decrease of ERK/MAPK overactivation in prefrontal cortex reverses early memory deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. JAD *40*, 69–82.

Feng, Y.J., and Li, Y.Y. (2011). The role of p38 mitogen-activated protein kinase in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. J. Dig. Dis. *12*, 327–332.

Fernández, R.S., Boccia, M.M., and Pedreira, M.E. (2016a). The fate of memory: Reconsolidation and the case of Prediction Error. Neurosci. Biobehav. Rev. *68*, 423–441.

Fernández, R.S., Bavassi, L., Kaczer, L., Forcato, C., and Pedreira, M.E. (2016b). Interference Conditions of the Reconsolidation Process in Humans: The Role of Valence and Different Memory Systems. Front. Hum. Neurosci. *10*, 641.

Ferreira-Vieira, T.H., Guimaraes, I.M., Silva, F.R., and Ribeiro, F.M. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. Curr. Neuropharmacol. *14*, 101–115.

Fibiger, H.C. (1991). Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. Trends Neurosci. *14*, 220–223.

Finnie, P.S.B., and Nader, K. (2012). The role of metaplasticity mechanisms in regulating memory destabilization and reconsolidation. Neurosci. Biobehav. Rev. *36*, 1667–1707.

Fodero, L.R., Mok, S.S., Losic, D., Martin, L.L., Aguilar, M.I., Barrow, C.J., Livett, B.G., and Small, D.H. (2004). Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors mediate an Abeta(1-42)-induced increase in the level of acetylcholinesterase in primary cortical neurones. J. Neurochem. *88*, 1186–1193.

Foidl, B.M., Do-Dinh, P., Hutter-Schmid, B., Bliem, H.R., and Humpel, C. (2016). Cholinergic neurodegeneration in an Alzheimer mouse model overexpressing amyloid-precursor protein with the Swedish-Dutch-Iowa mutations. Neurobiol. Learn. Mem. *136*, 86–96.

Forcato, C., Burgos, V.L., Argibay, P.F., Molina, V.A., Pedreira, M.E., and Maldonado, H. (2007). Reconsolidation of declarative memory in humans. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *14*, 295–303.

Forcato, C., Fernandez, R.S., and Pedreira, M.E. (2014). Strengthening a consolidated memory: the key role of the reconsolidation process. J. Physiol. Paris *108*, 323–333.

Frazier, C.J., Buhler, A.V., Weiner, J.L., and Dunwiddie, T.V. (1998). Synaptic potentials mediated via alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal interneurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *18*, 8228–8235.

Freir, D.B., Holscher, C., and Herron, C.E. (2001). Blockade of long-term potentiation by beta-amyloid peptides in the CA1 region of the rat hippocampus in vivo. J. Neurophysiol. *85*, 708–713.

Frémin, C., Saba-El-Leil, M.K., Lévesque, K., Ang, S.-L., and Meloche, S. (2015). Functional Redundancy of ERK1 and ERK2 MAP Kinases during Development. Cell Rep. *12*, 913–921.

Freudenthal, R., and Romano, A. (2000). Participation of Rel/NF-kappaB transcription factors in long-term memory in the crab Chasmagnathus. Brain Res. *855*, 274–281.

Freudenthal, R., Boccia, M.M., Acosta, G.B., Blake, M.G., Merlo, E., Baratti, C.M., and Romano, A. (2005). NF-kappaB transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice. Eur. J. Neurosci. *21*, 2845–2852.

Gallagher, M., and Colombo, P.J. (1995). Ageing: the cholinergic hypothesis of cognitive decline. Curr. Opin. Neurobiol. *5*, 161–168.

Gardiner, J.E. (1961). The inhibition of acetylcholine synthesis in brain by a hemicholinium. Biochem. J. *81*, 297–303.

Giovannini, M.G., Lana, D., and Pepeu, G. (2015). The integrated role of ACh, ERK and mTOR in the mechanisms of hippocampal inhibitory avoidance memory. Neurobiol. Learn. Mem. *119*, 18–33.

Glowinski, J., and Iversen, L. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain. 3. Subcellullar distribution of endogenous and exogenous catecholamines in various brain regions. Biochem. Pharmacol. *15*, 977–987.

Gold, P.E. (2003). Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. Neurobiol. Learn. Mem. *80*, 194–210.

Gold, P.E., and McGaugh, J.L. (1975). A single-trace, two processes view of memory storage processes. Short-term memory. (New York: Academic Press).

Gold, P.E., and Van Buskirk, R.B. (1975). Facilitation of time-dependent memory processes with posttrial epinephrine injections. Behav. Biol. *13*, 145–153.

Gonsalvez, D., Ferner, A.H., Peckham, H., Murray, S.S., and Xiao, J. (2016). The roles of extracellular related-kinases 1 and 2 signaling in CNS myelination. Neuropharmacology *110*, 586–593.

Gonzalez, F.A., Raden, D.L., and Davis, R.J. (1991). Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. J. Biol. Chem. *266*, 22159–22163.

Gordon, W.C. (1977). Susceptibility of a reactivated memory to the effects of strychnine: a time-dependent phenomenon. Physiol. Behav. *18*, 95–99.

Gottschalk, W., Pozzo-Miller, L.D., Figurov, A., and Lu, B. (1998). Presynaptic modulation of synaptic transmission and plasticity by brain-derived neurotrophic factor in the developing hippocampus. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *18*, 6830–6839.

Gray, J. (1982). The Neuropsychology of anxiety: an enquiry into de functions of the septo-hippocampal system. Behav. BRAIN Sci. 469–534.

Gray, R., Rajan, A.S., Radcliffe, K.A., Yakehiro, M., and Dani, J.A. (1996). Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. Nature *383*, 713–716.

Halligan, P.W., and David, A.S. (2001). Cognitive neuropsychiatry: towards a scientific psychopathology. Nat. Rev. Neurosci. *2*, 209–215.

Hebert, A.E., and Dash, P.K. (2002). Extracellular signal-regulated kinase activity in the entorhinal cortex is necessary for long-term spatial memory. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *9*, 156–166.

Herry, C., Ferraguti, F., Singewald, N., Letzkus, J.J., Ehrlich, I., and Lüthi, A. (2010). Neuronal circuits of fear extinction. Eur. J. Neurosci. *31*, 599–612.

von Hertzen, L.S.J., and Giese, K.P. (2005). Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *25*, 1935–1942.

Hoeffer, C.A., Cowansage, K.K., Arnold, E.C., Banko, J.L., Moerke, N.J., Rodriguez, R., Schmidt, E.K., Klosi, E., Chorev, M., Lloyd, R.E., et al. (2011). Inhibition of the interactions between eukaryotic initiation factors 4E and 4G impairs long-term associative memory consolidation but not

reconsolidation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 3383–3388.

Horne, C.A., Rodriguez, W.A., Wright, T.P., and Padilla, J.L. (1997). Time-dependent effects of fructose on the modulation of a reactivated memory. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry *21*, 649–658.

Hupbach, A., Gomez, R., and Nadel, L. (2009). Episodic memory reconsolidation: updating or source confusion? Mem. Hove Engl. *17*, 502–510.

Izquierdo, I., da Cunha, C., Rosat, R., Jerusalinsky, D., Ferreira, M.B., and Medina, J.H. (1992). Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. Behav. Neural Biol. *58*, 16–26.

Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., de Souza, M.M., Izquierdo, L.A., and Medina, J.H. (1998). Mechanisms for memory types differ. Nature *393*, 635–636.

Izquierdo, I., Bevilaqua, L.R.M., Rossato, J.I., da Silva, W.C., Bonini, J., Medina, J.H., and Cammarota, M. (2008). The molecular cascades of long-term potentiation underlie memory consolidation of one-trial avoidance in the CA1 region of the dorsal hippocampus, but not in the basolateral amygdala or the neocortex. Neurotox. Res. *14*, 273–294.

Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Vianna, M.R.M., Coitinho, A., deDavid e Silva, T., Choi, H., Moletta, B., Medina, J.H., and Izquierdo, I. (2002). Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. Cell. Mol. Neurobiol. *22*, 269–287.

Jerusalinsky, D., Cerveñansky, C., Walz, R., Bianchin, M., and Izquierdo, I. (1993). A peptide muscarinic toxin from the Green Mamba venom shows agonist-like action in an inhibitory avoidance learning task. Eur. J. Pharmacol. *240*, 103–105.

Jerusalinsky, D., Kornisiuk, E., Bernabeu, R., Izquierdo, I., and Cerveñansky, C. (1995). Muscarinic toxins from the venom of Dendroaspis snakes with agonist-like actions. Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology *33*, 389–397.

Ji, D., Lape, R., and Dani, J.A. (2001). Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. Neuron *31*, 131–141.

Jope, R.S. (1979). High affinity choline transport and acetylCoA production in brain and their roles in the regulation of acetylcholine synthesis. Brain Res. *180*, 313–344.

Judge, M.E., and Quartermain, D. (1982). Characteristics of retrograde amnesia following reactivation of memory in mice. Physiol. Behav. *28*, 585–590.

Kandel, E.R., Dudai, Y., and Mayford, M.R. (2014). The molecular and systems biology of memory. Cell *157*, 163–186.

Kelleher, R.J., Govindarajan, A., Jung, H.-Y., Kang, H., and Tonegawa, S. (2004). Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. Cell *116*, 467–479.

Kelly, A., Laroche, S., and Davis, S. (2003). Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular

signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *23*, 5354–5360.

Kopf, S.R., and Baratti, C.M. (1996). Enhancement of the post-training cholinergic tone antagonizes the impairment of retention induced by a nitric oxide synthase inhibitor in mice. Neurobiol. Learn. Mem. *65*, 207–212.

Kubo, T., Fukuda, K., Mikami, A., Maeda, A., Takahashi, H., Mishina, M., Haga, T., Haga, K., Ichiyama, A., and Kangawa, K. (1986). Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. Nature *323*, 411–416.

Kulshreshtha, A., and Piplani, P. (2016). Current pharmacotherapy and putative disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol. *37*, 1403–1435.

Kültz, D. (1998). Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases. J. Mol. Evol. *46*, 571–588.

Lake, D., Corrêa, S.A.L., and Müller, J. (2016). Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *73*, 4397–4413.

Langmead, C.J., Watson, J., and Reavill, C. (2008). Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. Pharmacol. Ther. *117*, 232–243.

LeDoux, J.E. (2000). Emotion circuits in the brain. Annu. Rev. Neurosci. *23*, 155–184.

LeDoux, J.E., Moscarello, J., Sears, R., and Campese, V. (2017). The birth, death and resurrection of avoidance: a reconceptualization of a troubled paradigm. Mol. Psychiatry *22*, 24–36.

Lee, J.L.C. (2009). Reconsolidation: maintaining memory relevance. Trends Neurosci. *32*, 413–420.

Lee, J.L.C., Everitt, B.J., and Thomas, K.L. (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. Science *304*, 839–843.

Lee, J.L.C., Di Ciano, P., Thomas, K.L., and Everitt, B.J. (2005). Disrupting reconsolidation of drug memories reduces cocaine-seeking behavior. Neuron *47*, 795–801.

Levey, A.I. (1993). Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. Life Sci. *52*, 441–448.

Levin, E.D., and Rezvani, A.H. (2002). Nicotinic treatment for cognitive dysfunction. Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord. *1*, 423–431.

Levin, E.D., McClernon, F.J., and Rezvani, A.H. (2006). Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. Psychopharmacology (Berl.) *184*, 523–539.

Lewis, D.J. (1976). A cognitive approach to experimental amnesia. Am. J. Psychol. 51–80.

Lewis, D.J. (1979). Psychobiology of active and inactive memory. Psychol. Bull. *86*, 1054–1083.

Li, M., Liu, J., and Zhang, C. (2011). Evolutionary History of the Vertebrate Mitogen Activated Protein Kinases Family. PLoS ONE *6*.

Liu, Q., Kawai, H., and Berg, D.K. (2001). beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 4734–4739.

Lu, Y.F., Kandel, E.R., and Hawkins, R.D. (1999). Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *19*, 10250–10261.

Mackintosh, F. (1982). Cholinergic transmission: Variation on a theme. In Progress in Modern Cholinergic Biology: Model Cholinergic Synapses, I. Hannin, and A. Goldberg, eds. (New York: Raven Press), pp. 1–22.

Mackintosh, N. (1975). A theory of attention: Variations in the associability of stimuli with reinforcement. Psychol. Rev. *82*, 276–298.

Mactutus, C.F., Riccio, D.C., and Ferek, J.M. (1979). Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. Science *204*, 1319–1320.

Maddox, S.A., and Schafe, G.E. (2011). The activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc/Arg3.1) is required for reconsolidation of a Pavlovian fear memory. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 7073–7082.

Martí Barros, D., Ramirez, M.R., Dos Reis, E.A., and Izquierdo, I. (2004). Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. Neuroscience *126*, 651–656.

Martijena, I.D., and Molina, V.A. (2012). The influence of stress on fear memory processes. Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol. *45*, 308–313.

Martin, K.C., Michael, D., Rose, J.C., Barad, M., Casadio, A., Zhu, H., and Kandel, E.R. (1997). MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in Aplysia. Neuron *18*, 899–912.

Mason, S.T. (1983). The neurochemistry and pharmacology of extinction behavior. Neurosci. Biobehav. Rev. *7*, 325–347.

McGaugh, J.L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. Science *153*, 1351–1358.

McGaugh, J.L. (1985). Peripheral and central adrenergic influences on brain systems involved in the modulation of memory storage. Ann. N. Y. Acad. Sci. *444*, 150–161.

McGaugh, J.L. (1989). Dissociating learning and performance: drug and hormone enhancement of memory storage. Brain Res. Bull. *23*, 339–345.

McGaugh, J.L. (2000). Memory--a century of consolidation. Science *287*, 248–251.

McGaugh, J.L., and Roozendaal, B. (2009). Drug enhancement of memory consolidation: historical perspective and neurobiological implications. Psychopharmacology (Berl.) *202*, 3–14.

McGehee, D.S., and Role, L.W. (1995). Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. Annu. Rev. Physiol. *57*, 521–546.

McKinney, M., and Coyle, J.T. (1991). The potential for muscarinic receptor subtype-specific pharmacotherapy for Alzheimer's disease. Mayo Clin. Proc. *66*, 1225–1237.

Medina, J.H., Bekinschtein, P., Cammarota, M., and Izquierdo, I. (2008). Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? Behav. Brain Res. *192*, 61–69.

Meiri, N., and Rosenblum, K. (1998). Lateral ventricle injection of the protein synthesis inhibitor anisomycin impairs long-term memory in a spatial memory task. Brain Res. *789*, 48–55.

Meloche, S., and Roux, P.P. (2012). F-box proteins elongate translation during stress recovery. Sci. Signal. *5*, pe25.

Merlo, E., Freudenthal, R., and Romano, A. (2002). The IkappaB kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab Chasmagnathus. Neuroscience *112*, 161–172.

Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Wainer, B.H., and Levey, A.I. (1983). Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). Neuroscience *10*, 1185–1201.

Milekic, M.H., and Alberini, C.M. (2002). Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. Neuron *36*, 521–525.

Miller, C.A., and Marshall, J.F. (2005). Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. Neuron *47*, 873–884.

Milner, B., Squire, L.R., and Kandel, E.R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. Neuron *20*, 445–468.

Mineka, S., and Zinbarg, R. (2006). A contemporary learning theory perspective on the etiology of anxiety disorders: it's not what you thought it was. Am. Psychol. *61*, 10–26.

Misanin, J.R., Miller, R.R., and Lewis, D.J. (1968). Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. Science *160*, 554–555.

Mizuno, M., Yamada, K., Olariu, A., Nawa, H., and Nabeshima, T. (2000). Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 7116–7121.

Mohs, R.C., and Davis, K.L. (1985). Interaction of choline and scopolamine in human memory. Life Sci. *37*, 193–197.

Montarolo, P.G., Goelet, P., Castellucci, V.F., Morgan, J., Kandel, E.R., and Schacher, S. (1986). A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in Aplysia. Science *234*, 1249–1254.

Moscovitch, M., and Nadel, L. (1998). Consolidation and the hippocampal complex revisited: in defense of the multiple-trace model. Curr. Opin. Neurobiol. *8*, 297–300.

Müller, G., and Pilzecker, A. (1900). Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss. Z. Für Psychol. 1–300.

Myers, K.M., and Davis, M. (2002). Systems-level reconsolidation: reengagement of the hippocampus with memory reactivation. Neuron *36*, 340–343.

Myers, K.M., and Davis, M. (2007). Mechanisms of fear extinction. Mol. Psychiatry *12*, 120–150.

Nader, K. (2003). Memory traces unbound. Trends Neurosci. *26*, 65–72.

Nader, K., and Hardt, O. (2009). A single standard for memory: the case for reconsolidation. Nat. Rev. Neurosci. *10*, 224–234.

Nader, K., Schafe, G.E., and Le Doux, J.E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. Nature *406*, 722–726.

Nader, K., Hardt, O., and Lanius, R. (2013). Memory as a new therapeutic target. Dialogues Clin. Neurosci. *15*, 475–486.

Napier, R.M., Macrae, M., and Kehoe, E.J. (1992). Rapid reaquisition in conditioning of the rabbit's nictitating membrane response. J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process. *18*, 182–192.

National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Washington (DC): National Academies Press (US)).

Neugroschl, J., and Wang, S. (2011). Alzheimer's disease: diagnosis and treatment across the spectrum of disease severity. Mt. Sinai J. Med. N. Y. *78*, 596–612.

Oddo, S., and LaFerla, F.M. (2006). The role of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. J. Physiol. Paris *99*, 172–179.

Ogren, S.O. (1985). Evidence for a role of brain serotonergic neurotransmission in avoidance learning. Acta Physiol. Scand. Suppl. *544*, 1–71.

Origlia, N., Kuczewski, N., Aztiria, E., Gautam, D., Wess, J., and Domenici, L. (2006). Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice show distinct synaptic plasticity impairments in the visual cortex. J. Physiol. *577*, 829–840.

Packard, M.G., Introini-Collison, I., and McGaugh, J.L. (1996). Stria terminalis lesions attenuate memory enhancement produced by intracaudate nucleus injections of oxotremorine. Neurobiol. Learn. Mem. *65*, 278–282.

Pagès, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J.C., Meloche, S., and Pouysségur, J. (1993). Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 8319–8323.

Pagès, G., Guérin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberger, P., and Pouysségur, J. (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. Science *286*, 1374–1377.

Pavlov, I. (1927). Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex (London: Oxford University Press).

Pearce, J.M., and Bouton, M.E. (2001). Theories of associative learning in animals. Annu. Rev. Psychol. *52*, 111–139.

Pearson, L.L., Castle, B.E., and Kehry, M.R. (2001). CD40-mediated signaling in monocytic cells: up-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. Int. Immunol. *13*, 273–283.

Pedreira, M.E., and Maldonado, H. (2003). Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. Neuron *38*, 863–869.

Pedreira, M.E., Dimant, B., and Maldonado, H. (1996). Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab Chasmagnathus. Pharmacol. Biochem. Behav. *54*, 611–617.

Pedreira, M.E., Pérez-Cuesta, L.M., and Maldonado, H. (2002). Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab Chasmagnathus: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *22*, 8305–8311.

Pedreira, M.E., Pérez-Cuesta, L.M., and Maldonado, H. (2004). Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *11*, 579–585.

Perry, E.K., Tomlinson, B.E., Blessed, G., Bergmann, K., Gibson, P.H., and Perry, R.H. (1978). Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. Br. Med. J. *2*, 1457–1459.

Perry, E.K., Morris, C.M., Court, J.A., Cheng, A., Fairbairn, A.F., McKeith, I.G., Irving, D., Brown, A., and Perry, R.H. (1995). Alteration in nicotine binding sites in Parkinson's disease, Lewy body dementia and Alzheimer's disease: possible index of early neuropathology. Neuroscience *64*, 385–395.

Pitman, R.K. (2011). Will reconsolidation blockade offer a novel treatment for posttraumatic stress disorder? Front. Behav. Neurosci. *5*, 11.

Power, A.E., Roozendaal, B., and McGaugh, J.L. (2000). Glucocorticoid enhancement of memory consolidation in the rat is blocked by muscarinic receptor antagonism in the basolateral amygdala. Eur. J. Neurosci. *12*, 3481–3487.

Power, A.E., Vazdarjanova, A., and McGaugh, J.L. (2003). Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. Neurobiol. Learn. Mem. *80*, 178–193.

Prado-Alcala, R.A., Cruz-Morales, S.E., and Lopez-Miro, F.A. (1980). Differential effects of cholinergic blockade of anterior and posterior caudate nucleus on avoidance behaviors. Neurosci. Lett. *18*, 339–345.

Przybyslawski, J., and Sara, S.J. (1997). Reconsolidation of memory after its reactivation. Behav. Brain Res. *84*, 241–246.

Przybyslawski, J., Roullet, P., and Sara, S.J. (1999). Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *19*, 6623–6628.

Quirarte, G.L., Cruz-Morales, S.E., Diaz del Guante, M.A., Garcia, M., and Prado-Alcalá, R.A. (1993). Protective effect of under-reinforcement of passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. Brain Res. Bull. *32*, 521–524.

Quirarte, G.L., Cruz-Morales, S.E., Cepeda, A., García-Montañez, M., Roldán-Roldán, G., and Prado-Alcalá, R.A. (1994). Effects of central muscarinic blockade on passive avoidance: anterograde amnesia, state dependency, or both? Behav. Neural Biol. *62*, 15–20.

Quirion, R. (1993). Cholinergic markers in Alzheimer disease and the autoregulation of acetylcholine release. J. Psychiatry Neurosci. JPN *18*, 226–234.

Quirk, G.J., and Mueller, D. (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *33*, 56–72.

Rachman, S. (1991). Neo-conditioning and the classical theory of fear acquisition. Clin. Psychol. Rev. *11*, 155–173.

Radcliffe, K.A., Fisher, J.L., Gray, R., and Dani, J.A. (1999). Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission of hippocampal neurons. Ann. N. Y. Acad. Sci. *868*, 591–610.

Rafiee, P., Lee, J.K., Leung, C.C., and Raffin, T.A. (1995). TNF-alpha induces tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in adherent human neutrophils. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *154*, 4785–4792.

Raman, M., Chen, W., and Cobb, M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. Oncogene *26*, 3100–3112.

Reichelt, A.C., and Lee, J.L.C. (2013). Memory reconsolidation in aversive and appetitive settings. Front. Behav. Neurosci. *7*, 118.

Rescorla, R., and Wagner, A. (1972). A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement (PDF Download Available). In Classical Conditioning II: Current Theory and Research, A. Black, and W. Prokasy, eds. (New York: Meredith Corporation), pp. 64–99.

Ringdahl, B., and Jenden, D.J. (1983). Pharmacological properties of oxotremorine and its analogs. Life Sci. *32*, 2401–2413.

Robbins, M.J., and Meyer, D.R. (1970). Motivational control of retrograde amnesia. J. Exp. Psychol. *84*, 220–225.

Roberson, M.S., Zhang, T., Li, H.L., and Mulvaney, J.M. (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by gonadotropin-releasing hormone. Endocrinology *140*, 1310–1318.

Rodriguez, W.A., Horne, C.A., and Padilla, J.L. (1999). Effects of glucose and fructose on recently reactivated and recently acquired memories. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry *23*, 1285–

1317.

Romano, A., Locatelli, F., Freudenthal, R., Merlo, E., Feld, M., Ariel, P., Lemos, D., Federman, N., and Fustiñana, M.S. (2006). Lessons from a crab: molecular mechanisms in different memory phases of Chasmagnathus. Biol. Bull. *210*, 280–288.

de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A., and Bos, J.L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. Nature *396*, 474–477.

Roozendaal, B., and McGaugh, J.L. (2011). Memory modulation. Behav. Neurosci. *125*, 797–824.

Rosat, R., Da-Silva, R.C., Zanatta, M.S., Medina, J.H., and Izquierdo, I. (1992). Memory consolidation of a habituation task: role of N-methyl-D-aspartate, cholinergic muscarinic and GABA-A receptors in different brain regions. Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol. *25*, 267–273.

Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R.M., Izquierdo, I., Medina, J.H., and Cammarota, M. (2009). Dopamine controls persistence of long-term memory storage. Science *325*, 1017–1020.

Roullet, P., and Sara, S. (1998). Consolidation of memory after its reactivation: involvement of beta noradrenergic receptors in the late phase. Neural Plast. *6*, 63–68.

Runyan, J.D., and Dash, P.K. (2004). Intra-medial prefrontal administration of SCH-23390 attenuates ERK phosphorylation and long-term memory for trace fear conditioning in rats. Neurobiol. Learn. Mem. *82*, 65–70.

Saba-El-Leil, M.K., Frémin, C., and Meloche, S. (2016). Redundancy in the World of MAP Kinases: All for One. Front. Cell Dev. Biol. *4*, 67.

Sandoz, J.-C., and Pham-Delègue, M.-H. (2004). Spontaneous recovery after extinction of the conditioned proboscis extension response in the honeybee. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *11*, 586–597.

Sara, S.J. (2000). Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *7*, 73–84.

Sara, S.J., Roullet, P., and Przybyslawski, J. (1999). Consolidation of memory for odor-reward association: beta-adrenergic receptor involvement in the late phase. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *6*, 88–96.

Schafe, G.E., Nadel, N.V., Sullivan, G.M., Harris, A., and LeDoux, J.E. (1999). Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *6*, 97–110.

Schafe, G.E., Atkins, C.M., Swank, M.W., Bauer, E.P., Sweatt, J.D., and LeDoux, J.E. (2000). Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 8177–8187.

Schiller, D., Monfils, M.-H., Raio, C.M., Johnson, D.C., Ledoux, J.E., and Phelps, E.A. (2010). Preventing

the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. Nature *463*, 49–53.

Schliebs, R., and Arendt, T. (2006). The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. J. Neural Transm. Vienna Austria 1996 *113*, 1625–1644.

Schneider, A.M., and Sherman, W. (1968). Amnesia: a function of the temporal relation of footshock to electroconvulsive shock. Science *159*, 219–221.

Scoville, W., and Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. J Neurol Psychiatry *20*, 11–21.

Selcher, J.C., Atkins, C.M., Trzaskos, J.M., Paylor, R., and Sweatt, J.D. (1999). A necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *6*, 478–490.

Selcher, J.C., Nekrasova, T., Paylor, R., Landreth, G.E., and Sweatt, J.D. (2001). Mice lacking the ERK1 isoform of MAP kinase are unimpaired in emotional learning. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *8*, 11–19.

Sevenster, D., Beckers, T., and Kindt, M. (2013). Prediction error governs pharmacologically induced amnesia for learned fear. Science *339*, 830–833.

Shute, C.C., and Lewis, P.R. (1966). Electron microscopy of cholinergic terminals and acetylcholinesterase-containing neurones in the hippocampal formation of the rat. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria 1948 *69*, 334–343.

Skinner, B.F. (1966). What is the experimental analysis of behavior? J. Exp. Anal. Behav. *9*, 213–218.

Soeter, M., and Kindt, M. (2015). Retrieval cues that trigger reconsolidation of associative fear memory are not necessarily an exact replica of the original learning experience. Front. Behav. Neurosci. *9*, 122.

Spear, N.E., Miller, J.S., and Jagielo, J.A. (1990). Animal memory and learning. Annu. Rev. Psychol. *41*, 169–211.

Squire, L.R. (1986). Mechanisms of memory. Science *232*, 1612–1619.

Squire, L.R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. Psychol. Rev. *99*, 195–231.

Squire, L.R., and Alvarez, P. (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. Curr. Opin. Neurobiol. *5*, 169–177.

Squire, L.R., and Zola-Morgan, S. (1988). Memory: brain systems and behavior. Trends Neurosci. *11*, 170–175.

Squire, L.R., Genzel, L., Wixted, J.T., and Morris, R.G. (2015). Memory consolidation. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *7*, a021766.

Strange, B.A., Witter, M.P., Lein, E.S., and Moser, E.I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. Nat. Rev. Neurosci. *15*, 655–669.

Sutton, M.A., Bagnall, M.W., Sharma, S.K., Shobe, J., and Carew, T.J. (2004). Intermediate-term memory for site-specific sensitization in aplysia is maintained by persistent activation of protein kinase C. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 3600–3609.

Suzuki, A., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., Masushige, S., Silva, A.J., and Kida, S. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 4787–4795.

Sweatt, J.D. (2001). The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. J. Neurochem. *76*, 1–10.

Taly, A., Corringer, P.-J., Guedin, D., Lestage, P., and Changeux, J.-P. (2009). Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. Nat. Rev. Drug Discov. *8*, 733–750.

Taubenfeld, S.M., Milekic, M.H., Monti, B., and Alberini, C.M. (2001). The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. Nat. Neurosci. *4*, 813–818.

Taylor, P. (2001). The pharmacological basis of therapeutics. In Goodman and Gilman´s The Pharmacological Basis of Therapeutics, P. Molinoff, and R. Ruddon, eds. (New York: McGraw-Hill), pp. 175–191.

Taylor, J.R., Olausson, P., Quinn, J.J., and Torregrossa, M.M. (2009). Targeting extinction and reconsolidation mechanisms to combat the impact of drug cues on addiction. Neuropharmacology *56 Suppl 1*, 186–195.

Thompson, R.F., and Spencer, W.A. (1966). Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. Psychol. Rev. *73*, 16–43.

Thompson, C.L., Pathak, S.D., Jeromin, A., Ng, L.L., MacPherson, C.R., Mortrud, M.T., Cusick, A., Riley, Z.L., Sunkin, S.M., Bernard, A., et al. (2008). Genomic anatomy of the hippocampus. Neuron *60*, 1010–1021.

Thorndike, E. (1898). SOME EXPERIMENTS ON ANIMAL INTELLIGENCE. Science *7*, 818–824.

Thorne, F.C. (1953). Operational concepts in clinical psychology and medicine. J. Clin. Psychol. *9*, 137–142.

Tronson, N.C., and Taylor, J.R. (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. Nat. Rev. Neurosci. *8*, 262–275.

Uchida, S., and Yoshida, H. (1990). [Progress in the study of muscarinic acetylcholine receptors; establishment of the subtypes or subgroups]. Nihon Yakurigaku Zasshi Folia Pharmacol. Jpn. *95*, 7–14.

Usdin, T.B., Eiden, L.E., Bonner, T.I., and Erickson, J.D. (1995). Molecular biology of the vesicular ACh transporter. Trends Neurosci. *18*, 218–224.

Valjent, E., Corbillé, A.-G., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., and Girault, J.-A. (2006). Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 2932–2937.

Walz, R., Roesler, R., Barros, D.M., de Souza, M.M., Rodrigues, C., Sant'Anna, M.K., Quevedo, J., Choi, H.K., Neto, W.P., DeDavid e Silva, T.L., et al. (1999). Effects of post-training infusions of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor into the hippocampus or entorhinal cortex on short- and long-term retention of inhibitory avoidance. Behav. Pharmacol. *10*, 723–730.

Wang, C.-L., Tang, F.-L., Peng, Y., Shen, C.-Y., Mei, L., and Xiong, W.-C. (2012). VPS35 regulates developing mouse hippocampal neuronal morphogenesis by promoting retrograde trafficking of BACE1. Biol. Open *1*, 1248–1257.

Wang, H.Y., Lee, D.H., D'Andrea, M.R., Peterson, P.A., Shank, R.P., and Reitz, A.B. (2000). beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. J. Biol. Chem. *275*, 5626–5632.

Wevers, A., Monteggia, L., Nowacki, S., Bloch, W., Schütz, U., Lindstrom, J., Pereira, E.F., Eisenberg, H., Giacobini, E., de Vos, R.A., et al. (1999). Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the cerebral cortex in Alzheimer's disease: histotopographical correlation with amyloid plaques and hyperphosphorylated-tau protein. Eur. J. Neurosci. *11*, 2551–2565.

Winocur, G. (1990). Anterograde and retrograde amnesia in rats with dorsal hippocampal or dorsomedial thalamic lesions. Behav. Brain Res. *38*, 145–154.

Yao, Y., Li, W., Wu, J., Germann, U.A., Su, M.S.S., Kuida, K., and Boucher, D.M. (2003). Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 12759–12764.

Yoon, S., and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. Growth Factors Chur Switz. *24*, 21–44.

Yuan, L.-L., Adams, J.P., Swank, M., Sweatt, J.D., and Johnston, D. (2002). Protein kinase modulation of dendritic K+ channels in hippocampus involves a mitogen-activated protein kinase pathway. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *22*, 4860–4868.

van der Zee, E.A., and Luiten, P.G. (1999). Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. Prog. Neurobiol. *58*, 409–471.

Zhai, S., Ark, E.D., Parra-Bueno, P., and Yasuda, R. (2013). Long-distance integration of nuclear ERK signaling triggered by activation of a few dendritic spines. Science *342*, 1107–1111.

Zhang, W., Basile, A.S., Gomeza, J., Volpicelli, L.A., Levey, A.I., and Wess, J. (2002). Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *22*, 1709–1717.

Zornetzer, S., Lipton MA, DiMascio A, and Killam KF (1978). Neurotransmitter modulation and memory: a new neuropharmacological phrenology? Psychopharmacology: a generation of progress. (New York: Raven Press).