



Dinámica del citoesqueleto de actina en procesos de memoria de miedo en el ratón *Mus musculus*

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

Lic. Candela Medina

Director de Tesis: Dr. Arturo Romano

Directora asistente de Tesis: Dra. Verónica de la Fuente

Consejera de estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo:

Laboratorio de Neurobiología de la Memoria,
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires.

Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIByNE),
CONICET.

Fecha y lugar de defensa: Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 27 de octubre de 2020

Dinámica del citoesqueleto de actina en procesos de memoria de miedo en el ratón *Mus musculus*

Resumen

La memoria de largo término ha sido asociada con cambios morfológicos en las espinas dendríticas, que están íntimamente relacionados a cambios en la eficacia sináptica. Considerando el rol esencial de la dinámica del citoesqueleto en la morfología de las espinas, resulta interesante estudiar el papel del factor desestabilizante ADF/Cofilina y la quinasa que inhibe su actividad (LIMK) en diferentes procesos de memoria. En esta Tesis de doctorado, utilizando el paradigma de condicionamiento de miedo contextual en ratón, encontramos que la inducción farmacológica de la despolimerización de filamentos de actina a través de la inhibición de LIMK en el hipocampo dorsal causa un impedimento en los procesos de consolidación y reconsolidación de la memoria, pero no así en su extinción. Sin embargo, la disrupción farmacológica directa de la dinámica del citoesqueleto de actina permite tanto facilitar o impedir la formación de una memoria de extinción. Además, luego de la reactivación de la memoria, la actividad desestabilizante de Cfl1 sobre el citoesqueleto de actina se inhibe, a la vez que disminuye la cantidad de su ARN mensajero disponible para ser traducido en el neuropilo de la subárea CA1 en el hipocampo dorsal. Sin embargo, la tendencia observada para el ARN mensajero de actina es opuesta, ya que éste aumenta su disponibilidad luego de la reactivación de la memoria de miedo.

Sumado a lo anterior, un impedimento en el proceso de reconsolidación de la memoria de miedo contextual se traduce en una disminución en la densidad y el diámetro de la cabeza de espinas maduras en dendritas apicales de neuronas piramidales de la subárea CA1 en el hipocampo dorsal, relacionadas al proceso de estabilización de la memoria a largo término.

Nuestros resultados permiten un mejor entendimiento del rol de LIMK, ADF/Cofilina y la dinámica del citoesqueleto de actina en los cambios funcionales y morfológicos que están involucrados en la plasticidad sináptica de la traza mnésica.

Palabras clave:

consolidación; reconsolidación; extinción; ADF/Cofilina; LIMK; memoria de miedo

Actin cytoskeleton dynamics in fear memory processes in the mouse *Mus musculus*

Abstract

Long-term memory has been associated with morphological changes in dendritic spines, which, in turn, tightly correlate with changes in synaptic efficacy. Given spine morphology depends heavily on actin cytoskeleton dynamics, it is relevant to study the role of the destabilizing factor ADF/Cofilin and its modulating kinase (LIMK) in different memory processes. In this PhD thesis, using a contextual fear conditioning paradigm in mice, we found that pharmacological induction of depolymerization of actin filaments through the inhibition of LIMK in dorsal hippocampus causes an impairment in memory reconsolidation, as well as in memory consolidation, but does not impact its extinction. Nevertheless, the formation and consolidation of an extinction memory can either be facilitated or impaired by direct pharmacological disruption of actin cytoskeleton dynamics. On top of that, after memory reactivation the destabilizing activity of ADF/Cofilin is inhibited and its mRNA is downregulated in CA1 neuropil of dorsal hippocampus. In contrast, the tendency for actin mRNA goes in the opposite direction, given this mRNA is upregulated after memory reactivation.

Moreover, an impairment in the process of memory reconsolidation produced a downregulation in density and head diameter of mature apical dendritic spines in pyramidal neurons of dorsal hippocampus CA1.

Our results lead to a better understanding of the role of LIMK, ADF/Cofilin and actin cytoskeleton dynamics in the morphological and functional changes underlying the synaptic plasticity of the memory trace.

Key words:

consolidation; reconsolidation; extinction; ADF/Cofilin; LIMK; fear memory

Agradecimientos

A Arturo, por no sólo darme la oportunidad de hacer investigación en su laboratorio, sino darme toda su confianza y la libertad para plantear mis ideas. Por su gran generosidad.

A Vero, por enseñarme una gran parte de todo lo que sé y siempre querer enseñarme más. Por las charlas interminables en el bioterio, durante las idas y vueltas a FLENI, sobre un café en las mesitas, y en tantos otros lugares. Por transmitirme la necesidad de ser rigurosa en ciencia y, a la vez, inculcarme el amor a la misma.

A Santi, por la magia de los cafés fríos, por siempre llenar el *locker* con cosas dulces, por empezar nuestros *westerns* antes de que llegue al labo y, principalmente, por la infinita ayuda y apoyo sin los cuales esta Tesis hubiese sido mucho pero mucho más difícil.

A Rami y Marian, por las discusiones, charlas y múltiples ayudas con los *westerns*, los EMSAs y la vida de laboratorio... y no tanto.

A todo el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria, especialmente a Euge, por las charlas y sonrisas; a Ángel, por toda la sabiduría, la ayuda y los mates; y a Rodri, por las discusiones, charlas y también muchos mates.

A Sol y Johannes, por la mano enorme, el interés en mi trabajo y los viajesitos flotando en el Rin. A Erin, Susu y todo el laboratorio Schuman por la (inesperada) calidez alemana, por hacer de Frankfurt una segunda casa.

A la UBA y el CONICET, por darme oportunidad y sustento para formarme desde los 12 años.

A Fer y todo el laboratorio Locatelli, por estar siempre atentos a acompañarme en el instituto, ya sea con una charla en las mesitas del segundo piso, una picada en el laboratorio o un grandioso asado de fin de año. Siento su compañía cerca siempre.

A las del Pelle, por bancarme desde los asientos contables hasta las margaritas tamaño familiar. Gracias por las preguntas de traspelo sobre el pelo de los delfines también.

A les (siempre) “cuasi” licenciades, por las noches de desvela estudiando y las siestas al lado del río entre clases. A Chris y Sil, por las charlas con mate entre experimentos y por las charlas con fernet después de ellos.

A las de El Piso, por las horas y horas de improvisación y apoyo, creando mil universos posibles (pero jamás haciendo de animales) que me dieron la espalda más grande del mundo para bancarme lo que venga.

A Cata y Clarita, por las sonrisas, las piruetas y las videollamadas más felices.

A las Golondrinas por la contención y el empuje entre vuelta y vuelta. La vida me dio una segunda familia de pájaras y yo no podría estar más agradecida.

A Mai por las hojas escritas, las hojas leídas, las hojas verdes y por acompañarme siempre con tanto cariño. Al lado tuyo, amiga, todas las puertas parecen franqueables y ningún desafío es muy grande.

A Jorge y Haydée, por la oreja siempre atenta y las manos siempre listas para escuchar y solucionar lo que sea. Pero, principalmente, gracias por los deliciosos asados y las tardes hermosas.

A los Guerreros por las infinitas enseñanzas sobre ciencia, los asados, las salidas sin anillos, las coquitas en las mesitas y todo el enorme empuje dorado.

A mi Papá, a mi Mamá y a Mori, por el amor, el interés, la paciencia y el apoyo que me permitieron encarar todos los desafíos que implicó este trabajo. De ustedes aprendí la perseverancia, cualidad que el doctorado terminó de marcar a fuego.

A Martín, por ser un compañero increíble en ésta y en mil más. Porque ya sea en el laboratorio un sábado a la mañana manipulando cangrejos o comiendo algo en una calle cualquiera de Vietnam, todo es mejor al lado tuyo.

ella se desnuda en el paraíso
de su memoria
ella desconoce el feroz destino
de sus visiones
ella tiene miedo de no saber nombrar
lo que no existe

Alejandra Pizarnik
Árbol de Diana (1962)

Publicaciones

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

Medina C, de la Fuente V, tom Dieck S, Nassim-Assir B, Dalmay T, Bartnik I, Lunardi P, de Oliveira Alvares L, Schuman EM, Letzkus JJ, Romano A. *LIMK, Cofilin 1 and actin dynamics involvement in fear memory processing*. Neurobiol. Learn. Mem. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107275>

de la Fuente V, Medina C, Falasco G, Urrutia L, Kravitz AV, Urbano FJ, Vázquez S, Pedreira ME, Romano A. *Whole brain study of memory reconsolidation in mice: lateral neocortex relevance in the processing of information after retrieval of fear memories*. Sci. Rep. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48340-9>

Lunardi P, Sachser RM, Sierra RO, Pedraza LK, Medina C, de la Fuente V, Romano A, Quillfeldt JA, de Oliveira Alvares L. *Effects of hippocampal LIMK inhibition on memory acquisition, consolidation, retrieval, reconsolidation, and extinction*. Mol Neurobiol. 2017 Jan 13. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0361-x>

Índice

Resumen.....	1
Abstract	2
Agradecimientos	3
Publicaciones.....	6
Abreviaturas.....	10
Capítulo 1. Introducción General	12
1.1 El aprendizaje y la memoria	12
1.2 El condicionamiento clásico o <i>pavloviano</i> de miedo	12
1.3 Sustrato neurobiológico del aprendizaje y la memoria	14
1.4 Fases de la memoria.....	16
1.4.1 Consolidación	16
1.4.2 Labilización y Reconsolidación	17
1.4.3 Extinción.....	20
1.5 El rol del Hipocampo en el aprendizaje y la memoria.....	22
1.6 Espinas dendríticas, plasticidad y memoria	25
1.6.1 Relación entre la morfología de las espinas dendríticas y su función	27
1.6.2 Morfología de las espinas dendríticas en el aprendizaje y la memoria	28
1.7 Dinámica del citoesqueleto de actina neuronal.....	29
1.7.1 ADF/Cofilina como factor regulador de la dinámica del citoesqueleto	31
1.7.1 Rol de ADF/Cofilina y LIMK en aprendizaje y memoria.....	34
Hipótesis y Objetivos.....	37
Hipótesis general.....	37
Hipótesis 1	37
Hipótesis 2	38
Hipótesis 3.....	38
Capítulo 2. Materiales y Métodos	39
2.1 Sujetos experimentales.....	39
2.1.1 Ratones <i>wild-type</i>	39
2.1.2 Ratones transgénicos Thy1-EGFP y su genotipificación	39
2.2 Cirugía de implantación de cánulas en el hipocampo dorsal.....	41
2.3 Inyecciones agudas	42
2.4 Drogas	42
2.5 Aparato de condicionamiento y protocolos experimentales.....	44

2.6 Extractos sinaptoneurosomales	46
2.7 Ensayo bioquímico de <i>Western Blot</i>	47
2.8 Cultivo primario de hipocampo y corteza cerebral.....	49
2.9 Hibridación <i>in situ</i> de alta definición.....	49
2.9.1 En células en cultivo	50
2.9.2 En secciones cerebrales	50
2.10 Inmunomarcación	51
2.10.1 Inmunocitoquímica	51
2.10.2 Inmunohistoquímica	52
2.11 Estudio sobre la densidad y morfología de las espinas dendríticas.....	53
2.11.1 Obtención de las secciones cerebrales	53
2.11.2 Adquisición de imágenes confocales de fluorescencia	53
2.11.3 Análisis de la densidad y morfología de las espinas dendríticas.....	54
2.12 Análisis de datos y estadística.....	55
Capítulo 3. Estudio del rol de LIMK, Cfl1 y la dinámica del citoesqueleto de actina en consolidación, labilización, reconsolidación y extinción de la memoria de miedo en el ratón <i>Mus musculus</i>	56
3.1 Labilización y Reconsolidación de la memoria	56
3.1.1 Nivel de activación de Cfl1 en la Labilización/Reconsolidación de la memoria.....	56
3.1.2 Perfil del ARNm de Cfl1 y β -actina en la subárea CA1 hipocampal luego de la reactivación de la memoria.....	61
3.1.3 LIMK en la Reconsolidación de la memoria	66
3.2 Consolidación de la memoria.....	74
3.2 Extinción de la memoria.....	80
3.2.1 LIMK en la extinción de la memoria.....	81
3.3.2 La dinámica del citoesqueleto de actina en la extinción de la memoria	83
Capítulo 4. Caracterización del perfil de ARNm de Cfl1 y Actb luego de la activación celular en cultivo primario de hipocampo y corteza cerebral	89
4.1 Perfil de ARNm de Cfl1	91
4.2 Perfil de ARNm de Actb.....	95
Capítulo 5. Estudio sobre la densidad y morfología de las espinas dendríticas de la subárea CA1 hipocampal luego de la reactivación de la memoria de miedo	99
5.1 Análisis en espinas dendríticas basales.....	107
5.2 Análisis en espinas dendríticas apicales.....	115
Capítulo 6. Discusión general.....	121
6.1 Rol de ADF/Cofilina y LIMK hipocampal en labilización y reconsolidación de la memoria	121

6.2 ADF/Cofilina y LIMK.....	122
6.2.1 Diferenciación entre ADF y Cfl1	122
6.2.2 Rol dual de ADF/Cofilina	124
6.2.3 Relación entre LIMK y la dinámica del citoesqueleto de tubulina	125
6.3 Rol de la actividad de LIMK en los procesos de consolidación y reconsolidación de la memoria	127
6.4 LIMK y dinámica del citoesqueleto de actina en la extinción de la memoria	128
6.5 Efecto de la estabilización del citoesqueleto de actina sobre la extinción de la memoria	131
6.6 Plasticidad en el perfil de ARNm de Actb a partir de la activación neuronal e inhibición de la actividad de LIMK	133
6.7 Relación entre LTP y procesos mnésicos.....	134
6.8 Plasticidad en la densidad y morfología de espinas dendríticas en el proceso de reconsolidación de la memoria	135
6.9 Conclusiones finales	139
Referencias.....	142

Abreviaturas

aCSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i> ; fluido cerebroespinal artificial
Actb	β -actina
AMPA-R	receptor de L-glutamato de tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
Arc	proteína asociada al citoesqueleto regulada por la actividad
BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro
BMS	BMS-5
CAMKII	calcio/Calmodulina Proteína quinasa II
CaN	calcineurina
Cfl1	cofilina 1
CR	<i>conditioned response</i> ; respuesta condicionada
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein 1</i>
CS	<i>conditioned stimulus</i> ; estímulo condicionado
CST	Cell Signaling Technology
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	<i>diethylpyrocarbonate</i> ; dietilpirocarbonato
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ; ácido etilendiaminotetraacético
eGFP	proteína fluorescente verde mejorada
EXT	extinción
GAPDH	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> ; gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Jas	jasplakinolide
LatA	latrunculina a
LDS	<i>lithium dodecyl sulfate</i> ; dodecyl sulfato de litio
LIMK	<i>LIM kinase</i> ; LIM quinasa
LTP	<i>long-term potentiation</i> ; potenciación a largo término
MC	medio de cultivo
Na	<i>naïve</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i> ; factor nuclear de células T activadas

NFκB	factor nuclear κB
NMDA-R	receptor de L-glutamato de tipo N-metyl-D-aspartato
NR	grupo de animales no re-expuestos al contexto de entrenamiento
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; <i>buffer salino fosfato</i>
PCR	reacción en cadena de la enzima polimerasa
PFA	paraformaldehído
PKMζ	proteína quinasa Mζ
PMSF	<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> ; fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PP1	<i>protein phosphatase 1</i> ; proteína fosfatasa 1
pre-TR	pre-entrenamiento
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i> ; fluoruro de polivinilideno
RE	re-exposición
Re-Exp	grupo de animales re-expuestos al contexto de entrenamiento
SCBT	santa cruz biotechnology
SDS PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> ; electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SEM	<i>standard error of the mean</i> ; error estadístico estándar
SSH	slingshot fosfatasa
STE	<i>Sodium Chloride-Tris-EDTA buffer</i>
SySy	synaptic systems
TBS	<i>tris-buffered saline</i> ; <i>buffer salino con tris</i>
TR	entrenamiento
TS	evaluación
TTBS	<i>tween 20 tris-buffered saline</i> ; <i>buffer salino con tris y tween 20</i>
TTX	tetrodotoxina
UR	<i>unconditioned response</i> ; respuesta incondicionada
US	<i>unconditioned stimulus</i> ; estímulo incondicionado
Veh	solución vehículo
zif268	EGR-1, proteína de respuesta de crecimiento temprano 1

Capítulo 1. Introducción General

1.1 El aprendizaje y la memoria

El aprendizaje y la memoria son habilidades que permiten a los animales desarrollarse y comprender al ambiente que les rodea, relacionarse con sus pares y ubicarse en tiempo y espacio. Es decir, vivir. Específicamente a los seres humanos, pero también a muchas otras especies animales, los procesos de aprendizaje y memoria nos dan la capacidad de adquirir información del medio ambiente y, de esta manera, formar y reformar nuestras distintas maneras de comportarnos en relación a él. Estos procesos, siendo claves en la supervivencia de nuestra especie, han sido objeto de incontables mitos, leyendas, escritos e interpretaciones a lo largo de la historia humana. La gravedad de las consecuencias que producen diferentes impedimentos en los procesos mnésicos es, tal vez, la razón principal de tal cantidad de elucubraciones sobre estos conceptos. Las enfermedades, afecciones y condiciones que nos limitan en nuestra capacidad de recordar y aprender información son devastadoras para cualquier animal que viva en sociedad o se desarrolle en un medioambiente siempre cambiante.

El concepto de aprendizaje refiere al proceso por el cual el individuo adquiere información nueva que puede permitirle cambiar su comportamiento en base a la experiencia. Por otro lado, a la capacidad de que esa información perdure y sea accesible en el tiempo, guiando el comportamiento del individuo, se le llama memoria [1].

1.2 El condicionamiento clásico o *pavloviano* de miedo

El aprendizaje asociativo es un término que se utiliza para describir a una variedad de aprendizajes que son estudiados en humanos y otros animales [2]. Este tipo de estudio comenzó oficialmente en los inicios del siglo XX con los trabajos de Thorndike, en los Estados Unidos [3], y Pavlov, en Rusia [4], aunque había sido descrito por filósofos de la Antigua Grecia [5]. En pocas palabras, es el proceso por el cual se asocian dos estímulos, uno incondicionado (US, por su nombre en inglés *unconditioned stimulus*) y otro condicionado (CS, por su nombre en inglés *conditioned stimulus*). El primer tipo de estímulo ya posee una valencia determinada para el animal previo a la asociación y

genera una respuesta incondicionada (UR, por su nombre en inglés *unconditioned response*). En cambio, el segundo tipo de estímulo es considerado “neutro” para el animal. Aunque es improbable que algún estímulo, si es perceptible para el animal, sea considerado “neutro”, se lo denomina de esta manera para denotar que, previo al condicionamiento asociativo, no genera la misma respuesta incondicionada que el otro tipo de estímulo. Bajo condiciones de entrenamiento que establezcan una relación de contingencia entre el CS y el US (que ya han sido descritas en detalle en la bibliografía [6–10]), se forma una asociación entre ambos estímulos. El aprendizaje de esta asociación se evidencia cuando, ante la presentación del CS en ausencia del US, se observa una respuesta igual o similar a la UR. De esta manera, el comportamiento del animal se modifica a partir de la experiencia, generando una respuesta condicionada (CR, por su nombre en inglés *conditioned response*) ante la presentación del CS [10–12].

Es importante destacar que el concepto de CS abarca un abanico enorme de posibilidades en su presentación, ya que puede estar circunscripto a un evento de cierta modalidad (tono sonoro, encendido de una luz de cierto color, por nombrar algunos ejemplos) que sucede en un momento específico del entrenamiento y tiene una duración determinada, o puede comprender un conjunto de elementos de distintas modalidades sensoriales que conforman un contexto específico [9, 13, 14]. Este último es, precisamente, el caso del condicionamiento de miedo contextual que va a ser utilizado como paradigma a lo largo de esta Tesis.

Este paradigma consiste en la asociación de un contexto específico que es novedoso para el animal (CS) con la presentación contingente de uno o varios *shocks* eléctricos de intensidad moderada (US). El estímulo incondicionado, en este caso, genera una respuesta de miedo (UR) que se expresa de manera conspicua en el comportamiento del individuo. Así, en una instancia posterior, ante la presentación del contexto en ausencia del *shock* eléctrico, el animal expresa un comportamiento de miedo (CR). Este cambio en el comportamiento del animal es la característica que define al aprendizaje y, a la vez, será nuestra medida operativa de memoria, en el caso de evaluarla a lo largo del tiempo. Es decir, mientras el animal, ante la presentación del contexto de entrenamiento en ausencia del *shock* eléctrico, exprese un comportamiento de miedo identificable como tal, consideraremos que la asociación entre ambos estímulos continúa vigente [9].

De esta manera, el condicionamiento de miedo contextual se presenta como un modelo de aprendizaje emocional en animales y, por lo tanto, una herramienta muy útil para dilucidar los circuitos neuronales, el rol de las estructuras cerebrales y las bases moleculares y celulares que subyacen a los diferentes procesos de memoria (revisado en [15–22]).

1.3 Sustrato neurobiológico del aprendizaje y la memoria

A partir de los trabajos de Ramón y Cajal [23], luego pasando por los de Konorski [24], Hebb [25], Milner [26] y Stent [27], hasta la actualidad, sigue vigente el postulado que sostiene que el aprendizaje se basa en cambios sobre las conexiones entre neuronas y, a su vez, la memoria comprende la perdurabilidad de estos cambios en el tiempo, formando lo que se conoce como “traza mnésica” o cambios sinápticos que dan cuenta de esa experiencia [1, 28–32]. A lo largo de las últimas décadas, la hipótesis que plantea a la plasticidad sináptica como el mecanismo biológico subyacente a los procesos de aprendizaje y la memoria tomó considerable asidero tanto en el campo de la neurobiología como en el de la psicología, gracias al advenimiento de sofisticadas técnicas fisiológicas que ayudan a encontrar el sustrato neuronal de los cambios observados en el comportamiento [33]. Varias de estas técnicas, como los registros electrofisiológicos realizados *ex vivo* e *in vivo*, le dieron mucho sustento a la hipótesis, al demostrar una relación entre la formación de la memoria y cambios en la eficiencia sináptica. Estas modificaciones en la transmisión sináptica son bidireccionales, al permitir el aumento o disminución de la fuerza de las conexiones, y se denominaron Potenciación de Largo-Término (LTP, por su nombre en inglés *Long-Term Potentiation*) y Depresión de Largo-Término (LTD, por su nombre en inglés *Long-Term Depression*), respectivamente. Estos procesos implican ajustes tanto pre- como postsinápticos, luego de la activación neuronal [28, 34–36]. El tipo de LTP más estudiado en diferentes especies animales es el dependiente de la activación de los receptores de L-glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA-R), ya que estos receptores son, a su vez, canales iónicos cuya apertura es dependiente de la unión del ligando y del nivel de despolarización de la membrana. Esta característica brinda a este tipo de receptores la capacidad de “detección de coincidencias”, cobrando gran relevancia en procesos mnésicos asociativos [28]. De esta

manera, cuando el receptor se une al ligando en presencia de una despolarización de la membrana sináptica, se abre el canal, permitiendo el flujo de cationes. Entre estos cationes, está el calcio, cuya entrada a la postsinapsis induce la activación de vías de señalización que regulan variados procesos moleculares y metabólicos, tales como el tráfico de receptores desde o hacia el compartimiento sináptico, cambios en la conductancia de receptores anclados a membrana, modulación presináptica de la liberación de neurotransmisores y plasticidad estructural. La regulación de estos procesos se traducirá finalmente en un cambio en la eficiencia sináptica de las conexiones involucradas. [37–39].

El proceso de LTP es complejo e involucra gran cantidad de mecanismos celulares y moleculares que permiten la plasticidad necesaria, por lo tanto, se suelen diferenciar dos etapas generales: LTP temprano y tardío. Esta clasificación responde a la dependencia de síntesis de proteínas en las neuronas por parte de la etapa tardía, a diferencia de la temprana, durando la primera unas horas, como máximo, y la segunda hasta semanas, o inclusive más tiempo [40, 41]. A su vez, la etapa tardía puede subdividirse en dos etapas más específicas: una inicial, dependiente de síntesis de proteínas, pero no del proceso de transcripción, y una final, dependiente de ambos procesos celulares [42, 43]. La subetapa inicial, independiente del proceso de transcripción de ácido ribonucleico mensajero (ARNm), es posible gracias a la presencia de maquinaria traduccional en los compartimentos sinápticos, en donde se producen las conexiones neuronales, permitiendo la síntesis proteica de manera local y sin necesidad de la generación de nuevas moléculas de ARNm en el núcleo [44]. Un estímulo neuronal lo suficientemente grande puede generar la activación y traslocación al núcleo de factores de transcripción constitutivos (CREB, NFκB, entre otros) e inducibles (zif268, c-fos, junB, para nombrar algunos), activando el proceso de transcripción de numerosos genes dentro de los cuales se destacan BDNF, PKMζ, CAMKII y Arc por su rol en el mantenimiento a largo término del LTP [45–51]. Los procesos moleculares neurobiológicos que se desencadenan a partir de la formación y el mantenimiento de una memoria de largo término no estarán descritos en esta Tesis en toda su complejidad, ya que no es su objetivo. Sin embargo, es importante destacar que la vida media de las proteínas que son responsables de esos cambios es relativamente corta [52], por lo que toma especial relevancia el hecho de que la plasticidad neuronal necesaria para el

mantenimiento de una memoria se traduce en cambios estructurales en las neuronas involucradas [53, 54]. Dado que la relación entre estos cambios estructurales y los procesos mnésicos son el tema central de este trabajo, me extenderé sobre su relación en la [sección 1.6](#) de este Capítulo.

1.4 Fases de la memoria

Para facilitar la disección de los procesos mnésicos estudiados desde hace más de un siglo en el campo de la neurobiología de la memoria se han descrito diferentes fases de la misma a lo largo del tiempo y, aún hoy, esos conceptos se mantienen vigentes. Se describirán a continuación las diferentes fases de la memoria que son relevantes para el presente trabajo.

1.4.1 Consolidación

En el año 1900, Müller y Pilzecker propusieron la hipótesis de la consolidación de la memoria, que sostiene que la información adquirida recientemente se encuentra codificada en el cerebro de manera lábil o frágil, necesitando de cierta cantidad de tiempo para su estabilización [55]. A lo largo de las décadas, se encontraron diversas evidencias en variedad de especies diferentes que apoyaron esta hipótesis inicial, por lo que puede deducirse que, evidentemente, el proceso de consolidación de la memoria provee de una ventaja adaptativa para los animales [56–60]. En la actualidad, se cree que este lapso de tiempo necesario para que una memoria se establezca da cuenta de los procesos moleculares y celulares de plasticidad neuronal involucrados y permite, por otro lado, la modulación de la fuerza de esa memoria a través de procesos endógenos generados por la experiencia [61–64].

Sin embargo, no todos los tipos de memoria se estabilizan con el tiempo. A partir de un evento específico que sea relevante para el individuo, se pueden generar varios tipos de memoria asociadas, dentro de las cuales destacaré dos: las denominadas de “largo término”, es decir, memorias que perduran en el tiempo, y las de “corto término”, que tienen una vida media menor a las anteriores. Es importante aclarar diferentes cuestiones respecto a esta distinción. En una primera instancia, ambos tipos de memoria se diferencian en su duración debido a sus requerimientos moleculares: mientras que las memorias de corto término dependen de diferentes vías de señalización celular (como

PKA y MAPK), permitiendo que una memoria se mantenga a largo término es necesaria, no sólo la actividad inicial de PKA, sino también los procesos de transcripción y de síntesis proteica. Por otro lado, al contrario de la idea de “conversión” de una memoria de corto término en una de largo término con la que se trabajaba unos años atrás, hoy tenemos suficiente evidencia para pensar que la formación de ambos tipos de memorias se produce de manera paralela, es decir, es posible interferir con el mantenimiento de una de ellas y que la otra permanezca intacta [1, 65–71]. Por último, cabe destacar que si bien los conceptos de corto y largo término son relativos al animal modelo de estudio, en el presente trabajo se considerará que una memoria de largo término se corresponde con un período mayor a 24 horas de duración, ya que es una convención usualmente utilizada en el campo de estudio de la neurobiología de la memoria en general, y en roedores en particular [32].

1.4.2 Labilización y Reconsolidación

Anteriormente, mencioné que la memoria está definida como la capacidad de adquirir nueva información a través del aprendizaje de manera perdurable y capaz de ser accedida en el tiempo [1]. Sin embargo, recuperar información almacenada en la memoria no es un proceso pasivo. Desde la década de 1960 en adelante, muchos trabajos han demostrado que si se aplican tratamientos que interfieren con la formación de una nueva memoria al reactivar una memoria previamente consolidada, ésta podía verse afectada [72–79]. Este fenómeno sugirió que, ciertos recordatorios del evento de aprendizaje pueden inducir un período de desestabilización de la memoria original, requiriendo de un proceso de reconsolidación que permita estabilizar esta traza de memoria nuevamente [80–82].

Este estado lábil puede producirse por una variedad de recordatorios del evento de aprendizaje, que dependen típicamente del paradigma utilizado. Sin embargo, debe cumplirse una condición para que la memoria pueda ser reactivada y se vuelva nuevamente lábil: es necesario que el recordatorio incluya nueva información importante para el animal. Las características novedosas del recordatorio generan, entonces, un error de predicción entre la información guardada de antemano y la situación que vive el animal durante la presentación del recordatorio. Este error de predicción es el que

desemboca en la labilización de la traza mnésica [83–89]. Si, por el contrario, el recordatorio no difiere notablemente del evento de aprendizaje inicial, el individuo podrá acceder a la memoria del evento en cuestión, pero esta evocación no implicará una labilización y posterior reconsolidación de la memoria original. Teniendo en consideración que, frente a la labilización de una memoria consolidada, para que la traza perdure, se hace necesario un costoso proceso de reconsolidación, resulta adaptativo que ésta no se produzca si no hay información novedosa para integrar. Así, podemos ver a los procesos de labilización y reconsolidación como la herramienta que poseen los animales para adaptarse al ambiente que está en constante cambio, permitiendo que actualice la información guardada previamente al modificar la fuerza o las características de una memoria específica. Es decir, estos procesos permitirían la plasticidad comportamental de los individuos [77, 81, 90].

Además de contener un error de predicción, el recordatorio debe cumplir ciertas condiciones para generar, efectivamente, la labilización y reconsolidación de la memoria original. Tal es así que, variando ciertos parámetros, como la duración del recordatorio, la edad o la fuerza de la memoria original, un error de predicción puede desencadenar o no la labilización de la traza original (revisado en [90]). En el caso que compete al trabajo realizado en esta Tesis, resulta importante destacar las posibilidades que permite la modificación de la duración del recordatorio del evento de aprendizaje. En el paradigma de miedo contextual en ratón, el recordatorio más utilizado es, justamente, el contexto de entrenamiento (CS) en ausencia de *shock* eléctrico (US). De esta manera, suponemos que cuando el animal es introducido al contexto en el que previamente fue condicionado, predice la ocurrencia del *shock* eléctrico. Si esto no ocurre, se produce un error en su predicción, desencadenando el proceso de labilización de la memoria original, que requiere su posterior re-estabilización a través de la reconsolidación. Sin embargo, aunque el concepto de “suficiente tiempo” es relativo a cada protocolo de condicionamiento, en la mayoría de los casos (incluido el presente trabajo), una re-exposición por el lapso de un minuto al contexto de entrenamiento produce la evocación de la memoria (acceso a la información guardada) sin provocar los procesos de labilización y reconsolidación de la misma. En cambio, si el recordatorio supera los tres minutos, la memoria original se desestabiliza y precisa de su reconsolidación para volver a almacenarse a largo término. En el trabajo realizado para esta Tesis, en base a la

bibliografía, cuando el protocolo incluyó una sesión de reactivación de la memoria con el objetivo de evaluarla y, a la vez, desencadenar los procesos de labilización y reconsolidación, se re-expuso a los animales al contexto de entrenamiento por el lapso de 5 minutos [91, 92]. Cuando el lapso de tiempo se extiende de manera considerable (30 minutos) o, en su defecto, se realizan sucesivas re-exposiciones de corta duración al contexto de entrenamiento, se puede producir la extinción de la memoria original. Este proceso mnésico será debidamente tratado en la [siguiente sección](#).

Cabe destacar que los procesos de labilización y reconsolidación de la memoria son procesos activos y poseen características moleculares y celulares que los hacen únicos, características que los diferencian entre sí y de otros procesos mnésicos, tales como la consolidación [80, 82, 93]. Para poder diferenciar si un mecanismo molecular está implicado en alguno o ambos procesos mnésicos es necesario entender qué consecuencias podría traer el impedimento de cada uno de estos procesos para el mantenimiento de la memoria original. Como se puede observar en la **FIGURA 1**, para que una memoria se labilice es necesario un recordatorio que genere un error de predicción y permita la reactivación de la traza mnésica. A su vez, si una traza de memoria se encuentra en estado lábil y no hay ningún tipo de intervención, procederá a re-estabilizarse a partir del proceso de reconsolidación. En cambio, si se produce cualquier tipo de bloqueo de este último proceso mnésico (ya sea de manera farmacológica, a través de la administración de terapia electroconvulsiva, ablación de áreas cerebrales involucradas, inhibición específica de neuronas involucradas en la traza a través de optogenética o cualquier otra técnica) resultará en una memoria debilitada de manera parcial o total. De esta manera, una disminución del comportamiento estereotipado de miedo en una sesión posterior de evaluación es indicador de un impedimento en el proceso de reconsolidación de la memoria. Particularmente para el proceso de labilización de la memoria, la evidencia de su bloqueo presenta un desafío mayor. Cuando el objetivo es evaluar si un determinado mecanismo molecular está implicado en el proceso de labilización de la memoria, se debe combinar su bloqueo con un tratamiento que impida la re-estabilización de la memoria original. Esto es debido a que, si efectivamente se produjo un impedimento en el proceso de labilización, ante la nueva presentación del contexto de entrenamiento en la sesión de evaluación, el comportamiento del animal sería consecuencia de la expresión de la memoria original.

En cambio, el no encontrar una disminución del comportamiento estereotipado de miedo en el día de la evaluación, aun habiendo bloqueado la reconsolidación, sería evidencia del bloqueo del proceso de labilización de la memoria. Se vuelve relevante para esta cuestión aclarar que entendemos como expresión de una memoria a la capacidad de los animales para demostrar un cambio en el comportamiento asociado al evento que sucedió en el pasado y creó una traza mnésica [94, 95].

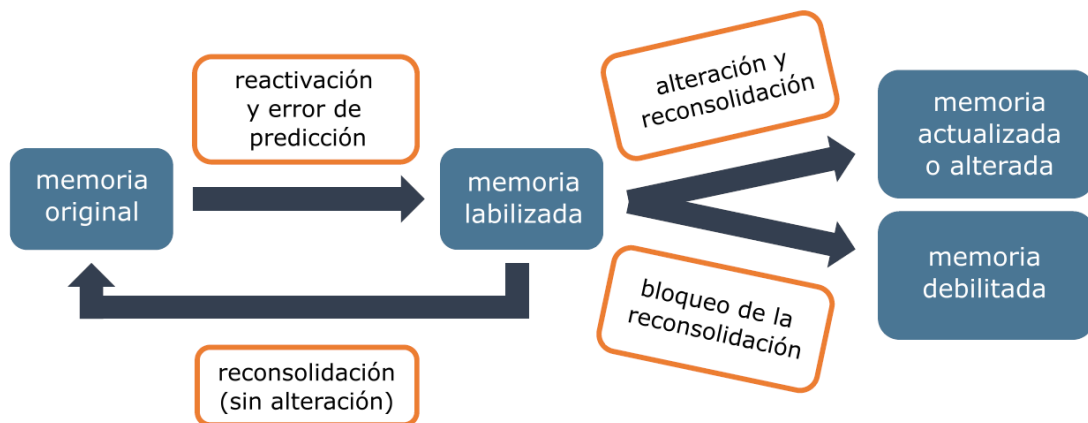


FIGURA 1. Esquema que resume mecanismos de reactivación de la memoria. Una memoria de largo término puede ser labilizada cuando se reactiva a través de un recordatorio con error de predicción. Si se altera esa memoria de alguna manera, ésta puede volver a almacenarse de forma actualizada o alterada, mientras que, si se bloquea su re-estabilización, la memoria puede verse debilitada parcial o totalmente. Sin embargo, si el proceso de reconsolidación se produce sin alteración o bloqueo alguno, la memoria original puede volver a guardarse de forma similar o, inclusive, fortalecerse (Figura adaptada del trabajo de revisión de Sinclair y Barense [87]).

1.4.3 Extinción

Una vez que una memoria fue consolidada, si se presenta el CS como recordatorio del evento de condicionamiento de manera prolongada (o repetida), los animales usualmente reducirán su respuesta estereotipada de miedo. A este proceso, que fue identificado inicialmente por Pavlov [4] y estudiado por Konorski [24], se lo denominó extinción de la memoria. En una primera instancia, el proceso de extinción de la memoria fue descrito como un mecanismo que le sucedía a la memoria original, similar a lo que hoy conocemos que sucede en la reconsolidación en ese sentido, pero que, en este caso, implicaba su olvido. Es decir, que resultaba en el borrado o eliminación de la traza mnésica. Sin embargo, a diferencia del proceso de reconsolidación, el de extinción no es fruto de una modificación de la traza original, sino de una inhibición en su expresión en

el comportamiento del animal, por parte de una nueva memoria [96–101]. La evidencia clara de que la extinción de una memoria no implica su olvido radica en la posibilidad de que la respuesta comportamental vuelva a expresarse, ya sea a partir del paso del tiempo (recuperación espontánea) [97, 98], un cambio en el contexto (*renewal*) [101, 102], la readquisición de la asociación (*saving*) [103, 104] o la re-exposición al US pareado con otro contexto (*reinstatement*) [101]. Por el contrario, el olvido, ya sea de manera activa a través de la activación de vías específicas de señalización celular, o pasiva debido al desuso y atrofia de las conexiones neuronales involucradas, implica la eliminación definitiva de la traza mnésica y, por lo tanto, la imposibilidad de algún tipo de recuperación de la respuesta condicionada [105–109]. El hecho de que la respuesta comportamental en una sesión de evaluación de la memoria luego de su extinción o de un impedimento en el proceso de reconsolidación, sea virtualmente idéntica presenta un problema para los estudios realizados con técnicas exclusivamente farmacológicas y será discutido más adelante en el [Capítulo 6](#).

Sin embargo, a partir de numerosos estudios realizados sobre este proceso mnésico, se conocen cada vez con más detalle los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la formación y mantenimiento de esta nueva traza que inhibe la expresión de la original. Se han evaluado moléculas específicas cuya acción en ciertas áreas cerebrales es necesaria de manera diferencial en los procesos de reconsolidación y extinción de la memoria, permitiendo ir más allá de la mera observación de la respuesta comportamental de los individuos y habilitando una disección más fina y específica de cuál es proceso que está actuando sobre la memoria original. A la vez, se han planteado diferentes hipótesis sobre cuál es y cómo procede efectivamente el mecanismo que determina el “destino” de la memoria original, ya sea hacia su reconsolidación o hacia su extinción [88, 91, 92, 110–112]. Por otro lado, a pesar de que la extinción de una memoria implica la formación y consolidación de una nueva traza mnésica, ambos procesos de consolidación (de la memoria original y de la memoria de inhibición de la respuesta condicionada) comparten algunos mecanismos moleculares y difieren en muchos otros, así como también difieren en áreas cerebrales involucradas [91, 98, 113–115].

1.5 El rol del Hipocampo en el aprendizaje y la memoria

El almacenamiento de una memoria no sucede en un área cerebral específica, sino que reside en las conexiones entre diferentes estructuras que componen al circuito neuronal. Es decir, vías de entrada y salida de información hacia y desde distintos *loci* cerebrales, los cuales varían sustancialmente al evaluar diferentes tipos de memoria [116–119]. En el caso de la memoria de miedo, una estructura clave tanto en su adquisición y consolidación, como en su evocación, es la amígdala (FIGURA 2 A Y C) [15, 120–123]. Es necesario que este conjunto de núcleos neuronales esté intacto para que el animal pueda formar la asociación entre CS y US (revisado en [124, 125]) y, luego, para que pueda evocar y expresar esa traza mnésica. A pesar de que, usualmente, en este tipo de paradigmas de memoria se evalúa un solo -o unos pocos- parámetros comportamentales, la evocación de una memoria de miedo a través de la amígdala implica una respuesta general e inequívoca de miedo, incluyendo cambios en el comportamiento, la liberación de hormonas, un cambio en la presión sanguínea, entre otros [125].

En lo que respecta específicamente al condicionamiento de miedo contextual, la codificación del contexto de entrenamiento (CS) se logra cuando la amígdala y el hipocampo actúan de manera coordinada [125–129]. En el hipocampo, por un lado, se codifica la información sensorial para generar una representación interna del contexto. Esto se logra al permitir al animal explorar por suficiente tiempo el espacio en el que luego sucederá el condicionamiento [129]. Si, en cambio, la contingencia entre CS y US sucede sin una exploración previa del contexto, la asociación entre ambos será pobre o, incluso, inexistente (protocolo de *shock* inmediato [130–133]). Por otro lado, tanto la actividad del hipocampo como de la amígdala forman parte del condicionamiento del animal, es decir, permiten la asociación entre ambos estímulos [134–140]. La comunicación entre ambas áreas del cerebro se produce a través de la vía ventroangular y también se relacionan, de manera indirecta, utilizando como punto de relevo a la corteza entorrinal [119, 141–145].

Al estudiar el rol del hipocampo en el aprendizaje y la formación de una nueva memoria es importante destacar que el concepto de consolidación actualmente se ha dividido en dos procesos que suceden en diferentes escalas espacio-temporales. Primero,

existe lo que se conoce como consolidación celular, refiriéndose a la plasticidad en mecanismos moleculares y celulares necesaria para formar una memoria a largo término (expresión génica, transcripción en el núcleo neuronal, entre otros ya mencionados en la [sección 1.3](#)). Luego, se describe a la consolidación sistémica, o de sistemas, como la reorganización de la información almacenada en diferentes áreas cerebrales, incluyendo a la corteza cerebral. La primera típicamente puede durar horas después del evento de aprendizaje, mientras que la segunda puede durar desde días hasta meses, al implicar plasticidad en diferentes regiones corticales que codifican para el evento de condicionamiento como un todo [32, 146, 147]. A pesar de que los detalles sobre cómo interactúan estos dos procesos de consolidación aún no están del todo claros, hay evidencias que apuntan hacia un rol esencial del hipocampo en la primera fase, la consolidación celular, pero no así para la fase sistémica de la consolidación de memorias contextuales de miedo. Por el contrario, el hipocampo cumpliría un rol importante en la transferencia de información hacia la corteza cerebral durante el sueño [148, 149]. Actualmente se cree que el hipocampo es la estructura cerebral que mantiene inicialmente una traza mnésica y, con el tiempo, el mantenimiento de esta memoria deja de depender del mismo y empieza a reclutarse la actividad de la corteza cerebral para lograrlo. De esta manera, al finalizar la consolidación sistémica de una memoria contextual, su persistencia en el tiempo ya no dependería del hipocampo en ninguna medida y se la denomina remota [54, 126, 150–154]. Sin embargo, hay evidencias que apuntan a que el hipocampo vuelve a ser necesario para la evocación de este tipo de memorias [155, 156].

El hipocampo reside en el lóbulo temporal medial y está dividido en dos regiones sobre su eje dorso-ventral. La región dorsal se encuentra ubicada de forma medial en el cerebro anterior y, a medida que se desarrolla hacia el cerebro posterior, esta estructura se hace cada vez más ventral y lateral. La división se estableció firmemente a partir de un trabajo realizado por Moser y Moser [157], en el que se propone que el hipocampo no actuaría de manera homogénea, sino que su región dorsal estaría involucrada en la cognición y el procesamiento de memorias espaciales, mientras que la ventral sería necesaria para la modulación de respuestas emocionales y de estrés. Para la clasificación se evaluaron evidencias que diferencian ambas regiones en términos de conectividad [158] y funcionalidad [126, 159, 160].

La mayor vía de entrada de información al hipocampo proviene de la corteza entorrinal, que también recibe muchas de sus eferencias. Como se puede observar en la FIGURA 2 B, la formación hipocampal se puede dividir en dos regiones principales: el hipocampo propiamente dicho o *cornu ammonis* (CA), y el giro dentado (DG, por su nombre en inglés *dentate gyrus*). La primera región contiene neuronas piramidales y, a su vez, se subdivide en subáreas: CA1, CA2 y CA3, en base a la ubicación y morfología de sus neuronas y las conexiones con otras estructuras cerebrales. Las neuronas piramidales del hipocampo (CA1-CA3) presentan dendritas apicales y basales, mientras que las neuronas presentes en el DG carecen de dendritas basales. Además de neuronas excitatorias, existen interneuronas que regulan su actividad con axones que se desarrollan de manera ortogonal en cada una de las áreas y presentan diferencias sustanciales en su morfología con respecto a las piramidales [161]. Numerosos estudios han sugerido que las subregiones del hipocampo están involucradas en diferentes mecanismos dentro del procesamiento mnésico (revisado en [162]), incluyendo evidencias de impedimentos observados en el procesamiento de memoria contextuales que, no sólo parecen depender específicamente del hipocampo dorsal, sino que lo hacen más especialmente de la subregión CA1 [163, 164]. Es por eso que en el presente trabajo elegimos el hipocampo dorsal como estructura cerebral a evaluar y, cuando fue posible gracias a las técnicas utilizadas, más específicamente la subárea CA1.

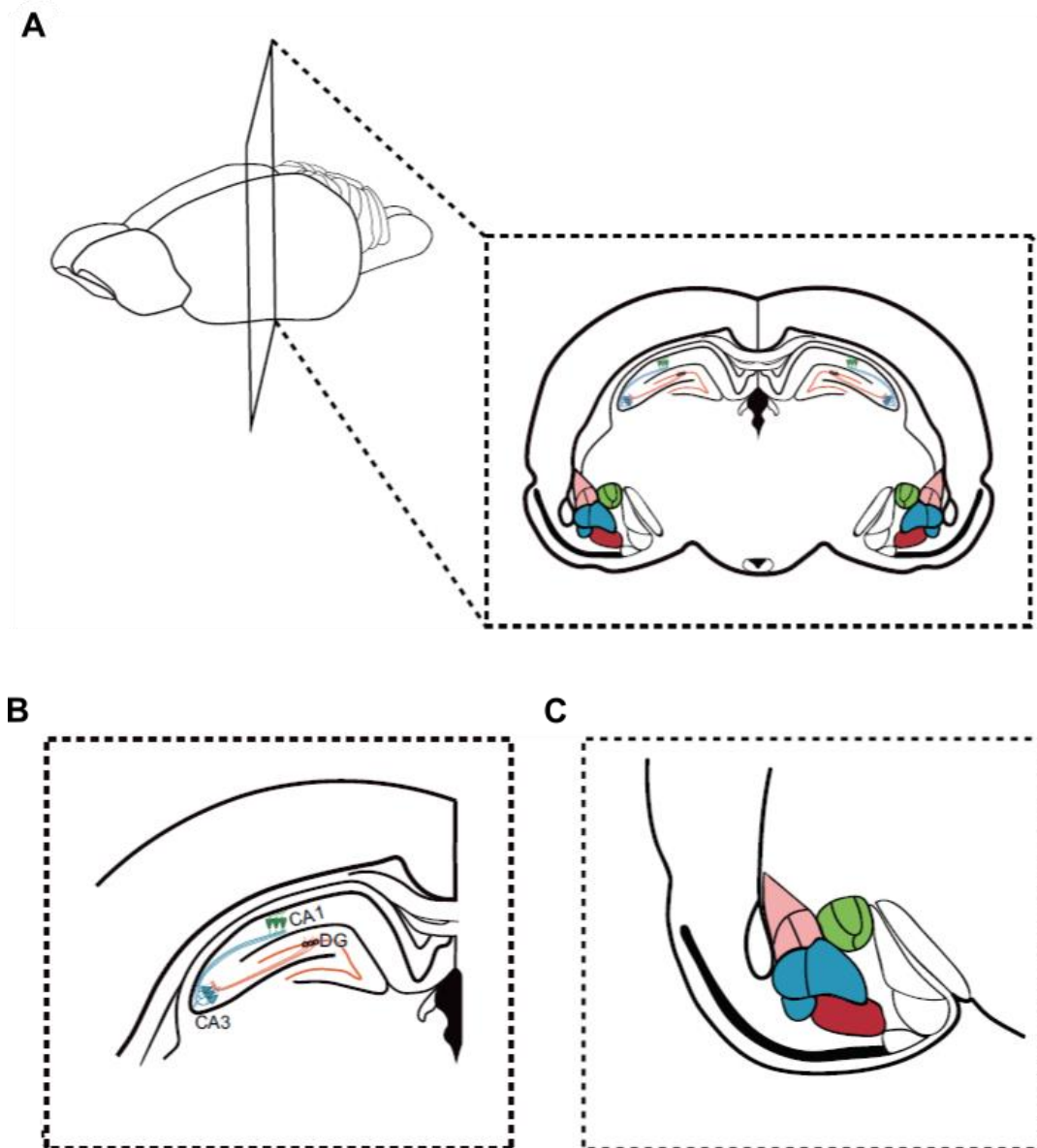


FIGURA 2. Esquema de la localización cerebral y anatomía de la formación hipocámpica y la amígdala. **(A)** Localización de ambas estructuras en una sección coronal del cerebro de roedor. **(B)** Anatomía de la formación hipocámpica y circuito excitatorio principal. La vía de entrada a las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la subárea CA1 (verde) está compuesta por axones de la subárea CA3 (azul) y es denominada la vía colateral de Schaffer (celeste). Las fibras musgosas (naranja), a su vez, conectan las neuronas del DG (también naranja) con las de la subárea CA3. **(C)** Núcleos que componen la amígdala: lateral (rosa), central (verde), basomedial (rojo) y basolateral (azul). Los núcleos basolateral y lateral reciben la información de otras estructuras cerebrales, mientras que el núcleo central de la amígdala compone su principal vía de salida. (Figura adaptada del trabajo de revisión de Izquierdo y colaboradores [139]).

1.6 Espinas dendríticas, plasticidad y memoria

La capacidad de las neuronas para recibir, integrar y transmitir gran cantidad de información reside, en gran parte, en su morfología polarizada. Este tipo de morfología permite la compartimentalización de las estructuras neuronales y una clara

diferenciación en sus funciones. Las dendritas son compartimentos neuronales específicos que, gracias a su gran extensión y ramificación, pueden llegar a integrar la información a partir de miles de conexiones neuronales [165, 166]. A su vez, las dendritas están subdivididas de manera morfológica y funcional en diferentes compartimentos, uno de los cuales son las espinas dendríticas, pequeñas protrusiones que son parte de la mayoría de las sinapsis excitatorias y que poseen un rol funcional esencial en la plasticidad sináptica, debido a su gran nivel de compartimentalización.

Las espinas dendríticas están formadas por una base, asociada al eje dendrítico, una cabeza, que contiene los sitios de conexión sináptica, y un cuello más estrecho, que separa a ambas. Esta separación permite una compartimentalización espacial entre dos microambientes que difieren tanto en sus capacidades eléctricas, como en su composición bioquímica [167–170]. A pesar de que la morfología de las espinas dendríticas puede mantenerse estable a lo largo de meses, hasta años, la plasticidad estructural de estas protrusiones fue extensamente estudiada, ya que presenta una fuerte correlación con la plasticidad de circuitos involucrada en el aprendizaje [171–174]. Por otro lado, los cambios desencadenados a partir de modelos de plasticidad neuronal a largo plazo, LTP y LTD, incluyen modificaciones estructurales que se caracterizan por un aumento o una disminución en el tamaño de las espinas dendríticas, respectivamente [175, 176].

La plasticidad estructural generada por el proceso de LTP implica cambios moleculares dentro de la espina. Uno de estos cambios es la reorganización del citoesqueleto de actina, aunque se puede argumentar que esta reorganización no sólo constituye un cambio molecular, sino que permite que se den muchos otros involucrados en este proceso, como el aumento del tamaño de la densidad postsináptica (PSD) y un aumento y reorganización de los receptores de glutamato, entre otros (ver [sección 1.7](#)) [177–180]. Brevemente, a partir de la inducción del LTP, las espinas aumentan de manera sustancial su volumen. Esta etapa es llamada transiente, debido a que rápidamente da paso a una etapa sostenida, en la que, por el lapso de varios minutos luego de la inducción, el volumen disminuye para llegar a estabilizarse en un valor menor al máximo de la etapa transiente, pero aún mayor que el basal. Esta etapa sostenida está relacionada con el aumento de la sensibilidad postsináptica al glutamato (**FIGURA 4**) [176, 181–183].

A partir de estudios realizados en estos modelos de plasticidad neuronal a largo plazo, se cree que estas modificaciones estructurales desencadenadas por actividad neuronal forman las bases de la reorganización de los circuitos que subyacen al aprendizaje y la memoria a largo término (revisado en [184]).

1.6.1 Relación entre la morfología de las espinas dendríticas y su función

Como mencioné antes, un exhaustivo estudio de la dinámica molecular en la plasticidad de las espinas dendríticas a lo largo de los años ha permitido concluir que sirven como compartimentos bioquímicos que permiten que cada espina tenga un perfil molecular específico, acorde a la sinapsis en la que esté involucrada [185, 186]. De esta manera, la cabeza de las espinas dendríticas funciona como compartimento bioquímico particular, mientras que su cuello tiene la función de “barrera de difusión” para organelas intracelulares, iones y moléculas implicados en cascadas de señalización [169, 187, 188], además de aumentar la compartimentalización eléctrica de las espinas [167, 170, 189]. La morfología de las espinas, entonces, se correlaciona con la traslocación de receptores a membrana [190–193], capacidad de limitar la difusión de iones de calcio hacia la dendrita [189, 194–197], la proporción de receptores de L-glutamato de tipo AMPA (AMPA-R) y NMDA-R [198], el tamaño de la PSD [196, 199, 200], la cantidad de vesículas cercanas a la membrana [201], además de la fuerza sináptica [202, 203]. La madurez en las espinas dendríticas, entonces, se puede evidenciar en cabezas de mayor volumen y cuellos más angostos [204]. Sin embargo, se discute también que espinas dendríticas con cuellos más cortos y anchos, permiten una disminución en la resistencia eléctrica, a su vez manteniendo la compartimentalización bioquímica [205] y, efectivamente es lo que se observa luego de la estimulación a través de LTP [188]. Por lo tanto, el rol del cuello de las espinas dendríticas en la potenciación sináptica está aún en discusión, pero esta “barrera de difusión” favorecida por el cuello de la espina evidentemente no responde necesariamente a su forma y tamaño, sino que hay otros mecanismos que pueden mantener la compartimentalización bioquímica en espinas con cuellos anchos. Se sospecha que el citoesqueleto de actina forma parte de la red de moléculas que conforma esta “barrera” [206], junto con las modificaciones estructurales y funcionales que suceden en las espinas dendríticas a partir de su estimulación (revisado en [207]). Por lo

tanto, en la [sección 1.7](#) desarrollaré cómo se comporta el citoesqueleto de actina en las neuronas y qué factores son los que regulan esta dinámica.

1.6.2 Morfología de las espinas dendríticas en el aprendizaje y la memoria

La hipótesis vigente dentro del campo de estudio de la neurobiología de la memoria sostiene que el proceso de aprendizaje puede generar tanto cambios morfológicos en espinas existentes, como la formación de nuevas espinas. Además, si estos cambios se ven fortalecidos por un aumento en la fuerza o número de las sinapsis involucradas, las espinas dendríticas pueden convertirse en el sustrato neurobiológico de las memorias de largo término. Esta hipótesis está avalada por numerosos estudios que proveen evidencia sobre la estabilidad de las espinas a lo largo de días e incluso años [171, 208–210]. Por otro lado, hay evidencias de la generación de nuevas espinas luego del aprendizaje y una fuerte correlación entre su persistencia y la fuerza de la memoria a largo término [172, 211–216]. A su vez, la disrupción en su morfología luego de la consolidación de la memoria resulta en un impedimento en el mantenimiento de la misma [173, 217–219] y una morfología o número aberrante de espinas dendríticas han sido correlacionadas con diferentes tipos de enfermedades y desórdenes neurológicos [220–224].

1.7 Dinámica del citoesqueleto de actina neuronal

La complejidad alcanzada en la morfología y, por lo tanto, la compartimentalización de la funcionalidad neuronal es posible gracias a la dinámica del citoesqueleto, compuesto principalmente por microfilamentos de actina y microtúbulos de tubulina. Específicamente en las espinas dendríticas, la actina cobra un rol preponderante, ya que está mucho más concentrada en estos compartimentos en relación a la tubulina (FIGURA 3) [225–227]. Además, gracias a su capacidad de armar y desensamblar filamentos con gran rapidez, permite los cambios relacionados con la eficacia sináptica dentro de las espinas dendríticas [207, 228–230], siendo una de las proteínas más extensamente evaluadas en el estudio de la plasticidad neuronal.

Además de modular la morfología de las espinas dendríticas, el citoesqueleto de actina tiene roles esenciales en la organización de la PSD [231, 232], el anclaje de receptores en membrana [233], el tráfico de moléculas sinápticas [234] y la regulación de la localización de la maquinaria de traducción [235].

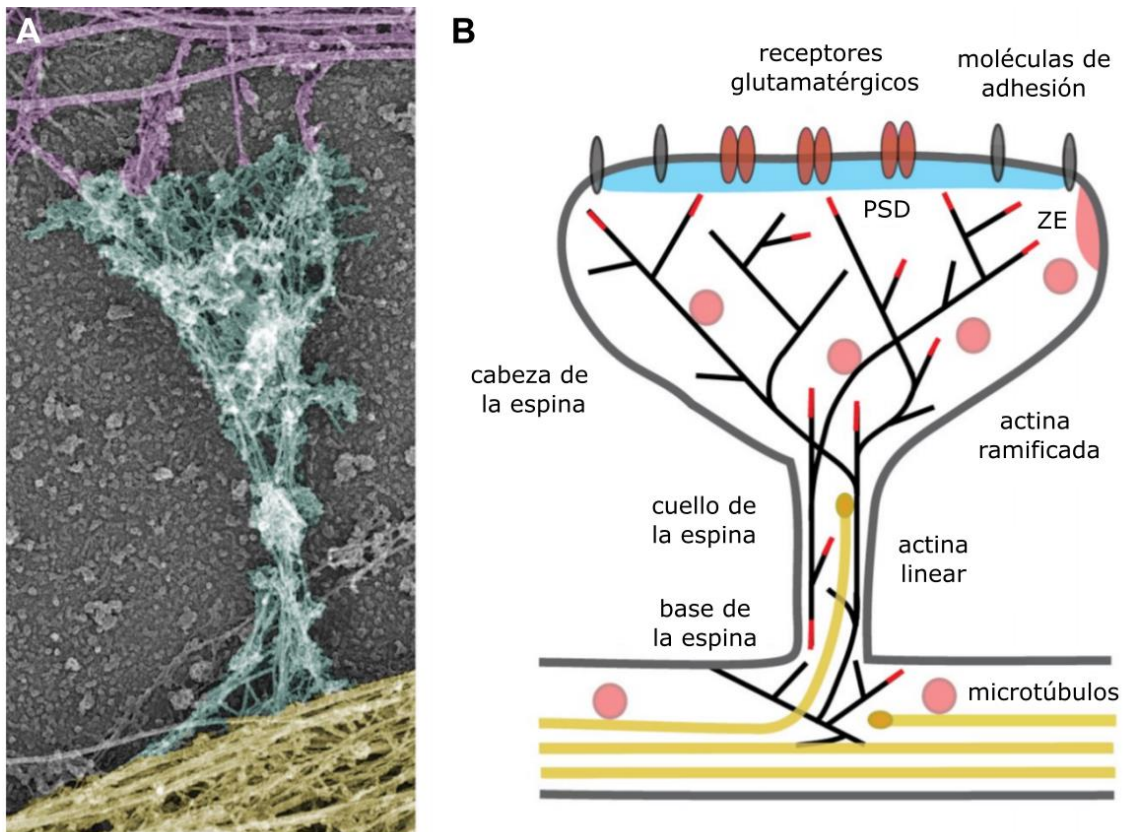


FIGURA 3. Citoesqueleto en las espinas dendríticas. **(A)** Microscopía electrónica que muestra la organización del citoesqueleto en el axón presináptico (violeta), la espina dendrítica (verde) y el eje dendrítico (amarillo). La cabeza de la espina contiene gran densidad de microfilamentos de actina ramificados, cortos y unidos entre sí, formando una “red”. En cambio, en el cuello de la espina se observan filamentos de actina longitudinales que pueden ser ramificados o lineales. En su base residen filamentos ramificados que están conectados con los microtúbulos ingresantes a la espina desde el eje dendrítico. **(B)** Esquema de una espina dendrítica en el que se pueden observar la densidad postsináptica (PSD; azul), moléculas de adhesión (gris), receptores glutamatérgicos (bordó) y el citoesqueleto de actina (negro) y tubulina (amarillo). La zona de endocitosis (ZE) se encuentra lateral a la PSD y se conecta con el citoesqueleto para el transporte de endosomas (rosa). El citoesqueleto de actina se amplifica en la base de espina, se ordena de manera longitudinal en su cuello y se expande nuevamente en ramificaciones en la cabeza. Los extremos barbados de los filamentos de actina, en donde se produce su polimerización, están marcados en rojo. Los microtúbulos se encuentran principalmente en el eje dendrítico y, en algunos casos de espinas maduras, ingresan a las mismas de manera transiente (Figura adaptada del trabajo de revisión de Hotulainen y Hoogenraad [236]).

La actina es la molécula más abundante de las células eucariotas, presentando tres isoformas posibles, de las cuales solo dos (β y γ) se encuentran en neuronas [237]. Dentro de las células, la actina puede presentarse de dos formas: de manera monomérica, también denominada globular (G-actina), o en forma de polímero, también llamada filamentosa (F-actina). Los filamentos de actina, en función de la morfología que se observa a través del microscopio electrónico, presentan un extremo por donde se polimeriza, denominado barbado (o también conocido como el extremo positivo), y el extremo opuesto por donde se despolimeriza, llamado puntiagudo (o negativo). En base a esta morfología, se cree que la capacidad del citoesqueleto de modificar la morfología de las células se basa en una dinámica de polimerización de un extremo y despolimerización del opuesto, denominada *treadmilling* (cinta de caminata; FIGURA 4 A) [238].

En las FIGURA 4 B Y C puede observarse el esquema propuesto para el rol del citoesqueleto de actina en la expansión y mantenimiento del volumen de las espinas dendríticas. Esta hipótesis se basa en trabajos que relacionan la estimulación de las espinas con una disminución en el mecanismo de *treadmilling* del citoesqueleto (implicando una mayor estabilidad de los filamentos de actina) y la formación de un nuevo *pool* estable de actina en el centro de la espina [239, 240]. Este nuevo *pool* estable podría estar dado por la disminución de la tasa de despolimerización en los extremos puntiagudos que se encuentran en el centro de la espina, mientras que la tasa de polimerización en su extremo barbado, hacia el borde de la espina, generaría un aumento en el volumen de la misma. Esta regulación del tamaño de las espinas dendríticas daría

cuenta, a su vez, del aumento de la proporción F-actina/G-actina que se observa luego de la estimulación, favoreciendo la polimerización y estabilización del citoesqueleto [39].

La regulación temporal y espacial del balance entre la tasa de polimerización y despolimerización de los filamentos está fina y dinámicamente controlada por un gran número de proteínas de unión a la actina que, además, interactúa con las proteínas asociadas a los microtúbulos para generar una organización concertada de todo el citoesqueleto [241, 242]. Debido a que, en la espina dendrítica, casi toda la población molecular de la actina es reemplazada cada 2 a 3 minutos [239, 243], se cree que son proteínas de unión a la actina las que regulan, mantienen y modifican al citoesqueleto acorde a la información que recibe la espina. En la actualidad se conocen numerosas proteínas de unión a la actina asociadas a diferentes etapas la plasticidad estructural de espinas dendríticas [207]. En las siguientes secciones me explayaré sobre las moléculas más relevantes para el presente trabajo y su impacto en la plasticidad de las espinas dendríticas.

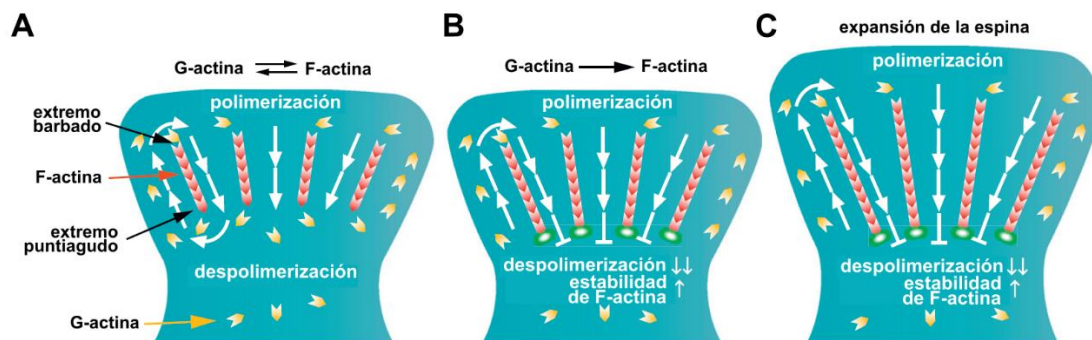


FIGURA 4. Esquema que describe el rol de la dinámica de actina neuronal propuesto para la expansión de las espinas dendríticas. **(A)** En una espina en su estado basal, el mecanismo de *treadmilling* de la actina está activo de manera constante, mantenido por un equilibrio entre las tasas de polimerización y despolimerización de los filamentos de actina. **(B)** La inducción de LTP estabiliza los filamentos de actina y produce una disminución en la tasa de despolimerización de los mismos en su extremo puntiagudo, localizado hacia el centro de la espina dendrítica. **(C)** La polimerización de actina continúa en la periferia de la espina dendrítica, generando la expansión de su cabeza. (Figura adaptada del trabajo de revisión de Bosch y colaboradores [244]).

1.7.1 ADF/Cofilina como factor regulador de la dinámica del citoesqueleto

Como ya mencioné con anterioridad, las espinas dendríticas son estructuras que permiten regular muy finamente el acceso de moléculas presentes en la neurona a la PSD. Se cree que esta barrera tan específica permite que las proteínas que favorecen la

potenciación estén restringidas de esta zona y, por lo tanto, las espinas tengan un umbral relativamente alto de activación. Sin embargo, para poder generar los procesos plásticos que se producen a partir de su activación, la permeabilidad de la zona de la PSD a moléculas que favorecen la potenciación (quinasas, receptores de membrana, proteínas de andamiaje de la PSD, entre otras) debe modificarse. La capacidad que poseen este tipo de moléculas para alcanzar rápidamente la PSD luego de la activación y, así, generar cambios morfológicos y funcionales en la espina, depende del desensamblado inicial del citoesqueleto de actina [245]. En base a los estudios que plantean que la capacidad del citoesqueleto de modificar la morfología de las células se basan en el *treadmilling*, se cree que el desensamblado de filamentos de actina se produce gracias al bloqueo de la elongación en el extremo barbado a través de la unión a proteínas de tipo *capping* (caperuza) y la despolimerización del extremo puntiagudo [246]. Este último proceso es mediado por el factor principal de desestabilización del citoesqueleto, ADF/Cofilina.

La familia de proteínas ADF/Cofilina (ADF por las siglas de su nombre en inglés, *actin depolymerizing factor*) está compuesta por tres moléculas globulares y pequeñas: ADF, Cofilina 1 y Cofilina 2. Están codificadas en genes distintos, pero comparten entre el 70 y el 80% de su secuencia aminoacídica [247]. Cabe destacar que Cofilina 2 no se expresa en neuronas, mientras que Cofilina 1 (Cfl1) tiene niveles altos de expresión en el cerebro adulto [248] y es más abundante que ADF en neuronas de mamíferos [249].

El rol específico de cada una no está bien delimitado en la bibliografía, principalmente debido a que no se suele diferenciar entre las diferentes moléculas para su estudio, ya que se cree que comparten muchas de sus funciones [250]. Estas moléculas se unen tanto a la G-actina, como a la F-actina, con preferencia por su extremo puntiagudo o negativo y, generalmente tienen un efecto desestabilizador sobre los filamentos [251–254]. En la F-actina, ADF/Cofilina se une de manera longitudinal a lo largo del filamento y, a través de la acción cooperativa entre varias moléculas, modifican la conformación de la actina [255–259]. Cuando la relación entre la concentración de ADF/Cofilina y actina es relativamente baja, la unión promueve el corte de F-actina en segmentos y la despolimerización de los mismos en G-actina [251, 260–262]. Sin embargo, si la relación aumenta (10 a 50%), los filamentos estarán saturados de ADF/Cofilina y su unión genera la estabilización de los mismos [263]. Se ha demostrado que ADF/Cofilina es necesaria para la viabilidad de variedad de organismos [264, 265] y

alteraciones en su producción, en la regulación de su actividad o su localización son causa de una gran diversidad de enfermedades y afecciones humanas [266, 267]. Además, la alteración en la actividad de ADF/Cofilina y la dinámica de actina generan cambios en la morfología de las espinas dendríticas [268–270], por lo que la interferencia de esta vía de regulación produce impedimentos en el aprendizaje y la memoria [220, 271–275].

En tejido neuronal, la actividad de ADF/Cofilina es inhibida por la fosforilación de su aminoácido serina en la posición número 3, regulación que ejerce LIM quinasa (LIMK; FIGURA 5) [276]. Esta modificación postraduccional inhibe su actividad al disminuir radicalmente su afinidad a la actina (revisado en [277]). Tal es así, que la actividad de LIMK genera la reorganización de la actina y revierte la despolimerización producida por ADF/Cofilina en células en cultivo [278]. Ratones *knock-out* para esta quinasa muestran impedimentos severos en la formación de memorias a largo término de tareas que dependen del hipocampo, cuando se los compara con animales *wild-type* [279, 280] e inhibir su actividad resulta en déficits en diferentes procesos de memoria en el modelo de rata [272]. Estas evidencias están en concordancia con trabajos que vinculan la regulación de la morfología de las espinas dendríticas con la vía de señalización de LIMK [279–281]. LIMK forma parte de las vías de señalización de Rac1/PAK y RhoA/ROCK [278, 282–287], las cuales involucran al ion calcio, están involucradas en la consolidación del LTP [288–292] y en procesos asociados a memorias de miedo dependientes del hipocampo [293–297].

En el sentido opuesto, la desfosforilación de ADF/Cofilina en la serina 3 produce un aumento en su actividad (FIGURA 5) [298]. Esta regulación la ejercen las fosfatasa *Slingshot* (SSH), de las que no se conocen en detalle sus vías de regulación en tejido neuronal [299]. Recientemente, se ha propuesto que SSH tiene la capacidad, no sólo de activar a la ADF/Cofilina a través de su desfosforilación, sino de interactuar con LIMK, inhibiendo su actividad. De esta manera, se formaría un complejo fosfo-regulatorio compuesto, entre otras moléculas, por LIMK y SSH, que modularía la actividad de ADF/Cofilina de manera unificada [300].

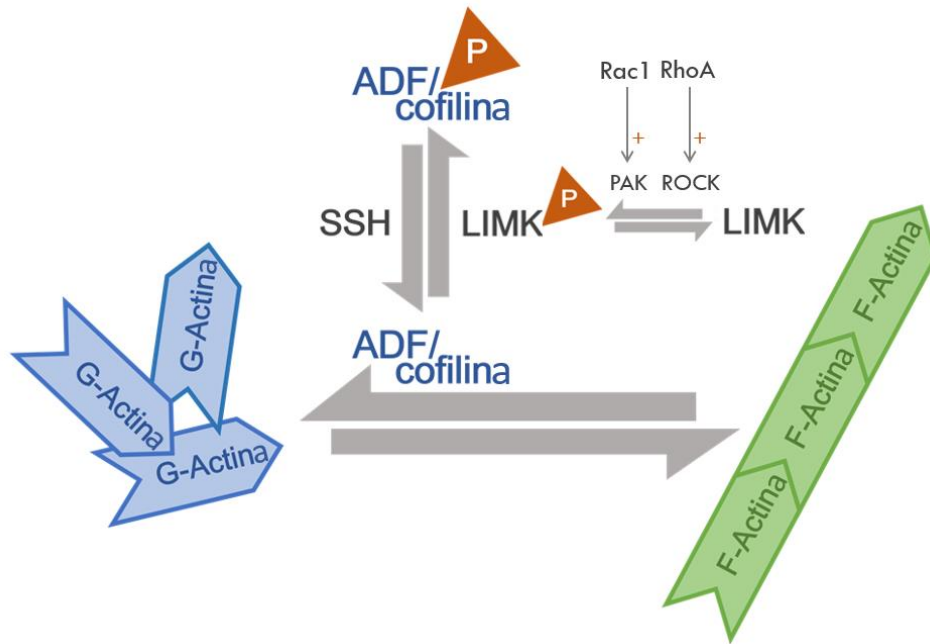


FIGURA 5. Esquema que describe la regulación de la actividad despolimerizante de ADF/Cofilina sobre la dinámica de actina. ADF/Cofilina favorece el corte y despolimerización de la F-actina en G-actina. La actividad de este regulador aumenta al ser desfosforilado por SSH y la disminuye a partir de la fosforilación por LIMK. LIMK, a su vez, aumenta su actividad cuando es fosforilada por PAK (vía de señalización de Rac1) o ROCK (vía de señalización RhoA).

1.7.1 Rol de ADF/Cofilina y LIMK en aprendizaje y memoria

Aunque los niveles de expresión o la regulación de muchas proteínas de unión a la actina pueden mediar modificaciones en la dinámica de la morfología de las espinas dendríticas que da cuenta de procesos de aprendizaje y memoria, la bibliografía apunta a un rol central por parte de ADF/Cofilina [175, 301]. Debido a que la actividad regulatoria ejercida por este factor es clave en la modulación de la forma y el volumen de las espinas dendríticas [302–304], es lógico que su inhibición genere morfologías aberrantes en espinas dendríticas y dificultades en la plasticidad sináptica (reducción en LTP y tráfico de AMPA-R y ausencia de LTD). Ratones transgénicos carentes de Cfl1 en las neuronas principales del telencéfalo presentaron impedimentos en la formación de memorias asociativas en diversos paradigmas [274, 275]. A la vez, se han visto aumentos en los niveles de espinas dendríticas en la subárea hipocámpal CA1 luego de la inhibición de la actividad de Cfl1 (a través de su fosforilación) en el aprendizaje de un contexto enriquecido [305]. Sin embargo, la formación de una memoria espacial a corto término no fue impedida en ratones transgénicos carentes tanto de ADF como de Cofilina [306], lo que parecería indicar un rol esencial de estos factores en los procesos plásticos

necesarios para la formación y mantenimiento de memorias de largo término, pero no así en los involucrados a la memoria de corto plazo.

Por su parte, se observa una inhibición de la actividad despolimerizante de ADF/Cofilina en la corteza infralímbica 30 minutos después de la reactivación de la memoria aversiva al gusto, la cual es dependiente de esa estructura cerebral. Además, el aumento de la actividad de ADF/Cofilina en esta corteza resultó en alteraciones en el tráfico de AMPA-R y la facilitación de la extinción de la memoria [273]. Por otro lado, la regulación de la actividad de ADF/Cofilina se vio involucrada en procesos de envejecimiento y la enfermedad de Alzheimer [224, 303, 307–309]. Esto ha llevado plantear el tratamiento de diversos desórdenes neurológicos que afectan los procesos de aprendizaje y memoria a través de la regulación de la actividad de ADF/Cofilina a partir de péptidos que atraviesan la barrera hematoencefálica [301].

Con respecto a la memoria contextual de miedo, a pesar de que la inyección intra-hipocampal de un inhibidor de la polimerización de actina inmediatamente después de la reactivación de la memoria de miedo contextual no impide su reconsolidación en ratones [271], la inhibición de la actividad de LIMK en el hipocampo inmediatamente después de la reactivación de la memoria sí interrumpe su restabilización en el modelo de rata [272]. Estos resultados aparentemente contradictorios dan cuenta de la complejidad del sistema de regulación del citoesqueleto de actina en las espinas dendríticas y ponen en evidencia la necesidad de un estudio pormenorizado de su dinámica.

Por otro lado, en base al estudio de ratones transgénicos carentes de LIMK, hay evidencias para sostener que la actividad moduladora de esta quinasa sobre ADF/Cofilina es esencial para la regulación de la morfología de las espinas dendríticas, la formación de LTP en el hipocampo y los procesos de memoria de largo término en ratones, dentro de las cuales están incluidas tareas espaciales y de miedo [279, 280, 310]. Sin embargo, algunos de estos ratones transgénicos también presentan otros tipos de modificaciones comportamentales que exceden a los procesos mnésicos y que podrían estar modificando la respuesta comportamental asociada a las distintas tareas evaluadas [310].

Considerando que las moléculas que permiten los cambios estructurales y funcionales que dan cuenta de la plasticidad en la eficacia sináptica necesaria para la

formación y mantenimiento de una memoria a largo término son reemplazadas numerosas veces a lo largo del tiempo que puede durar esta traza, el estudio sobre estos cambios se ha concentrado a lo largo de los años en el citoesqueleto de actina y sus reguladores principales. Este estudio ha dado lugar a numerosos trabajos que evalúan el rol de variedad de proteínas de unión a la actina involucradas en modelos de plasticidad sináptica a largo término (LTP y LTD). Sin embargo, como bien ha sentenciado Francis Crick en 1984, una cosa es generar y consolidar cambios que permiten la potenciación sináptica, pero otra cosa muy diferente es mantener esos cambios el largo tiempo que puede perdurar una memoria [311]. Ante la necesidad de comprender en mayor medida los procesos que subyacen al mantenimiento de esos cambios y, además, permiten la actualización de la memoria, se vuelve necesario el estudio detallado del rol de los factores regulatorios de la dinámica del citoesqueleto de actina involucrados en procesos mnésicos.

Hipótesis y Objetivos

El marco conceptual en el que se desarrolló esta Tesis sostiene que los procesos de aprendizaje y memoria se basan en cambios funcionales y estructurales en las conexiones sinápticas involucradas. Esto incluye la modificación de sinapsis preexistentes a los procesos mnésicos o la formación de nuevas conexiones a partir de ellos.

Hipótesis general

La plasticidad involucrada en los procesos mnésicos asociados a una memoria de miedo contextual en el ratón *Mus musculus* implica cambios en la morfología y densidad de las espinas dendríticas, los cuales dependen, a su vez, del citoesqueleto de actina y de los factores involucrados en su regulación.

Hipótesis 1

La regulación en la dinámica del citoesqueleto de actina por parte de LIMK y ADF/Cofilina es un mecanismo celular que subyace a los procesos de consolidación, labilización, reconsolidación y extinción de una memoria de miedo contextual.

Objetivo 1.1

Evaluar la cantidad total y el nivel de activación de la proteína Cofilina 1 en el hipocampo dorsal a partir de los procesos de labilización y reconsolidación de la memoria de miedo contextual.

Objetivo 1.2

Evaluar el perfil de los ARNm de Cofilina 1 y β -actina en la subárea CA1 del hipocampo dorsal a partir de los procesos de labilización y reconsolidación de la memoria de miedo contextual.

Objetivo 1.3

Evaluar el efecto de la inhibición de la actividad regulatoria de LIMK en el hipocampo dorsal en los procesos de consolidación, reconsolidación y extinción de la memoria de miedo contextual.

Hipótesis 2

La activación neuronal y la actividad de LIMK son factores involucrados en la regulación de la disponibilidad para la traducción de los ARNm de Cofilina 1 y β -actina en cultivo primario de hipocampo y corteza cerebral.

Objetivo 2

Evaluar el efecto de la inhibición de la actividad regulatoria de LIMK y la activación neuronal en el perfil de los ARNm de Cofilina 1 y β -actina en cultivo primario de hipocampo y corteza cerebral.

Hipótesis 3

La plasticidad en la morfología y la densidad de espinas dendríticas de neuronas piramidales de la subárea CA1 del hipocampo dorsal subyace al proceso de reconsolidación de la memoria de miedo contextual.

Objetivo 3

Evaluar el efecto a largo término del impedimento del proceso de reconsolidación de la memoria de miedo contextual sobre la morfología y la densidad de espinas dendríticas de neuronas piramidales de la subárea CA1 del hipocampo dorsal.

Capítulo 2. Materiales y Métodos

2.1 Sujetos experimentales

2.1.1 Ratones *wild-type*

Para los experimentos descritos en los [Capítulos 3](#) y [4](#), utilizamos ratones *Mus musculus* machos pertenecientes a la cepa C57BL/6 de entre 8 y 10 semanas de edad, con un peso que varió entre 25 y 30 gramos. Adquirimos a los ratones de los bioterios de la Comisión Nacional de Energía Atómica, la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata y de la Universidad de Buenos Aires. Albergamos a todos los ratones en cajas de acrílico transparente con suficiente cantidad de viruta esterilizada como para cubrir el fondo de la caja. Los ubicamos en tales cajas de manera individual cuando realizamos experimentos con animales operados, para evitar que se remuevan las cánulas mutuamente, y en grupos de a máximo 5 ratones cuando realizamos el resto de los experimentos. Los animales tuvieron comida y agua para su consumo *ad libitum*, además de contar con una hoja de papel *tissue* para formar el nido. El ambiente que albergó a los ratones mantuvo un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas, con las luces prendiéndose a las 8 am, y la temperatura varió entre 21 y 24 °C. Realizamos los experimentos en el ciclo de luz y retiramos a los ratones de ese cuarto, que los albergó hasta su sacrificio, únicamente para realizar las cirugías o los experimentos.

Realizamos los experimentos de acuerdo con las regulaciones de la CICUAL de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (protocolo 029/2013) y la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” (de *National Institutes of Health*, de Estados Unidos, publicación 80-23/96). En todos los experimentos intentamos minimizar el sufrimiento y el número de los animales utilizados, además de mantenerlos en condiciones apropiadas para garantizar su bienestar.

2.1.2 Ratones transgénicos Thy1-EGFP y su genotipificación

Para el experimento descrito en el [Capítulo 5](#), se emplearon ratones machos de la cepa C57BL/6J transgénicos que expresan la proteína fluorescente verde en su forma

mejorada (eGFP, de su nombre en inglés *enhanced Green Fluorescent Protein*) bajo el control de una región del promotor Thy1 modificada, que contiene las secuencias necesarias para la expresión neuronal pero carece de las secuencias requeridas para la expresión en células no neuronales. La cepa de estos ratones es llamada B6.Cg-Tg(Thy1-EGFP)MJrs/J (#007788, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) y estos ratones fueron donados generosamente por el Dr. Lucas Pozzo-Miller (University of Alabama at Birmingham, USA).

La genotipificación de los ratones se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico obtenido de una muestra de tejido de la cola del animal. La toma de la muestra de tejido se llevó a cabo dentro de la primera semana después del destete mediante un bisturí estéril, cortando una muestra de aproximadamente 2-3 mm del extremo de la cola del ratón. En ese mismo momento, fueron marcados mediante pequeñas incisiones en las orejas para su futura identificación.

La extracción del ADN genómico a partir de la cola de los ratones se llevó a cabo mediante la digestión del tejido por el lapso de una hora en un baño seco a 95°C con una solución de lisis alcalina (25 mM NaOH, 200 µM EDTA, pH = 12) y luego se neutralizó la solución con la adición del mismo volumen de un segundo buffer (40 mM Tris-HCl; pH = 5) sobre hielo. Luego, se realizó la técnica de PCR para evaluar la presencia del transgén, a la vez que se evaluó la presencia de un control positivo interno. Utilizamos dos pares de *primers* o cebadores: un par reconoce al transgén que codifica para el fluoróforo eGFP y el otro par reconoce un control interno positivo. El primer par está compuesto por la secuencia *forward* (5'-AAG TTC ATC TGC CCA CCG-3'; #0872, Invitrogen), que hibrida con el promotor del Thy-1 y la secuencia *reverse* (5'-TCCTTGAAGAAGATGGTGCG-3'; #1416, Invitrogen), que hibrida con la secuencia que codifica para eGFP, esta reacción produce un fragmento de aproximadamente 173 pares de bases. El segundo par reconoce a un control interno positivo: la secuencia *forward* (5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3'; #7338, Invitrogen) y la *reverse* (5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C-3'; #7339, Invitrogen) producen un fragmento de aproximadamente 324 pares de bases. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 30 µl, conteniendo 25 mM MgCl, 10 mM dNTPs, 20µM de cada primer, 5 unidades de Taq polimerasa y 2 µl de la solución de ADN. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador estándar y los productos se

revelaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 2 % en Buffer TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA). La presencia de las bandas de los productos de amplificación fue detectada mediante un transiluminador UV.

2.2 Cirugía de implantación de cánulas en el hipocampo dorsal

Con el objetivo de anestésiar a los ratones, les administramos una solución de ketamina (160 mgr/kg) y clorhidrato de xilazina (64 mgr/kg) de manera intraperitoneal a través de una jeringa que cuenta con una aguja de 6 mm y 31 G. Una vez que estaban profundamente anestésiados, los posicionamos en un marco estereotáxico (Stoelting Co., ítem número 51670) y expusimos su cráneo para lograr su perforación de manera bilateral a través de una fresa de alta velocidad (Dremel®, código 105). De esta manera, realizamos dos perforaciones en el cráneo, de forma bilateral, ubicando las cánulas guía en las siguientes coordenadas: +1,9 mm en el eje antero-posterior (respecto del bregma), $\pm 1,2$ mm en el eje lateral (respecto de la línea media) y -1,2 mm en el eje dorso-ventral (respecto de la superficie craneal), acorde al atlas de Franklin y Paxinos [312]. Cada par de cánulas tuvo igual longitud (entre 7 y 8 mm) y una luz de 23 G. Fijamos las mismas al cráneo con adhesivo a base de cianoacrilato, en una primera instancia y, luego de que éste haya fraguado, las aseguramos con acrílico dental. Luego de la cirugía, administramos de manera subcutánea a los ratones una solución de 100 μ L de meloxicam (3,2 mgr/kg, John Martin Laboratory) y enrofloxacin (38 mgr/kg, Vetue Laboratory) en solución salina. De forma complementaria, administramos de manera oral una solución de clorhidrato de tramadol (100 gr/L, John Martin Laboratory) en agua bebible disponible *ad libitum*, hasta el primer día del experimento comportamental (primer día de *handling*), que tuvo lugar entre 5 y 6 días después de la cirugía. La administración aguda de meloxicam y la crónica del clorhidrato de tramadol tuvieron como objetivo disminuir el dolor que pudiera producirse a partir de la operación, mientras que la administración aguda de enrofloxacin tuvo como objetivo disminuir la posibilidad de infecciones generada por la misma causa. Este procedimiento se realizó para facilitar la recuperación de los animales y disminuir el estrés generado por posibles focos de dolor a partir de la implantación de las cánulas guía.

2.3 Inyecciones agudas

En diferentes momentos de los experimentos comportamentales, debidamente aclarados en los apartados correspondientes, procedimos a la administración aguda de una solución vehículo conteniendo o no disuelta una droga específica, aclarada en cada caso (ver [sección 2.4](#)). Logramos este proceso de inyección local en el hipocampo dorsal de animales sin anestésiar a través de un dispositivo conformado por una aguja de 30 G (aguja de inyección) asociada a una jeringa de precisión de 5 μ L (Hamilton) a través de una tubuladura. La aguja de inyección contenía un tope realizado con cola vinílica, que permitía que esta aguja sobrepase el largo de la cánula guía por 1 mm, alcanzando el hipocampo dorsal. Las inyecciones realizadas a través de este dispositivo fueron bilaterales y las administramos de manera manual durante 30 segundos por lado. Luego, dejamos la aguja de inyección en la cánula guía por 60 segundos antes de removerla, para evitar el posible reflujo de la solución inyectada y permitir su correcta difusión en el cerebro de los animales. Finalizados los procedimientos comportamentales, verificamos la correcta ubicación de las cánulas guía en los animales utilizados. Para ello, decapitamos a los animales, luego de sacrificarlos por dislocación cervical. Extrajimos sus cerebros y los fijamos en una solución 4% paraformaldehído (PFA) en *buffer* salino fosfato (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM K₂HPO₄; pH 7,4; PBS por sus siglas en inglés) por el lapso de, al menos, 24 horas. Pasado ese tiempo, introdujimos a los cerebros en una solución de 30% sacarosa en PBS por, al menos, otras 24 horas. Luego, cortamos a los cerebros en secciones y evaluamos la ubicación de las cánulas bajo lupa, superponiendo la posición más ventral de la cánula y de la aguja (cuando su trazo fue visible) con esquemas del atlas de Paxinos y Franklin [312]. Sólo incluimos en los análisis de resultados a los valores correspondientes a cuyas inyecciones fueron efectivamente realizadas en el hipocampo dorsal.

2.4 Drogas

Para los experimentos descriptos en el [Capítulo 3](#), diluimos a cada una de las siguientes drogas en dimetilsulfóxido (DMSO) y las administramos de manera bilateral en el hipocampo dorsal en un volumen total de 0,5 μ L por lado: BMS-5 (BMS; SYNkinase),

Jasplakinolide (Jas; Merck Millipore) y Latrunculina A (LatA; Sigma Aldrich). Administramos BMS en concentraciones que variaron entre 10, 100, 500 μM y 10 mM; mientras que Jas y LatA fueron administrados en concentraciones de 200 μM y 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ [271], respectivamente. Todos los experimentos incluyeron al menos un grupo control inyectado con solución vehículo (Veh), es decir, administrado con DMSO puro.

Para el experimento del [Capítulo 4](#) de activación neuronal (LTP químico, LTPq), utilizamos la solución de aCSF (4 mM lactato de sodio, 2 mM piruvato de sodio, 0,4 mM ascorbato de sodio, 25 mM glucosa, 1,5 mM CaCl_2 , pH 7,4) suplementada con 1 μM estricnina, 20 μM bicuculina y 0,5 μM tetrodotoxina (TTX), con el objetivo de antagonizar los receptores inhibitorios sensibles a glicina (GlyR; [313–315]), los receptores de tipo A de γ -aminobutyric acid (GABA-A; [316–318]) y bloquear canales de sodio voltaje-dependientes (NaV; [319–321]), respectivamente. Para la incubación con BMS, le agregamos al medio de cultivo o a la solución de aCSF suplementada una concentración de 100 μM del inhibidor de LIMK e incubamos a las células con esta concentración por el lapso de 4 horas previas al momento del protocolo de LTPq. Las placas de células que sirvieron como control para este tratamiento fueron incubadas por el mismo lapso de tiempo en iguales condiciones, pero con una solución vehículo de 0,1% DMSO en medio de cultivo o aCSF suplementada, ya que se ha descrito que es la concentración máxima de DMSO que no resulta en una toxicidad observable en cultivos celulares primarios, manteniendo su viabilidad [322, 323]. Para generar el LTPq le agregamos 200 μM glicina a la solución de aSCF suplementada por el lapso de 3 min y luego lavamos con la solución de aCSF suplementada [324–326].

Para el experimento descrito en el [Capítulo 5](#), inhibimos la actividad de NF- κB a través de la administración de una solución conteniendo un oligodeoxinucleótido doble cadena específico que contiene la secuencia consenso para dicha proteína (decoy; GAGGGGACTTTCCCA; secuencia consenso subrayada; Bio-Synthesis Inc, Lewisville, TX, USA). Como control utilizamos un oligodeoxinucleótido de las mismas características, con una base mutada (mdecoy; GAGGCGACTTTCCCA; cambio de base remarcado, Bio-Synthesis Inc). Ambos fueron disueltos en solución STE (10 mM Tris pH 7,5/8; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA). Tanto el decoy como el mdecoy se utilizaron en una concentración de 0,47 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y la dosis inyectada en cada hipocampo equivale a 0,26 pmol [91, 327, 328].

2.5 Aparato de condicionamiento y protocolos experimentales

El aparato de condicionamiento de miedo utilizado está compuesto por una cámara de acrílico transparente (24,5 x 24,5 x 42 cm de tamaño) ubicada en el centro de una caja de madera blanca con una puerta delantera transparente, un ventilador de extracción de aire, una cámara de grabación de video y una lámpara de intensidad variable en el techo. El piso de la cámara de condicionamiento consiste en varillas de acero inoxidable de 0,3 mm de diámetro ubicadas en forma paralela, con una separación de 0,8 mm entre sí (FIGURA 6). El sistema de varillas que conforma el piso de la cámara está conectado al aparato de control que permite determinar los parámetros necesarios para el diseño del protocolo experimental (intensidad de luz y del *shock* eléctrico, presencia o ausencia de tono sonoro, tiempo de espera hasta los estímulos, entre otros).

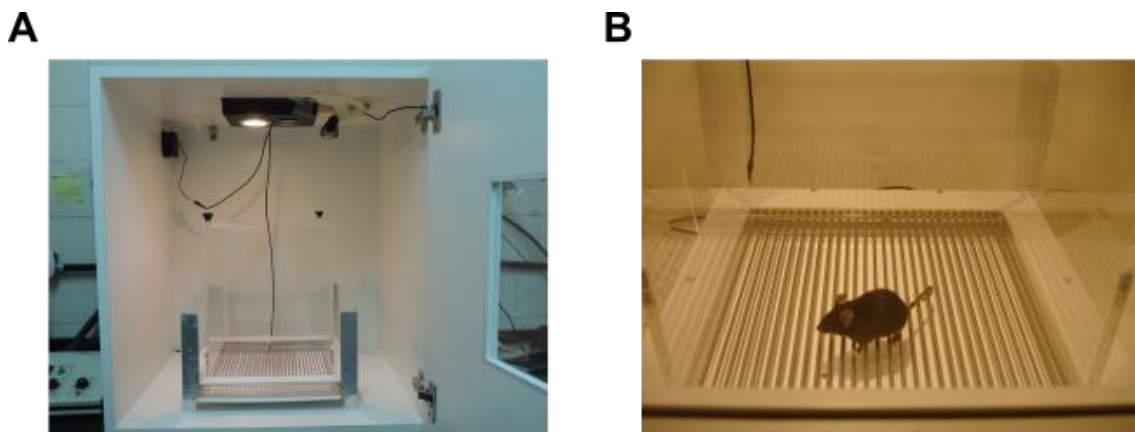


FIGURA 6. Aparato de condicionamiento utilizado para la mayoría de experimentos descritos en los [Capítulos 3](#) y [5](#). **(A)** Fotografía de la cámara de condicionamiento de acrílico transparente ubicada en el centro de la caja de madera blanca. **(B)** Ratón ubicado dentro de la cámara de condicionamiento, sobre las varillas de acero inoxidable que componen el piso de la misma [329].

De forma previa a la sesión de entrenamiento en la cámara de condicionamiento de miedo, procedimos a manipular a los animales una vez por día, los dos días previos al entrenamiento. Durante estas sesiones, imitamos la manipulación por la que iban a pasar los animales los días subsiguientes del protocolo experimental. En los experimentos que incluyeron administración de drogas a través de cánulas guía, manipulamos a los animales acorde al protocolo sin introducir la aguja de inyección en las cánulas guía.

Para la sesión de entrenamiento, en el día 1, ubicamos a los animales de manera individual en la cámara de condicionamiento de miedo y se los dejó recorrerla de manera libre por un lapso de 2 minutos, lo que permitió establecer un parámetro base del comportamiento de cada animal (pre-TR; FIGURA 7 A). Después de este período de aclimatación, los ratones recibieron tres ensayos de condicionamiento espaciados por un intervalo inter-ensayo de 1 min. Cada ensayo consistió en un *shock* eléctrico de 0,6 mA de intensidad y de 1 segundo de duración, administrado a través de las varillas de acero inoxidable que componen el piso de la cámara de condicionamiento. Después del tercer ensayo, mantuvimos a los animales en la cámara por 1 minuto adicional, antes de ser removidos de la misma para volver a sus cajas de alojamiento (FIGURA 7 A). Todas las sesiones de re-exposición y evaluación de la memoria consistieron en ubicar al animal en la cámara de condicionamiento por el lapso de 5 min y dejarlo explorar libremente la misma (FIGURA 7 B), excepto para las sesiones de extinción de la memoria, que consistieron en el mismo procedimiento, pero, en este caso, por el lapso de 30 min (FIGURA 7 C). Ninguna de estas sesiones de re-exposición, extinción o evaluación incluyeron la administración de *shocks* eléctricos a los animales. Las sesiones de re-exposición al contexto sirvieron el doble propósito de evaluar la memoria de miedo hasta esa instancia del experimento y también de reactivarla [91, 92].

Todas las sesiones de entrenamiento, re-exposición y evaluación que tuvieron lugar en la cámara de condicionamiento fueron grabadas con la cámara de vídeo ubicada en el techo del aparato, permitiendo su posterior reproducción y análisis del comportamiento de los animales. En el intervalo de tiempo entre la salida de un animal y la entrada del siguiente a la cámara de condicionamiento, la limpiamos de manera exhaustiva con papel embebido en una solución de 95% alcohol étílico y seguidamente la secamos totalmente, con el objetivo de eliminar posibles olores dejados por cada animal. Para cada sesión del protocolo experimental, evaluamos la medida del porcentaje del tiempo total que pasaron los ratones sin ejecutar ningún movimiento, con la excepción de los necesarios para respirar. Esta medida es llamada *freezing* en inglés y es un comportamiento estereotipado ampliamente utilizado como medida operativa de miedo [330, 331]. Evaluamos este comportamiento de manera manual y ciega al tratamiento, analizando el movimiento demostrado por cada animal cada 5 segundos, para luego

llegar a un valor de porcentaje de tiempo de la sesión en el que el animal demostró comportamiento de *freezing*.

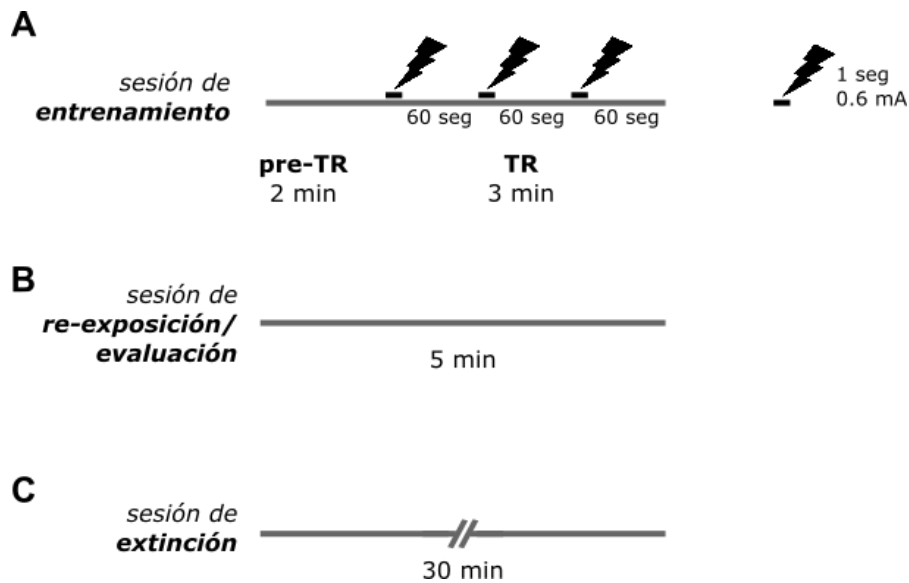


FIGURA 7. Detalle de los protocolos de las sesiones de entrenamiento (A), re-exposición/evaluación (B) y extinción (C). En el resto de las Figuras, se abrevió de la siguiente manera: TR: sesión de entrenamiento; pre-TR: dos min iniciales de la sesión de entrenamiento en la que no se presentó el shock eléctrico; RE: sesión de re-exposición; EXT: sesión de extinción; TS: sesión de evaluación.

2.6 Extractos sinaptoneurosomales

Los ratones utilizados para el experimento descrito en la [sección 3.1.1](#) fueron sacrificados por dislocación cervical luego de diferentes intervalos de tiempo después de la re-exposición al contexto de entrenamiento (para más detalle, ver la sección correspondiente). Inmediatamente después de la dislocación, decapitamos a los animales, removimos sus cerebros y extrajimos ambos hipocampos completos, siguiendo el método descrito por Glowinski e Iversen [332]. Luego, procedimos a lograr una muestra de cada animal enriquecida con la fracción sinaptoneurosomal del tejido hipocampal. Para ello, seguimos el protocolo descrito por Salles y colaboradores [333]. Brevemente, homogeneizamos el tejido de cada animal en 250 μ L de *buffer* 1 (Tris-HCl 20 mM, sacarosa 320 mM, EDTA 1mM, aprotinina 10 μ g/ml, pepstatina A 1 μ gr/ml, leupeptina 10 μ gr/ml, PMSF 0,5 mM, OVNa 1 mM, NaF 50 mM; pH 7,4), aplicando 15 golpes de mano de mortero de tipo ajustada (o tipo B) dentro de homogeneizadores manuales de vidrio del tipo Dounce, obteniendo una fracción de homogenato total. Luego, centrifugamos esta fracción por 10 min a 1000 g, retiramos el sobrenadante para

ubicarlo en un nuevo tubo. Resuspendimos el *pellet* que dejamos en el tubo original con otros 250 μ L de *buffer* 1 fresco y centrifugamos nuevamente por 10 min a 1000 g. Seguidamente, agrupamos el segundo sobrenadante con el que habíamos obtenido en una primera instancia y procedimos a centrifugar esta mezcla de ambos sobrenadantes por 30 min a 13000 g. Luego de esta última centrifugación, descartamos el sobrenadante obtenido y resuspendimos el *pellet*, que corresponde al extracto sinaptoneurosomal crudo, en 40 μ L de *buffer* hipotónico (Tris-HCl 5mM, sacarosa 320 mM, EDTA 1mM, CaCl₂ 50 μ M, LDS 1%, aprotinina 10 μ gr/ml, pepstatina A 1 μ gr/ml, leupeptina 10 μ gr/ml, PMSF 0,5 mM, OVNa 1 mM, NaF 50 mM; pH 8,1). Mantuvimos esta fracción a una temperatura de -20°C hasta que la utilizamos para los ensayos de *western blot*. Todo el protocolo de extracción fue realizado a 4°C y todos los *buffers* utilizados contuvieron inhibidores de proteasas (aprotinina 10 μ gr/ml, pepstatina A 1 μ gr/ml, leupeptina 10 μ gr/ml y PMSF 0,5 mM) y de fosfatasas (OVNa 1 mM, NaF 50 mM), con el objetivo de mantener a las proteínas en un estado lo más similar posible al que tenían en el momento en que se realizó la extracción.

2.7 Ensayo bioquímico de *Western Blot*

Luego de obtener los extractos enriquecidos en la fracción sinaptoneurosomal, procedimos a evaluar su contenido en proteínas por duplicado a través del kit Micro BCA Protein Assay (Thermo Fischer Scientific).

Realizamos la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS PAGE) y, para ello, sembramos la siguiente mezcla en cada calle de los geles: el volumen de extracto de un animal conteniendo 20 μ gr de proteínas, 5 μ L de *buffer* de siembra (4x: Tris-HCl 0,25 M; SDS 8%; azul de bromofenol 0,1%; glicerol 40%; pH 6,8) y completamos con agua destilada hasta llegar al volumen final de 20 μ L. Incubamos todas las muestras a 95°C por 5 min y las mantuvimos en hielo hasta el momento de sembrarlas en los geles.

Para realizar los geles de poliacrilamida, utilizamos 20% de acrilamida/bisacrilamida (29:1) en el gel resolutivo y 5% en el gel de *stacking*. Una vez sembradas las muestras, éstas corrieron por aproximadamente 30 min a 80 V hasta pasar el gel de *stacking* y luego por 90 min a 120 V en el gel resolutivo (*buffer* de corrida: 24,8

mM Tris base; 192 mM glicina; 0,1% m/v SDS; pH 8,3). Todos los geles incluyeron una muestra de 5 μ L de marcador de peso molecular que corrió en paralelo con las muestras (Precision Plus Protein™, Bio-Rad). Una vez concluida la corrida, electrotransferimos las muestras a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés) por 45 min a 100 V (*buffer* de transferencia: 24,8 mM Tris base; 192 mM glicina; 10% v/v metanol; pH 8,3). Luego de la transferencia, dejamos secar las membranas a temperatura ambiente y las guardamos a 4° C para su posterior uso.

Para la técnica de *western blot*, activamos las membranas con metanol por 1 min, las lavamos con agua destilada por 2 min y luego las incubamos en *buffer* de bloqueo compuesto por 4% p/v albúmina de suero bovino en buffer TTBS (TBS: 50 mM Tris base; 150 mM NaCl; pH 7,4; con Tween 0,1% v/v) por el lapso de 60 min a temperatura ambiente. Luego, incubamos a las membranas en una solución de anticuerpo primario disuelto en una concentración 1:1000 en solución de bloqueo por 24 horas a 4°C. Luego, lavamos las membranas 3 veces durante 5 min en *buffer* TTBS y las incubamos con una solución de anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo, según el caso, acoplados a peroxidasa de rabanito en una concentración 1:5000 en solución de bloqueo por 60 min a temperatura ambiente (ver TABLA 1 para detalle de los anticuerpos utilizados). Posteriormente, lavamos nuevamente las membranas 2 veces durante 5 min en *buffer* TTBS y una vez durante 5 min con *buffer* TBS. Finalmente, procedimos a la detección de la proteína de interés a través de una reacción quimioluminiscente con el kit Clarity Western ECL (Bio-Rad) y digitalizadas utilizando el equipo FUJIFILM-Intelligent Dark Box II y el software “Image Reader LAS-1000”. La intensidad de las bandas inmunoreactivas fue cuantificada utilizando el programa ImageJ 1,29x, del *National Institutes of Health* (NIH, USA).

Realizamos este procedimiento en una primera instancia con los anticuerpos primarios contra P-Cfl1 y el control de siembra de la fracción sinaptoneurosomal GAPDH de manera paralela, ya que las membranas fueron divididas a lo largo, separando las proteínas según su peso molecular (aproximadamente entre los 25 y 30 kDa). Luego, realizamos la remoción de los anticuerpos unidos a las proteínas de la porción de las membranas de menor peso molecular, para poder repetir el proceso de incubación con anticuerpos y detección de la cantidad de Cfl1 total presente en las mismas. Para la remoción, utilizamos un protocolo de *stripping* leve, que incluyó incubar a las membranas

con el *buffer* correspondiente (15 gr/L glicina; 1 gr/L SDS; 1% Tween 20; pH 2,2) dos veces por 5 minutos cada vez. Luego, lavamos dos veces las membranas con PBS por 10 min y repetimos dos veces más con TTBS por 5 min. Terminado este proceso, repetimos los pasos de inmunodetección desde la incubación con *buffer* de bloqueo, utilizando el anticuerpo primario contra Cfl1 total (ver TABLA 1).

Para el análisis de los resultados, todos los valores de densidad óptica obtenidos fueron relativizados a su control (P-Cfl1 fue relativizado a la cantidad de Cfl1 total, y ésta fue relativizada a la cantidad de GAPDH), además de hacerlo con respecto al valor promedio de los animales correspondientes al grupo *naïve* (Na) presentes en cada membrana.

2.8 Cultivo primario de hipocampo y corteza cerebral

Realizamos y mantuvimos cultivos celulares primarios de tejido cortical e hipocampal como ya fue descrito por Aakalu y colaboradores [334]. Brevemente, el tejido hipocampal y cortical fue disecado del cerebro de ratones *Mus musculus* de cepa C57BL/6 de ambos sexos entre los días 0 y 1 luego del nacimiento. Luego, el tejido fue disociado con papaína (Sigma Aldrich) y plaqueado con una densidad de 3×10^3 células/cm² sobre placas de cultivo de fondo de vidrio cubierto con poli-D-lisina (MatTek). Mantuvimos a los cultivos celulares por al menos 14 días, permitiendo su maduración en una cámara con temperatura controlada a 37°C, en un ambiente con 5% de CO₂ en el aire y en medio de crecimiento (Neurobasal-A suplementado con B27 y GlutaMAX-I, Life Technologies), con el objetivo de asegurarnos la maduración sináptica del cultivo. Realizamos todos los experimentos en concordancia con las guías para el Cuidado Animal de Alemania y de la Sociedad Max Planck, aprobadas por autoridades alemanas.

2.9 Hibridación *in situ* de alta definición

Preparamos todos los *buffers* y las soluciones acorde a las recomendaciones del fabricante (Affimetrix QuantiGene ViewRNA kit, Panomics) y a los protocolos descritos previamente por Player y colaboradores [335]. Previamente a realizar los protocolos de hibridación, limpiamos todas las superficies y elementos de trabajo con RNaseZAP (Sigma Aldrich). Preparamos todos los *buffers* y las soluciones con agua desionizada pretratada

con dietilpircarbonato (DEPC; UltraPure™ Thermo Fisher). Las incubaciones se realizaron en una cámara húmeda sin agitación y todas las soluciones conteniendo sondas fueron agregadas en una concentración 1:100 y a una temperatura de 40°C, para favorecer su hibridación.

2.9.1 En células en cultivo

Realizamos el procedimiento previamente descrito por tom Dieck y colaboradores [336]. Brevemente, fijamos células en cultivo (de 21 días *in vitro*) con 4% PFA 4% sacarosa en PBS-MC (PBS suplementado con 1mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂, pH 7,5) por el lapso de 20 min a temperatura ambiente. Luego, lavamos el agente fijador, permeabilizamos las células, las lavamos con PBS y las incubamos con soluciones de sondas contra el ARNm de Cfl1 o de Actb (ViewRNA Cell Probe Sets, Thermo Fisher; VB1-3029190-VC contra ARNm de Cfl1 y VB1-10350-VC contra ARNm Actb) por tres horas a 40°C. Luego, lavamos las células, y procedimos a amplificar la señal generada por las sondas unidas al ARNm: primero, incubamos por el lapso de 1 hora a 40°C para el paso de pre-amplificación y, luego del lavado de las células, se produjo su incubación por 45 min a 40°C para el paso de amplificación. Por último, lavamos las células y las incubamos con sondas marcadas con un fluoróforo excitable a 488 nm (tipo 1) por el lapso de 45 min a 40°C. Luego de lavarlas nuevamente, las células estuvieron listas para pasar por el [protocolo de inmunocitoquímica](#).

2.9.2 En secciones cerebrales

Bajo efecto de la anestesia general, perfundimos a los animales con una solución de 4% PFA 4% sacarosa en PBS 30 minutos después de la re-exposición al contexto de entrenamiento para el grupo Re-Exp, y 24 horas después de la sesión de entrenamiento para el grupo NR. Extrajimos sus cerebros y proseguimos con la fijación en la misma solución por 2 horas a 4°C. Luego, procedimos al proceso de crioprotección del tejido cerebral: incubamos secuencialmente a los cerebros a 4°C, primero en 15% sacarosa en PBS por 4 horas y luego en 30% sacarosa en PBS por 24 horas. Embebimos a los cerebros en Tissue-Tek (Sakura) y los cortamos en un criótomo en secciones de 30 µm de espesor. Lavamos las secciones cerebrales en PBS y las fijamos nuevamente con una solución de

PLP (64,17 mM Lisina, 25 μ M PB, pH 7,4, 4% PFA, 75 mM glucosa) por el lapso de 10 min a temperatura ambiente. Luego de lavarlas con PBS, permeabilizamos las secciones por 20 min a temperatura ambiente y procedimos a incubar con soluciones de sondas contra el ARNm de Cfl1 o de Actb (ViewRNA Cell Probe Sets, Thermo Fisher; VB1-3029190-VC contra ARNm de Cfl1 y VB1-10350-VC contra ARNm Actb) por 24 horas a 40°C. Luego, lavamos las secciones cerebrales nuevamente, y procedimos a amplificar la señal generada por las sondas unidas al ARNm. Primero, realizamos el paso de pre-amplificación y, luego del lavado de las células, realizamos el paso de amplificación (ambos a 40°C y por el lapso de 1 hora cada uno). Por último, lavamos las secciones y las incubamos con sondas marcadas con un fluoróforo excitable a 488 nm (tipo 1) por el lapso de 1 hora a 40°C. Luego de lavarlas nuevamente, las secciones estuvieron listas para pasar por el [protocolo de inmunohistoquímica](#).

2.10 Inmunomarcación

2.10.1 Inmunocitoquímica

Una vez completado el protocolo de hibridación *in situ* de alta definición, incubamos a las células en solución de bloqueo (4% suero de cabra en PBS) por 30 min a temperatura ambiente. Luego, realizamos la inmunomarcación de la manera descrita por Aakalu y colaboradores [334] con los anticuerpos contra MAP2 y GFAP, para marcar dendritas y células gliales, respectivamente (1:1000 cada uno; ver **TABLA 1**). Ambos fueron disueltos en la solución de bloqueo y utilizados en la incubación por el lapso de 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavar las células y de incubarlas con los anticuerpos secundarios conjugados con diferentes fluoróforos por el lapso de 30 min a temperatura ambiente, marcamos los núcleos de las células con una solución de DAPI (Roth, 1 μ g/mL en PBS) por 1 minuto. Luego de lavarlas, montamos las muestras en Aqua Polymount (Polysciences) y procedimos a adquirir series de imágenes de 1024 \times 1024 píxeles de resolución con un microscopio confocal Zeiss LSM 780 usando un objetivo 40 \times de inmersión en aceite (Carl Zeiss, Plan Apochromat, NA 1.4). Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el software ImageJ (NIH).

2.10.2 Inmunohistoquímica

En una primera instancia, lavamos las secciones cerebrales con PBS y las incubamos en solución de bloqueo (4% suero de cabra en PBS) suplementado con 0,5% Triton-X 100 por el lapso de 1 hora a temperatura ambiente. El detergente presente en la solución de bloqueo permite re-permeabilizar las secciones para permitir que los anticuerpos accedan a las proteínas blanco. Luego, lavamos con PBS e incubamos las rodajas por 3 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario contra MAP2 (1:2000; ver TABLA 1) disuelto en solución de bloqueo. Seguidamente, lavamos las secciones con PBS y las incubamos por 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo excitable a 488 nm y DAPI, ambos disueltos en solución de bloqueo. Luego de lavar las secciones, las montamos en Aqua Polymount (Polysciences) a 4°C por el lapso de, al menos, 24 horas. Adquirimos series de imágenes de 1024 × 1024 píxeles de resolución de la subárea CA1 del hipocampo dorsal con un microscopio confocal Zeiss LSM 780 usando un objetivo 20× (Carl Zeiss, Plan Achromat, NA 0,8). Las series de imágenes adquiridas en el eje z incluyeron a todo el espesor de las secciones. Para su debido procesamiento, separamos los diferentes canales de detección de cada imagen y luego los colapsamos en proyecciones de máxima intensidad. Estas proyecciones fueron procesadas utilizando MATLAB. Brevemente, convertimos a imágenes binarias la señal generada por el ARNm detectado gracias a la técnica de hibridación *in situ* de alta definición. Para ello, utilizamos un umbral que se mantuvo constante para las secciones correspondientes a los ratones de los grupos experimental y control. Este umbral se determinó en base a la cantidad de señal emitida por secciones cerebrales que pasaron por ambos protocolos de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, pero no fueron expuestas a las sondas específicas contra ARNm, por lo que sirvieron de control técnico. Disecamos de forma manual las áreas correspondientes a somas y neuropilo, guiándonos únicamente por los canales correspondientes a las señales de marcadores dendríticos (MAP2) y nucleares (DAPI). En ambas áreas, contabilizamos la señal correspondiente al ARNm de Cfl1 o Actb y luego la normalizamos al área total analizada. Para las comparaciones entre los grupos experimentales Re-Exp y NR, utilizamos secciones comparables de la subárea CA1 del hipocampo, en base al atlas de Franklin y Paxinos [312].

Tipo de anticuerpo	Especie del anticuerpo	Proteína/Especie blanco	ID producto	Concentración en <i>buffer</i> de bloqueo
Primario	Conejo	P-Cfl1	CST; #3311	1:1000
Primario	Conejo	Cfl1	CST; #5175	1:1000
Primario	Ratón	GAPDH	SCBT; sc-32233	1:1000
Primario	Cobayo	MAP2	SySy; #188004	1:1000/1:2000
Primario	Gallina	GFAP	Biozol; AVL-GFAP	1:1000

TABLA 1. Detalle de los anticuerpos utilizados en los experimentos descritos en los [Capítulos 3 y 4](#). CST: Cell Signaling Technology; SCBT: Santa Cruz Biotechnology; SySy: Synaptic Systems.

2.11 Estudio sobre la densidad y morfología de las espinas dendríticas

2.11.1 Obtención de las secciones cerebrales

Bajo efecto de la anestesia general, perfundimos a los animales con dos soluciones de concentración creciente de PFA en PBS 24 horas después de la reactivación de la memoria (y en puntos temporales equivalentes para el grupo NR). Primero, la solución utilizada fue de 1% PFA en PBS que fue intercambiada por una solución al 4% cuando la coloración del hígado disminuyó en intensidad. Luego de la perfusión, extrajimos sus cerebros y proseguimos con la fijación en la misma solución por 24 horas a 4°C. Luego, se lavaron los cerebros con PBS fresco y se los mantuvo en PBS con 0,1% azida a 4°C hasta que fueron seccionados.

Posteriormente, seccionamos los cerebros en cortes de 130 µm de espesor utilizando un vibrátomo y los montamos sobre portaobjetos dentro de espaciadores que permitieron la protección de las secciones cerebrales de posibles modificaciones en su estructura tridimensional (9 mm de diámetro y 0,12 mm de espesor, #654008, Grace Bio-Labs). Finalmente, cubrimos las secciones con Vectashield® (Vector Labs) y sellamos el cubreobjetos con esmalte de uñas transparente para evitar pérdida del medio de montaje y se almacenaron las muestras a 4°C hasta adquirir las imágenes confocales.

2.11.2 Adquisición de imágenes confocales de fluorescencia

Se adquirieron imágenes con microscopia confocal de dendritas apicales (de las capas *stratum radiatum* y *lacunosum/moleculare*) y basales (de la capa *stratum oriens*)

de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. Las imágenes de 1024x1024 píxeles fueron adquiridas en aceite de inmersión con un microscopio Olympus FV1000, con un objetivo de 60x (NA 1.42) y 4x de zoom digital. Se excitó a las muestras con un láser de argón que emite a 488 nm y los detectores recibieron luz en el espectro de 505-525 nm, manteniendo el diámetro del *pinhole* en una unidad aérea. Los cortes ópticos fueron de 0,1 μm , logrando un tamaño de vóxel de 50 x 50 x 100 nm. Para la adquisición de las imágenes, se utilizó el filtro de Kalman, promediando dos imágenes para disminuir la señal de *background*. La elección de dendritas se realizó al azar dentro del subgrupo que excluye a las primarias y prioriza a las que se encuentran de forma más superficial en la muestra.

2.11.3 Análisis de la densidad y morfología de las espinas dendríticas

El análisis de las espinas dendríticas consistió, en una primera instancia, en deconvolucionar las imágenes obtenidas en el microscopio confocal, modificando la fluorescencia para mejorar la claridad de las imágenes a través de un algoritmo 3D (PSF Generator y DeconvolutionLab2, ImageJ, NIH) [337]. Luego, se identificó cada espina de forma individual en un análisis automatizado a través del programa Neuronstudio (<http://research.mssm.edu/cnic/tools-ns.html>), utilizando como parámetros una altura mínima de 0,2 μm , altura máxima de 3 μm y ancho máximo de 3 μm . Se evaluó el tipo de espina, su volumen, largo total y diámetro del cuello (para las espinas del tipo *thin* y *mushroom*) y de la cabeza. Además, el programa mencionado midió el largo total de la dendrita evaluada en cada imagen, que luego fue utilizado para obtener la densidad de las espinas dendríticas. Para la clasificación de las espinas en los tipos *thin*, *mushroom* y *stubby* se utilizaron los parámetros descriptos en la TABLA 2 [338–341]. Para todos los análisis (de densidad y variables morfométricas) se consideró el hemisferio del que fue extraída la imagen de cada dendrita.

Criterios de clasificación	Tipo de espina		
	<i>thin</i>	<i>mush</i>	<i>stub</i>
Relación mínima de 0,8 entre el diámetro de la cabeza y el cuello	✓	✓	✗
Relación mínima de 2 entre el largo de la espina y el diámetro de su cabeza	✓	✗	✗
Diámetro mínimo de la cabeza de 0,35 μm	✗	✓	✗

TABLA 2. Criterios de clasificación para las espinas identificadas a través del programa Neuronstudio en las categorías *thin*, *mushroom* (*mush*) y *stubby* (*stub*).

2.12 Análisis de datos y estadística

Excepto cuando fue explicitado debidamente, todos los datos fueron analizados por Modelos Lineales Mixtos con medidas repetidas. Para la correcta elección del modelo de estructura de varianza, utilizamos el criterio de información de Akaike. Para realizar comparaciones múltiples entre grupos, utilizamos el *test* de Šídák (InfoStat 2016, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Para los experimentos que involucraron sesiones de extinción (EXT en la [sección 3.3](#)), los datos comportamentales de tales sesiones fueron evaluados de manera independiente a los datos del resto de las sesiones de esos experimentos, debido a que no todos los grupos pasaron por el proceso de extinción de la memoria. Para el análisis intra-sesión de extinción, se tuvieron en cuenta dos valores de porcentaje de comportamiento de *freezing*: el primero colapsó los datos comportamentales de los primeros 5 minutos de la sesión, para evaluar la retención de la memoria original a largo término; y el segundo colapsó los datos comportamentales de los últimos 5 minutos de la sesión, para evaluar la adquisición de la memoria de extinción.

Las Figuras fueron diseñadas con Inkscape™. Los datos se muestran como promedio estadístico \pm error estadístico estándar (SEM, por sus siglas en inglés). Cuando es indicado, * significa un valor $p < 0,05$; **, un valor $p < 0,01$; y ***, un valor $p < 0,001$.

Capítulo 3. Estudio del rol de LIMK, Cfl1 y la dinámica del citoesqueleto de actina en consolidación, labilización, reconsolidación y extinción de la memoria de miedo en el ratón *Mus musculus*

3.1 Labilización y Reconsolidación de la memoria

Como expliqué anteriormente, a partir de un recordatorio de características específicas una memoria consolidada puede sufrir un proceso de labilización en el que resulta pasible de ser modificada. A partir de esta labilización, la traza mnésica puede atravesar un proceso de re-estabilización, llamado reconsolidación de la memoria [80, 342]. Estudios previos han relacionado a LIMK, Cfl1 y la dinámica de actina con estos procesos de memoria generados a partir de un evento de reactivación de la misma [271–273]. Más allá de los trabajos que han estudiado el rol de la vía de LIMK y Cfl1, éste aún no es del todo claro en los procesos de labilización y reconsolidación de la memoria de miedo.

3.1.1 Nivel de activación de Cfl1 en la Labilización/Reconsolidación de la memoria

En una primera instancia, nos propusimos dilucidar si el nivel de activación de la Cfl1 varía a partir de la reactivación de la memoria de miedo en el hipocampo dorsal de los ratones. Para ello, entrenamos ratones C57BL/6 en el paradigma de condicionamiento de miedo contextual. Brevemente, introdujimos a los mismos en un contexto específico que era novedoso para los animales y, luego de un período de habituación, les administramos tres *shocks* eléctricos, protocolo que es suficiente para que se forme una asociación a largo término entre los mismos y el contexto (sesión de entrenamiento; para detalles, ver la sección [Materiales y Métodos](#); [91]). Luego, dividimos de manera aleatoria a los animales en diferentes grupos. Algunos fueron expuestos nuevamente al contexto de entrenamiento por un período de 5 minutos (sesión de reactivación), protocolo que ha sido utilizado con anterioridad para provocar la labilización/reconsolidación de la

memoria original [91, 92], y luego sacrificados por dislocación cervical a diversos tiempos luego de la reactivación (0, 15, 30 min; FIGURA 9 A). Otro grupo de animales no fue expuesto nuevamente al contexto de entrenamiento (grupo NR) pero fue sacrificado en momentos equivalentes a los correspondientes al resto de los grupos experimentales. Por último, también trabajamos con un grupo de animales *naïve*, que no fue no entrenado ni expuesto al contexto de entrenamiento. Estos dos últimos grupos fueron considerados grupos control.

Luego de su sacrificio, disecamos el hipocampo entero de cada animal y realizamos extractos enriquecidos en la fracción sinaptoneurosomal, que incluye estructuras tanto pre- como postsinápticas, como puede observarse en la FIGURA 8 [333]. Luego de la purificación, analizamos la cantidad y el nivel de activación de la proteína Cfl1 de cada grupo experimental a través de la técnica de *Western blot*. Para analizar la cantidad total de la proteína, utilizamos un anticuerpo que reconoce tanto a la Cfl1 fosforilada como a la no fosforilada y, además, incluimos un control de carga ampliamente utilizado en este tipo de extractos debido a su abundancia, la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) [343, 344]. En cambio, para evaluar los niveles de activación de la Cfl1, usamos otro anticuerpo que detecta a las moléculas de la proteína Cfl1 únicamente si están fosforiladas en la serina 3. Diversos estudios coinciden en que la fosforilación de la Cfl1 en este residuo específico es una modificación necesaria para disminuir los niveles de su actividad despolimerizante sobre el citoesqueleto [276, 345, 346]. De esta manera, al relativizar la cantidad de Cfl1 fosforilada con respecto a la cantidad de la proteína total, logramos obtener una medida directamente relacionada con su nivel de activación [273].

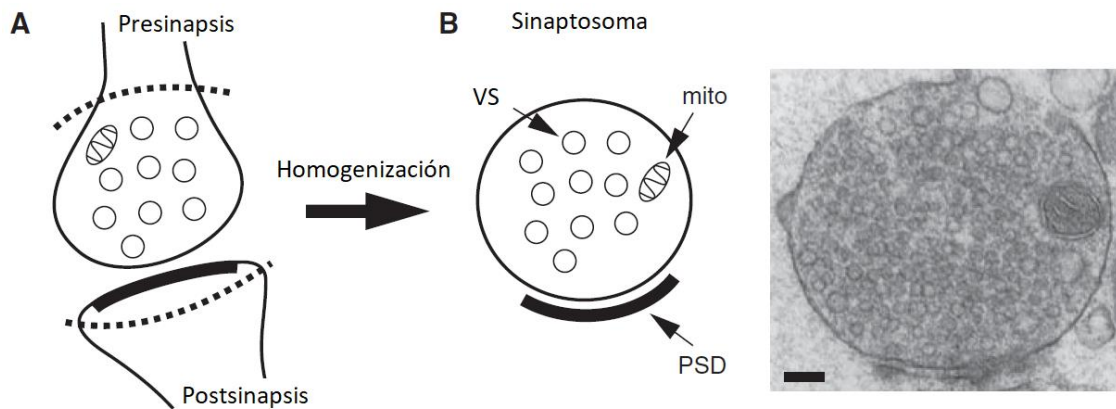


FIGURA 8. Preparación y composición del sinaptoneurosoma. **(A)** Representación esquemática de una sinapsis. La línea punteada indica por dónde se escinden la pre y postsinapsis a partir de la homogenización del tejido, formando el sinaptoneurosoma **(B, panel izquierdo)**. Esquema de un sinaptoneurosoma. VS: vesículas sinápticas; mito: mitocondrias; PSD: densidad postsináptica, por sus siglas en inglés. **(B, panel derecho)** Micrografía electrónica de un sinaptoneurosoma de cerebro de rata. Escala, 100 nm. (Figura adaptada de Evans, 2015 [347]).

Cuando se realizan protocolos comportamentales que involucran estímulos aversivos, los animales sujetos a esos experimentos suelen mostrar un rango de respuestas que varían desde movimientos con gran aceleración (saltos y corridas) hasta movimientos imperceptibles, de quietud casi total [330]. Son estos últimos los tipos de comportamiento que se encuentran con mayor asiduidad en el abanico de respuestas comportamentales expresadas por animales bajo protocolos de miedo [348]. Específicamente, la medida del porcentaje del tiempo total que pasan los ratones sin ejecutar ningún movimiento, además de los necesarios para respirar, es llamada *freezing* en inglés y es un comportamiento estereotipado que, a lo largo del este trabajo, será utilizado como medida operativa de la memoria de miedo. Se sabe que existe una relación directa entre el porcentaje del tiempo en el que se observa este comportamiento y la fuerza de la traza mnésica formada a partir del condicionamiento [331]. Vale destacar que el comportamiento de *freezing* no es la única medida que puede utilizarse para la cuantificación del nivel de miedo en los sujetos experimentales. Con ese mismo objetivo, pueden utilizarse medidas como cambios en la presión arterial, en la respiración o en la liberación de hormonas relacionadas con el estrés (revisado por LeDoux [134]). En este trabajo tomamos al comportamiento de *freezing* como única medida para evaluar la

fuerza de la asociación entre el contexto y los *shocks* eléctricos, ya que no es invasiva, y da la posibilidad de cuantificación sin manipulación extra a los animales.

Como se observa en la **FIGURA 9 B**, todos los grupos muestran niveles de *freezing* bajos durante los minutos previos al primer *shock* en la sesión de entrenamiento y, además, éstos se ven aumentados durante la re-exposición al contexto condicionado, 24 horas después. Lo primero implica que los animales no presentan un comportamiento de miedo al contexto *per se*, previo a la presentación de los estímulos aversivos. Lo segundo indica que, luego de presentar la contingencia entre el contexto (CS) y el *shock* (US), los ratones aprendieron y retuvieron a largo plazo -al menos 24 horas- esta asociación, mostrando un comportamiento característico de respuesta de miedo (CR). Es decir, la codificación neuronal que corresponde a esa asociación se formó y perduró hasta el momento en que los animales fueron enfrentados nuevamente al contexto, donde evocan y reactivan esa memoria.

Con respecto a los resultados en los que medimos la cantidad total de proteína Cfl1 presente en el hipocampo de ratones luego de la reactivación de la memoria (Cfl1 total), pudimos observar que ningún grupo experimental re-expuesto al contexto de entrenamiento presentó diferencias significativas con respecto al grupo NR, cuya memoria no fue reactivada ($p = 0,9866$, $p = 0,9493$ y $p = 0,9400$, para 0 min, 15 min y 30 min, respectivamente; **FIGURA 9 C y D**).

Sin embargo, evaluando los resultados correspondientes al nivel de activación de la proteína Cfl1 en el hipocampo luego de la reactivación de la memoria (índice P-Cfl1/Cfl1 total), observamos un aumento significativo en la fosforilación relativa a su cantidad total 30 minutos después de la re-exposición al contexto, en comparación a animales control NR ($p = 0,0033$). En cambio, inmediatamente y 15 minutos después de la reactivación de la memoria no parecería producirse ningún cambio significativo en lo que respecta al nivel de fosforilación de Cfl1 en comparación al grupo NR ($p = 0,8263$ y $p = 0,7026$, respectivamente; **FIGURA 9 C y E**).

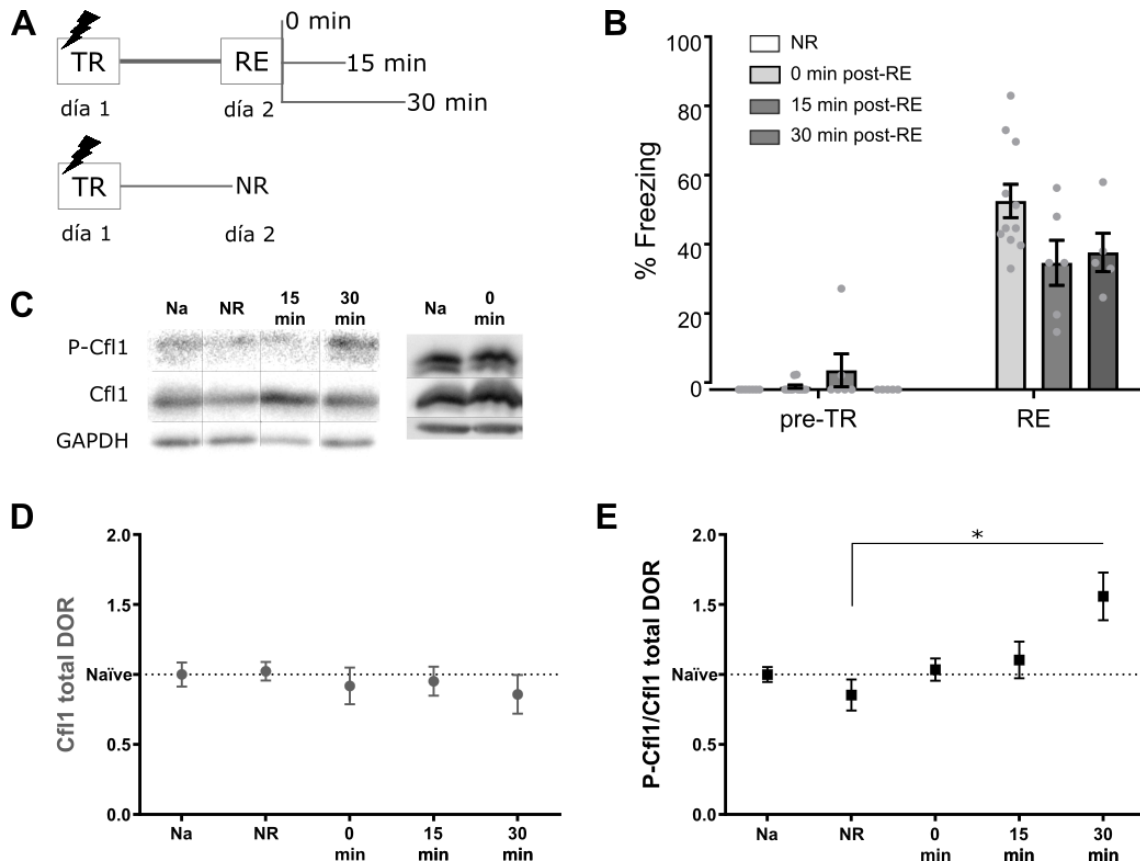


FIGURA 9. El nivel de activación de Cfl1 se encuentra inhibido después de la reactivación de la memoria contextual de miedo. **(A)** Diseño experimental para la extracción hipocámpal de los ratones 0, 15 y 30 minutos después de la reactivación de la memoria. Los hipocámpos de los animales correspondientes a los grupos control *naïve* (Na) y no reactivados (NR) fueron extraídos en puntos temporales equivalentes a los de los demás grupos experimentales, de forma intercalada. TR: sesión de entrenamiento; RE: re-exposición de 5 min al contexto de entrenamiento. **(B)** Porcentaje del tiempo total en el que los ratones expresan comportamiento de *freezing* durante las sesiones de pre-TR (exposición de 2 min al contexto de entrenamiento para establecer el nivel de *freezing* basal) y RE. $n=5-17$. Análisis del grupo 0 min: prueba de *t* pareada entre pre-TR y RE: $t=11,51$, $df=10$, $p < 0,0001$; de los grupos 15 y 30 min: ANOVA de 2 factores y medidas repetidas: factor grupo: $F_{1,9}=0,04$, $p = 0,8425$; factor tiempo: $F_{1,9}=94,26$, $p < 0,0001$; factor sujeto: $F_{9,9}=2,94$, $P = 0,0621$, interacción: $F_{1,9}= 1,38$, $p = 0,2707$. **(C)** Imágenes representativas de bandas de *Western blot* de P-Cfl1, Cfl1 y GAPDH. **(D y E)** Niveles de densidad óptica relativa (DOR) de Cfl1 total **(D)** y el cociente P-Cfl1/Cfl1 total **(E)** en extractos hipocámpales enriquecidos en su fracción sinaptoneurosomal de animales no reactivados (NR) y animales sacrificados a los 0, 15 y 30 min después de la reactivación de la memoria. Los valores están expresados en unidades arbitrarias relativas a la densidad óptica de GAPDH (en **C**) y a los valores correspondientes al grupo *naïve* (en **D y E**). $n=5-17$. Factor grupo: $F_{3,44}=1,46$, $p = 0,2373$; factor variable: $F_{1,44}=5,72$, $p = 0,0211$; interacción: $F_{3,44}= 4,21$, $p = 0,0106$; contraste entre P-Cfl1/Total Cfl1: NR vs 30 min: $F_{1,44}=13,88$, $p = 0,0033$.

Estos resultados nos indican que, al igual que en el modelo de rata [273], media hora después de una sesión de re-exposición al contexto de entrenamiento que produce la reactivación de la traza de memoria original, se produce un aumento en la fosforilación de la proteína Cfl1, no así en su cantidad total. Es decir, se produce la inhibición de la

actividad despolimerizante y de corte de la Cfl1 sobre el citoesqueleto de actina, favoreciendo su estabilización.

3.1.2 Perfil del ARNm de Cfl1 y β -actina en la subárea CA1 hipocampal luego de la reactivación de la memoria

El mecanismo que permite a la enzima LIMK regular la actividad de Cfl1 -la fosforilación específica de uno o más aminoácidos que genera un cambio conformacional específico que deriva, a su vez, en una disminución de la efectividad en su actividad- ha sido observado y estudiado en diferentes tipos celulares [276, 278, 282, 307, 349–352]. Las modificaciones postraduccionales, al generar un cambio conformacional en la proteína o complejo proteico, permiten modular su actividad, ya sea haciendo menos accesible su sitio activo o generando señales intracelulares de reciclado de esa molécula [353–356]. Sin embargo, además de la regulación del estado de activación de una enzima a través de la fosforilación diferencial, esta modulación se puede lograr a partir de una variación en la accesibilidad de moléculas de ARNm por parte de las enzimas polimerasas para su traducción. La homeostasis neuronal se alcanza no sólo a partir de la regulación del funcionamiento de los mecanismos de transcripción de genes específicos, sino que el transporte de sus ARNm a compartimentos neuronales específicos [44, 357] y el desenmascaramiento de moléculas de ARNm que previamente estaban unidas a proteínas de unión a mensajero juegan un papel esencial en el equilibrio neuronal [358]. De esta manera, regular la cantidad de ARNm disponible para traducir localmente le proporciona a la célula no sólo la ventaja de que el mensajero que se transporta será amplificado en el compartimento blanco, sino que permite una respuesta local a estímulos específicos de manera rápida por parte la célula [359].

A partir del experimento descrito en la [sección anterior](#) de este primer capítulo, en el que evaluamos el nivel de activación de Cfl1 en la labilización/reconsolidación de la memoria, postulamos que a partir de la reactivación de la memoria contextual de miedo se produce una disminución de la actividad de Cfl1 en el hipocampo. Considerando nuestros resultados, nos propusimos investigar si, en efecto, la reactivación de una memoria de miedo contextual podía generar también cambios en la disponibilidad traduccional de las moléculas de ARNm de Cfl1 y β -actina (Actb).

En una primera instancia, previo a evaluar posibles cambios en su disponibilidad traduccional, se hizo necesario evaluar la presencia de ARNm de Cfl1 y Actb en distintos compartimentos subcelulares, además del soma neuronal [360, 361]. Se han reportado evidencias de ARNm de Actb y Cfl1 presente en axones [362, 363] y dendritas [364, 365]. Además, el ARNm de Cfl1 se ha encontrado en neuropilo [366] y contiene una señal de transporte al núcleo que se “desenmascara” a través de un cambio conformacional sensible a la temperatura [361]. Para llevar adelante este objetivo utilizamos cultivos primarios de hipocampo y corteza de ratones *Mus musculus* de la cepa C57BL/6. Brevemente, luego de fijar las células en cultivo, procedimos a realizar hibridación *in situ* de alta resolución (FISH, por sus siglas en inglés) utilizando sondas que hibridan específicamente con el ARNm de Cfl1 o de Actb, respectivamente, cuya señal se amplifica hasta acoplarla a un fluoróforo para su detección. Posteriormente, realizamos inmunocitoquímica de fluorescencia sobre los cultivos fijados para poder diferenciar las proyecciones dendríticas neuronales de las proyecciones de células gliales. Como resultado de este procedimiento, encontramos moléculas de ambos ARNm en somas, dendritas y axones de neuronas, a la vez que en somas y proyecciones de células gliales (FIGURA 10), de manera consistente con estudios previos [367–369].

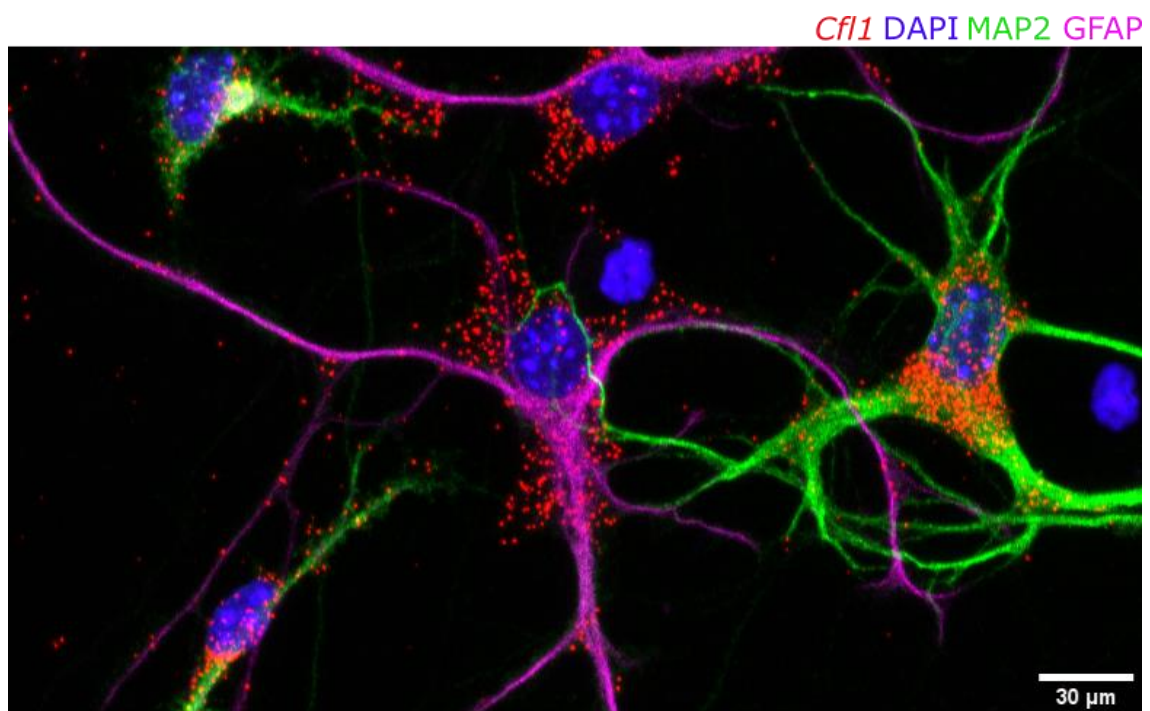


FIGURA 10. Cultivo primario de corteza e hipocampo de ratón. Se muestran los resultados de FISH de alta resolución contra ARNm de Cfl1, inmunocitoquímica contra MAP2 (marcador dendrítico) y GFAP (marcador glial), y tinción nuclear con DAPI.

En base a estos resultados, nos dispusimos a investigar la posibilidad de que la reactivación de una memoria contextual de miedo tenga un efecto sobre la distribución de los ARNm de Cfl1 y Actb en compartimentos subcelulares de las neuronas de región CA1 hipocampal. A diferencia de los estudios realizados *in vitro* y debido a las limitaciones de la sensibilidad del método utilizado en secciones cerebrales, no fue posible diferenciar la cantidad de ARNm en proyecciones dendríticas y axonales. Por lo tanto, decidimos comparar la cantidad observada en la capa compuesta por somas con la observada en la capa del neuropilo, entre animales cuya memoria fue reactivada y animales no re-expuestos al contexto de entrenamiento. El neuropilo comprende terminales axónicos y dendritas (junto con sus ramificaciones y conexiones sinápticas), además de células gliales [370].

Considerando el resultado descrito en la [sección anterior](#), en el que observamos un aumento en la fosforilación de la proteína Cfl1 media hora después de la sesión de reactivación de la memoria, nuestra hipótesis sostiene que luego de la reactivación de la memoria la cantidad de ARNm de Cfl1 disponible a ser traducido en el neuropilo de la CA1 hipocampal debería disminuir. Esta regulación traduccional sería consecuente con la disminución en la actividad despolimerizante y de corte del citoesqueleto que posee la enzima. Por otro lado, la cantidad de ARNm de Actb disponible a ser traducido debería aumentar en el neuropilo, ya que la estabilización del citoesqueleto implica un aumento en la tasa de polimerización del citoesqueleto de actina y, en consecuencia, una disminución en el *pool* de G-actina disponible a polimerizar. Para comprobar ambas hipótesis, una cohorte de animales fue entrenada para generar una memoria contextual de miedo, de la misma forma que ya fue descrito en secciones anteriores. Luego, los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos: un grupo fue re-expuesto al contexto de entrenamiento por 5 minutos (Re-Exp) y el otro grupo no fue re-expuesto (NR), sirviendo de control (**FIGURA 11 A**). Todos los animales fueron sacrificados 30 minutos después de la reactivación de la memoria del primer grupo, ya que en este punto

temporal se había observado con anterioridad la disminución significativa en el nivel de activación de Cfl1 hipocampal ([sección 3.1.1](#), FIGURA 9 C Y E).

Durante los primeros dos minutos de la sesión de entrenamiento no se observaron diferencias entre los niveles de *freezing* correspondientes a ambos grupos, dado que éstos fueron nulos (pre-TR en FIGURA 11 B). Además, los animales cuya memoria fue reactivada modificaron significativamente su comportamiento 24 horas después del entrenamiento, ya que aumentaron los niveles de *freezing* durante la sesión de re-exposición (media de 70,56 %; SEM de 8,18 %; n = 3 animales re-expuestos; prueba de t pareada entre pre-TR y RE: $t = 8,62$, $df = 2$, $p = 0,0132$). Esto indica que los animales generaron una memoria a largo término, que sería pasible de reactivación por la sesión de re-exposición de 5 minutos al contexto de entrenamiento (RE en FIGURA 11 B).

Una vez que todos los animales fueron sacrificados, sus cerebros fijados y cortados en secciones coronales del hipocampo dorsal, evaluamos la cantidad de ARNm de Cfl1 y Actb en las capas de somas y de neuropilo de la región CA1 de cada sección hipocampal. Como se puede observar en la FIGURA 11 (C, D Y E), la cantidad de ARNm de Cfl1 presente en el neuropilo en los animales Re-Exp muestra una disminución significativa del 52,5% con respecto al grupo control NR ($p = 0,0140$), diferencia que no se observa contrastando la capa de somas neuronales de los mismos grupos (7,6%; $p = 0,6101$).

En cambio, en las cantidades de ARNm de Actb presentes en el hipocampo de ratones Re-Exp comparados con animales control NR se observa una tendencia en la dirección opuesta: tanto la capa de somas neuronales, como el neuropilo, presenta un aumento en la cantidad de ARNm de Actb a partir de la reactivación de la memoria. Este aumento fue significativo en la capa de somas, donde la cantidad de moléculas en la región CA1 de animales Re-Exp superó el doble de la cantidad presente en la región CA1 de animales control NR (234,7%; $p = 0,0064$), mientras que en la capa correspondiente al neuropilo el aumento fue más moderado (147%; $p = 0,4244$; FIGURA 11 C, D Y F).

En conclusión, y en concordancia con nuestra hipótesis inicial, a partir del estudio de secciones coronales de la región CA1 hipocampal de animales cuya memoria fue reactivada, pudimos observar una disminución significativa en la cantidad de ARNm de Cfl1 en la capa del neuropilo y un aumento significativo de ARNm de Actb en la capa de

los somas neuronales en comparación con las cantidades observadas en secciones de animales control no re-expuestos al contexto de entrenamiento.

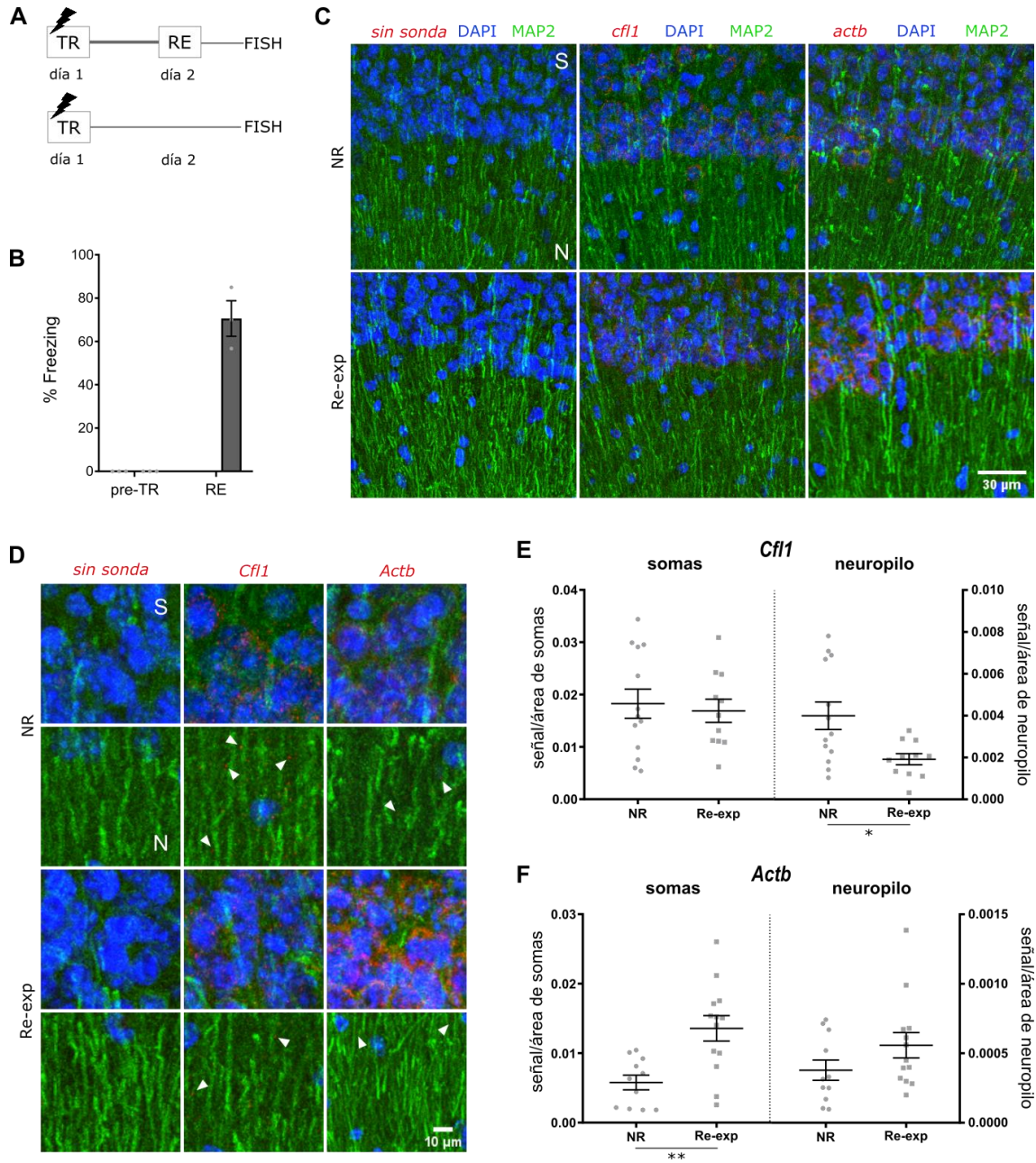


FIGURA 11. Perfil de los niveles de ARNm de *Cfl1* y *Actb* en la CA1 hipocámpal después de la reactivación de la memoria de miedo. **(A)** Diseño experimental para la parte comportamental del experimento, previo a la obtención de las secciones del hipocampo. Los ratones del grupo Re-Exp fueron sacrificados 30 min después de la re-exposición al contexto de entrenamiento y los del grupo NR en puntos temporales equivalentes. TR: sesión de entrenamiento; RE: re-exposición de 5 min al contexto de entrenamiento. **(B)** Porcentaje del tiempo total en el que los ratones expresan comportamiento de *freezing* durante las sesiones de pre-TR (exposición de 2 min al contexto de entrenamiento para establecer el nivel de *freezing* basal) y RE. **(C y D)** Imágenes representativas de secciones coronales de la región CA1 del hipocampo de ratones re-expuestos (Re-Exp) y no re-expuestos (NR) al contexto de entrenamiento. Se realizó FISH de alta resolución contra ARNm de *Cfl1* y de *Actb*, inmunohistoquímica contra MAP2 (como marcador dendrítico)

y tinción nuclear con DAPI. Se muestran las capas de somas (S) y neuropilo (N) de la CA1. Las cabezas de flecha marcan ejemplos de señal de ARNm dentro de la capa de neuropilo. **(E y F)** Cuantificación de la señal de ARNm de Cfl1 (en **E**) y Actb (en **F**) relativa al área calculada de somas (panel izquierdo) o neuropilo (panel derecho). n=11-13 secciones de 3 ratones por grupo. Para Cfl1: Factor grupo: $F_{1,4}=9,76$, $p = 0,0354$; factor área: $F_{1,40}=49,42$, $p < 0,0001$; interacción: $F_{1,40} = 0,005$, $p = 0,9695$. Contraste dentro del neuropilo: NR vs Re-exp: $F_{1,40}=6,60$, $p = 0,0140$. Para Actb: Factor grupo: $F_{1,4}=8,31$, $p = 0,0449$; factor área: $F_{1,40}=47,35$, $p < 0,0001$; interacción: $F_{1,40} = 8,17$, $p = 0,0067$. Contraste dentro de los somas: NR vs Re-exp: $F_{1,40}=8,27$, $p = 0,0064$.

3.1.3 LIMK en la Reconsolidación de la memoria

En base a los resultados descritos en las secciones anteriores de este capítulo, que indican que a partir de la reactivación de una memoria de miedo contextual disminuye tanto el nivel de activación de la proteína Cfl1 como la disponibilidad de su ARNm para ser traducida en neuropilo, y teniendo en cuenta resultados previamente reportados en otro modelo [272], como paso siguiente nos propusimos probar la hipótesis que sostiene que la inhibición de la vía de modulación de la actividad de Cfl1 tiene un efecto sobre el proceso de reconsolidación de la memoria de miedo contextual en ratones.

Para evaluar esta hipótesis, utilizamos la droga BMS-5, un compuesto inhibidor del principal modulador de la actividad de Cfl1, LIMK. Inferimos entonces que la droga, al disminuir la actividad de LIMK, está indirectamente aumentando la capacidad despolimerizante y de corte de Cfl1 sobre el citoesqueleto de actina [272, 282, 351, 371–373]. Para lograr una administración local y bilateral del compuesto en la zona de interés, el hipocampo dorsal, utilizamos la técnica de implantación permanente de cánulas en el cerebro previo a la implementación del protocolo comportamental (

FIGURA 12). Elegimos esta técnica por sobre la inyección aguda con el objetivo de permitir la administración de soluciones en una zona específica del cerebro sin necesidad de anestesiarse a los animales durante el protocolo experimental. Esta ventaja es esencial, dado que las drogas administradas como anestésicos pueden tener efectos a largo plazo sobre los procesos de memoria y la plasticidad de las conexiones sinápticas que se estudian en este trabajo [374–380]. Luego de cinco días de recuperación post-cirugía, manipulamos a los animales de la misma manera que se describió en los experimentos anteriores. Entrenamos a los animales operados utilizando el paradigma de

condicionamiento de miedo contextual y, 24 horas más tarde, expusimos nuevamente a los animales al contexto de entrenamiento por un período de 5 minutos.

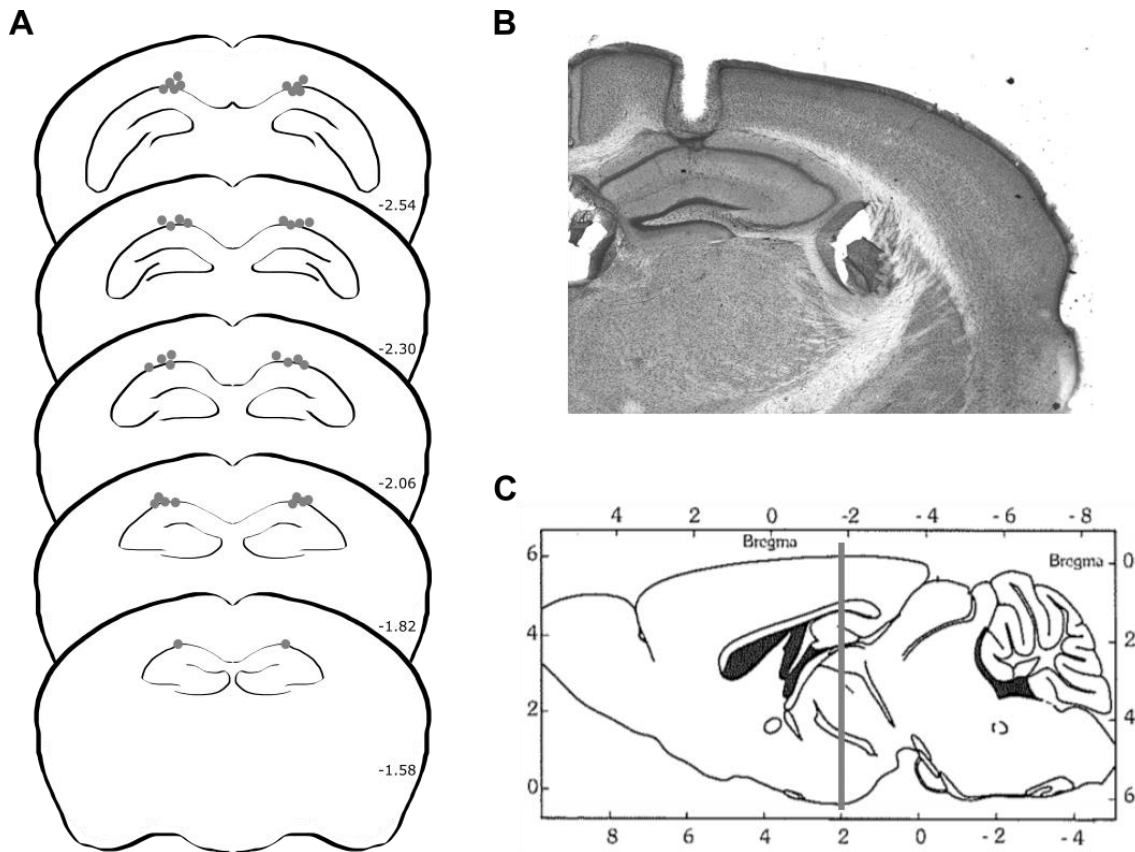


FIGURA 12. Los animales fueron implantados con cánulas de manera bilateral teniendo como objetivo la posibilidad de inyección de una solución de droga o vehículo en animales que no estén bajo el efecto de anestesia. **(A)** Dibujo esquemático de secciones coronales del cerebro de ratones representando la zona blanco de la operación, el hipocampo dorsal (-1,58 a -2,54 en dirección antero posterior desde el bregma). Los círculos grises representan las zonas en donde se ubicaron las cánulas de todos los animales que se utilizaron en el experimento. **(B)** Imagen en escala de grises de una sección coronal unilateral del cerebro de un ratón canulado bilateralmente, que fue fijada y teñida con hematoxilina-eosina para evidenciar la zona cerebral en la que fue canulado el animal. **(C)** Dibujo esquemático que representa una sección sagital del cerebro de ratón. La línea gris representa la coordenada de canulación en el eje antero posterior, a la misma altura en que se observa la imagen en B (-1,9 del bregma). Adaptado del atlas de Franklin and Paxinos [381].

Inmediatamente después de la sesión de re-exposición al contexto de entrenamiento, los animales fueron asignados aleatoriamente a cuatro grupos experimentales: inyectados bilateralmente en el hipocampo dorsal con una solución de BMS-5 (grupo BMS) en distintas concentraciones (10, 100 y 500 μM) o la solución

vehículo (grupo Veh). Elegimos este punto temporal para la inyección debido a que permite que la droga alcance a las células hipocampales lo antes posible luego de la reactivación de la memoria, a la vez que permite que el proceso de evocación no se vea potencialmente afectado por la droga en cuestión. Para poder evaluar la retención de la memoria a largo término, todos los animales fueron expuestos nuevamente al contexto de entrenamiento (TS) y se observó su comportamiento, cuantificando el porcentaje del tiempo total en el que mostraban un comportamiento de *freezing* (FIGURA 13 A).

En la FIGURA 13 B se puede observar que los animales presentaron niveles bajos de *freezing* durante el pre-TR. Además, 24 horas después del condicionamiento, en el momento de la re-exposición al contexto de entrenamiento, todos los grupos presentaron niveles de *freezing* mayores a los del preTR (aumentando en promedio 7,7 veces) y además no presentaron diferencias entre sí (interacción grupo x tiempo: $p = 0,4705$).

Considerando que la labilización de la memoria implica una desestabilización parcial de la traza que originalmente codificó para la memoria de miedo generada en el condicionamiento inicial, si el tratamiento tuviese un efecto sobre este proceso de la memoria, ésta no se vería afectada, ya que no sería susceptible a ningún tipo de cambio o actualización (revisado por Almeida-Corrêa y Amaral [382]). Si este fuera el caso, al evaluar a los animales en el contexto de entrenamiento luego del tratamiento, se evidenciaría la presencia de la memoria de asociación original, al igual que en el grupo control inyectado con solución vehículo. En cambio, si el tratamiento tuviese un efecto sobre la reconsolidación de la memoria, su estabilidad se vería comprometida, debido a que esta etapa es la que re-estabiliza ese código original que permitió la formación y retención de la memoria. Por lo tanto, si la droga afectase este proceso, al evaluar a los animales en el contexto de entrenamiento, se observaría algún grado de deficiencia en su re-estabilización provocado por la droga. Es decir, se evidenciaría un déficit en la retención de la memoria en comparación con los animales control, que presentarían un nivel de retención mayor.

Los animales inyectados inmediatamente después de la reactivación de la memoria con las concentraciones de 10, 100 y 500 μM BMS-5, durante la sesión de evaluación no presentan diferencias significativas con respecto al grupo de animales

inyectado con solución vehículo (FIGURA 13 B, TS; interacción grupo x tiempo: $p = 0,4705$). Esto indicaría que, al menos, bajo estos parámetros, la inhibición de la actividad de LIMK a través de la administración de la droga BMS-5 en el hipocampo dorsal no tiene un efecto en la reconsolidación de la memoria contextual de miedo.

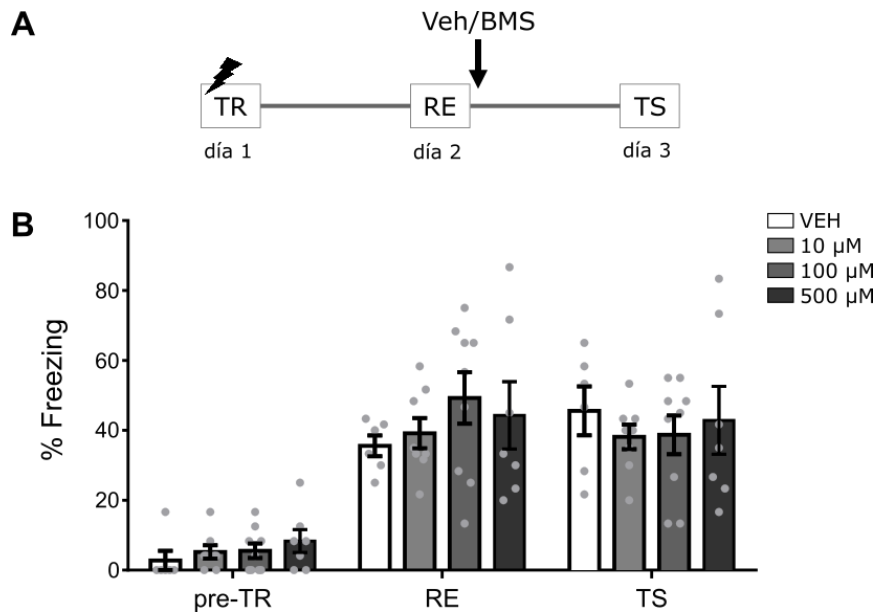


FIGURA 13. La inhibición de LIMK en el hipocampo dorsal inmediatamente después de la reactivación de la memoria no tiene un efecto sobre el proceso de reconsolidación de la memoria. **(A)** Diseño experimental para el protocolo de entrenamiento e inyección de la solución de BMS-5 (BMS) o vehículo (Veh), inmediatamente después de la reactivación. TR: sesión de entrenamiento; RE: re-exposición de 5 min al contexto de entrenamiento; TS: sesión de evaluación de 5 min al contexto de entrenamiento. **(B)** Porcentaje de *freezing* de animales inyectados con soluciones de diferente concentración de BMS-5 o vehículo. pre-TR: exposición de 2 min al contexto de entrenamiento para establecer el nivel de *freezing* basal; $n=6-9$. Factor tiempo: $F_{2,52}=143,36$, $P < 0,0001$; factor droga: $F_{1,48}=0,18$, $p = 0,9111$; interacción: $F_{6,52} = 0,95$, $p = 0,4705$.

Considerando que las dosis administradas con anterioridad no habían tenido un efecto que podamos registrar en el proceso de reconsolidación de la memoria, aumentamos la concentración de la solución a inyectar inmediatamente después de la reactivación de la memoria a 10 mM BMS-5 y realizamos un grupo control en paralelo,

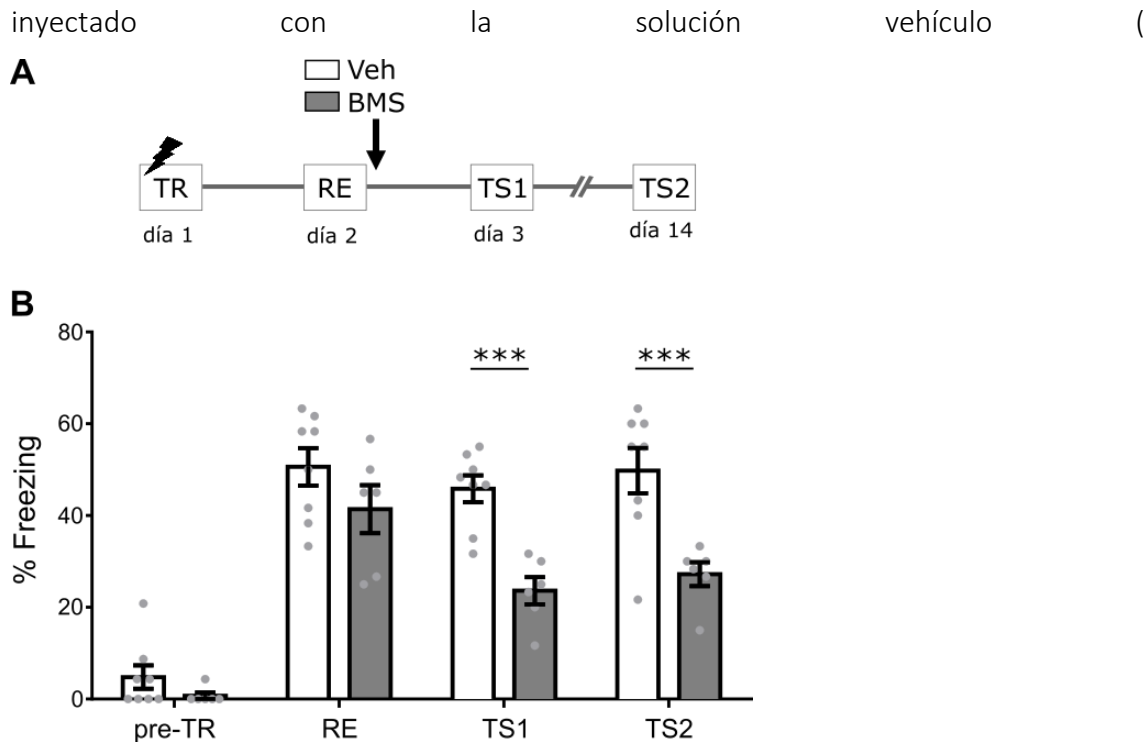


FIGURA 14 A). Se puede observar en la FIGURA 14 B que, como en el experimento anterior, los valores de *freezing* durante el pre-TR fueron al menos 10 veces menores a los de la sesión de RE, indicando un buen nivel de retención de la memoria de miedo 24 horas después del entrenamiento. Durante la sesión de RE, el comportamiento de *freezing* no presentó diferencias entre grupos ($p = 0,3705$). Al contrario del experimento anterior, la inyección de una solución de 10 mM BMS-5 en el hipocampo dorsal inmediatamente después de la reactivación de la memoria generó una disminución significativa en el comportamiento de *freezing* presentado durante la sesión de evaluación (TS1) por los animales BMS en comparación con los inyectados con solución vehículo ($p = 0,0006$). Esta diferencia en el comportamiento durante la sesión de evaluación entre ambos grupos da cuenta de un impedimento en re-estabilización de la traza mnésica generado por la administración de la droga luego de la reactivación de la memoria contextual de miedo debido a que esta reactivación parecería haber producido la labilización de la memoria original, pero la etapa de reconsolidación de la memoria no fue exitosa parcial o totalmente.

Con el objetivo de evaluar si este impedimento en la re-estabilización de la memoria contextual se mantiene a largo término, se reevaluaron a todos los animales 14 días después del entrenamiento (TS2), observando una diferencia entre grupos

equivalente a la previamente evidenciada en la primera evaluación (

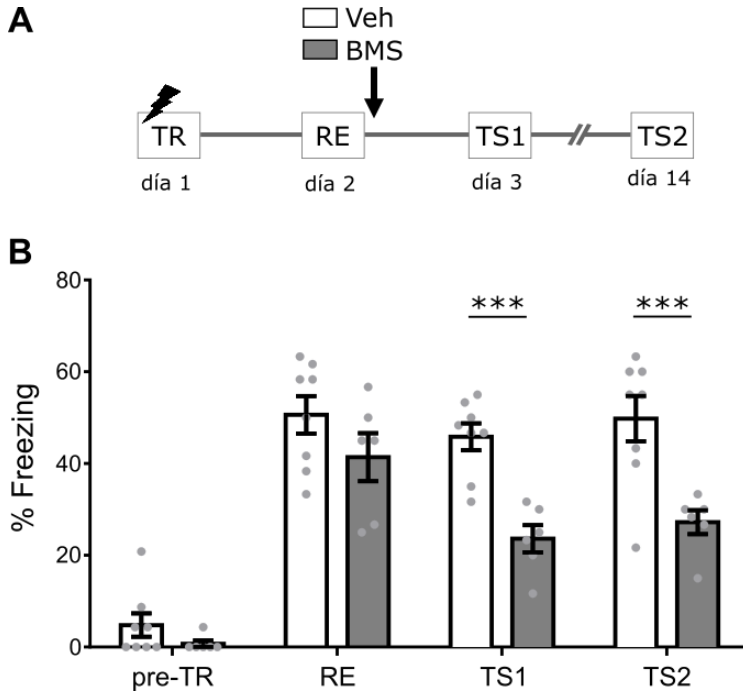


FIGURA 14 B; $p = 0,0009$).

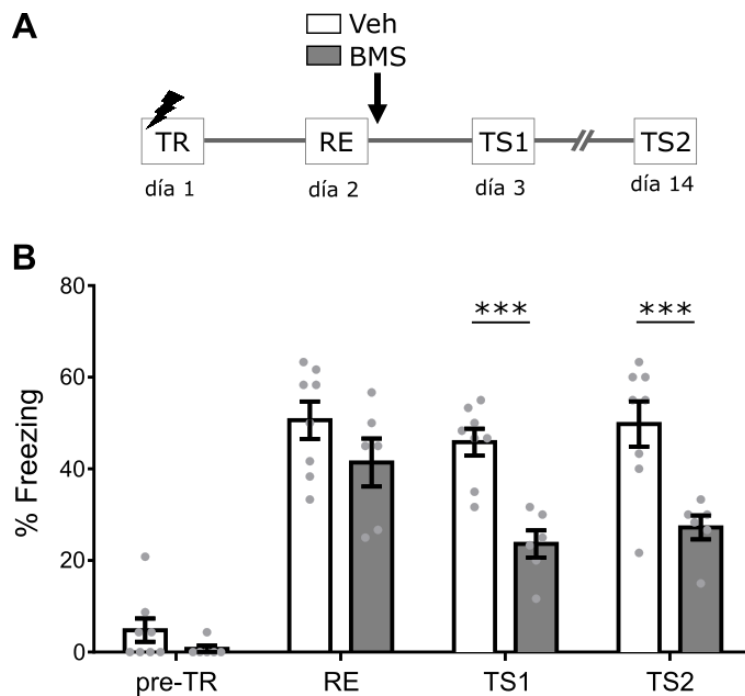


FIGURA 14. La inhibición de LIMK en el hipocampo dorsal inmediatamente después de la reactivación de la memoria produce un impedimento sobre el proceso de reconsolidación de la memoria que depende de la dosis administrada. **(A)** Diseño experimental para el protocolo de entrenamiento e inyección de la solución de BMS-5 (BMS) o vehículo (Veh), inmediatamente después de la reactivación. TR: sesión de entrenamiento; RE: re-exposición de 5 min al contexto de entrenamiento; TS1 y 2: sesiones de evaluación de 5 min al contexto de entrenamiento. **(B)** Porcentaje de *freezing* de animales re-expuestos al contexto de entrenamiento e inyectados con BMS (10 mM) o Veh. pre-TR: exposición de 2 min al contexto de

entrenamiento para establecer el nivel de *freezing* basal; n=7-8. Factor tiempo: $F_{3,48} = 117,45$, $p < 0,0001$; factor droga: $F_{1,48} = 24,26$, $p < 0,0001$; interacción: $F_{3,48} = 5,78$, $p = 0,0019$; Contrastes en RE, BMS vs Veh: $F_{1,48} = 2,22$, $p = 0,3705$; en TS1, BMS vs Veh: $F_{1,48} = 16,23$, $p = 0,0006$; en TS2, BMS vs Veh: $F_{1,48} = 15,47$, $p = 0,0009$.

Por otro lado, nos preguntamos si el efecto observado de la droga bajo estos parámetros podría ser independiente del proceso de reconsolidación de la memoria. Para ello, procedimos exactamente igual que en el experimento anterior con una nueva cohorte de animales, a la que le implantamos cánulas dirigidas al hipocampo dorsal y entrenamos para formar la memoria contextual de miedo, como ya fue descrito anteriormente. Sin embargo, 24 horas después de que se generó la asociación entre el contexto y el *shock* eléctrico, la mitad de los animales fue inyectado con una solución de 10 mM BMS-5 o con la solución vehículo, pero ninguno fue re-expuesto al contexto de entrenamiento (FIGURA 15 A). De esta manera, la droga fue administrada en ausencia de reactivación de la memoria y, por lo tanto, de los procesos mnésicos que pueden producirse bajo este protocolo, su labilización y reconsolidación. Además, la inyección se produjo fuera de la ventana de consolidación en el hipocampo de esta traza mnésica, por lo que no sería probable que afecte a los mecanismos asociados a este proceso [383, 384]. Al evaluar el comportamiento de los animales, 24 horas después de la inyección de la droga y 14 días después del entrenamiento (TS1 y TS2, respectivamente), se puede observar que no presentaron diferencias significativas entre grupos (FIGURA 15 B; $p = 0,4044$), por lo que se puede deducir que, en ausencia de reactivación de la memoria, la administración de la droga no produce el impedimento sobre la reconsolidación de la memoria contextual de miedo observado en el experimento anterior.

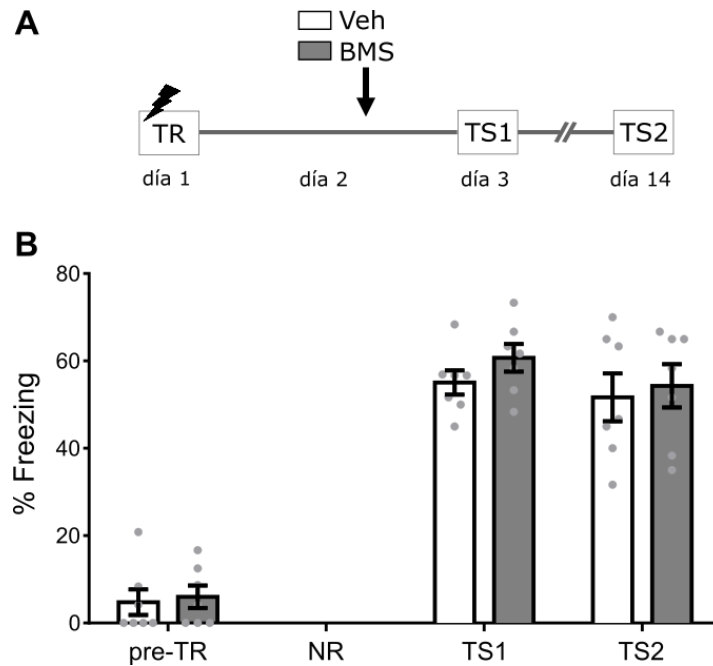


FIGURA 15. El impedimento generado por la inhibición de LIMK en el hipocampo dorsal sobre el proceso de reconsolidación de la memoria depende de su reactivación. **(A)** Diseño experimental para el protocolo de entrenamiento e inyección de la solución de BMS-5 (BMS) o vehículo (Veh), 24 horas después del entrenamiento en animales cuya memoria no fue reactivada (NR). TR: sesión de entrenamiento; RE: re-exposición de 5 min al contexto de entrenamiento; TS1 y 2: sesiones de evaluación de 5 min al contexto de entrenamiento. **(B)** Porcentaje de *freezing* de animales no re-expuestos al contexto de entrenamiento e inyectados con BMS (10 μ M) o Veh. pre-TR: exposición de 2 min al contexto de entrenamiento para establecer el nivel de *freezing* basal; $n=7$. Factor tiempo: $F_{2,24} = 443,23$, $p < 0,0001$; factor droga: $F_{1,12} = 0,75$, $p = 0,4044$; interacción: $F_{2,24} = 0,47$, $p = 0,6316$.

Estos tres experimentos nos permiten concluir que la inhibición de la actividad de LIMK en el hipocampo dorsal inmediatamente después de la reactivación de la memoria contextual de miedo produce un impedimento en la reconsolidación de esta traza mnésica. Este impedimento, por otro lado, es específico de la reactivación de la memoria, se mantiene a largo término y depende de la dosis administrada.

3.2 Consolidación de la memoria

Como ya mencioné en la [Introducción](#) de este trabajo, una memoria recientemente adquirida es particularmente lábil y, por lo tanto, pasible de ser interferida por variedad de compuestos químicos, enfermedades y hasta por la adquisición de nueva información por parte del individuo (revisado por Squire [385]). Si, en cambio, no es interferida por ninguno de estos agentes, la nueva memoria se convierte, de manera progresiva, en información que queda almacenada de manera estable y puede ser evocada ante recordatorios específicos [146, 386, 387]. En el proceso de estabilización necesario para que esta memoria perdure a largo plazo el citoesqueleto de actina cumple un papel esencial: trabajos previos reportan que la dinámica del citoesqueleto en la amígdala e hipocampo dorsal es necesaria para adquisición y consolidación de la memoria [271, 388–391], además de estar involucrada en la plasticidad sináptica necesaria para estos procesos [392]. Debido a su rol como molécula clave en la modulación de la dinámica de actina, Cfl1 ha surgido en trabajos recientes como una pieza importante en los procesos de aprendizaje y memoria. Durante la estabilización de la traza de la memoria el nivel de fosforilación de Cfl1 aumenta en el hipocampo, implicando una disminución en su capacidad de despolimerizar y cortar filamentos de actina [305, 393]. De igual manera, modificaciones en la vía de señalización de Cfl1 han tenido efectos similares: tanto la eliminación del gen que codifica para LIMK o la inhibición farmacológica de ROCK en el hipocampo tienen como resultado ratones con severos impedimentos en retener memorias espaciales [394, 395].

De esta manera, nos preguntamos si la inhibición de LIMK tiene un efecto en la estabilización de la traza mnésica generada a partir del condicionamiento de miedo. Para responderlo, implantamos cánulas en el hipocampo dorsal de una nueva cohorte de animales y la entrenamos bajo el paradigma de condicionamiento de miedo contextual. Inmediatamente después de la sesión de entrenamiento, administramos la solución de 10 mM BMS-5 o la solución vehículo de manera bilateral y los animales fueron devueltos a sus jaulas individuales hasta la primera sesión de evaluación, que tuvo lugar 24 horas después (**FIGURA 16 A**).

Como podemos observar en la **FIGURA 16 B**, los animales presentaron niveles mínimos de *freezing* durante el período de habituación al contexto (pre-TR) y este

comportamiento se vio modificado a las 24 horas, durante la sesión de evaluación, en la que los animales presentaron niveles al menos 8 veces mayores de *freezing* que los observados durante el pre-TR (TS1 vs pre-TR en FIGURA 16 B). Este cambio en el comportamiento, como ya se describió en secciones anteriores, denota un aprendizaje de asociación entre el contexto de entrenamiento y el *shock* eléctrico, además de la retención de esa memoria a largo término.

En la FIGURA 16 B se puede observar que, tanto 24 horas como 14 días después del entrenamiento y administración del inhibidor, el comportamiento de ambos grupos experimentales no presentaron diferencias significativas entre sí, indicando que el proceso de consolidación de la memoria se mantuvo inalterado a partir de la inhibición de LIMK inmediatamente después de la adquisición. Los tiempos de evaluación fueron elegidos de forma tal que con la primera sesión a 24 horas del entrenamiento pudiéramos evaluar la memoria a largo término formada el día 1, y la siguiente sesión a 14 días nos permita ver si el posible efecto generado en el comportamiento es transiente o perdura en el tiempo [113, 396, 397].

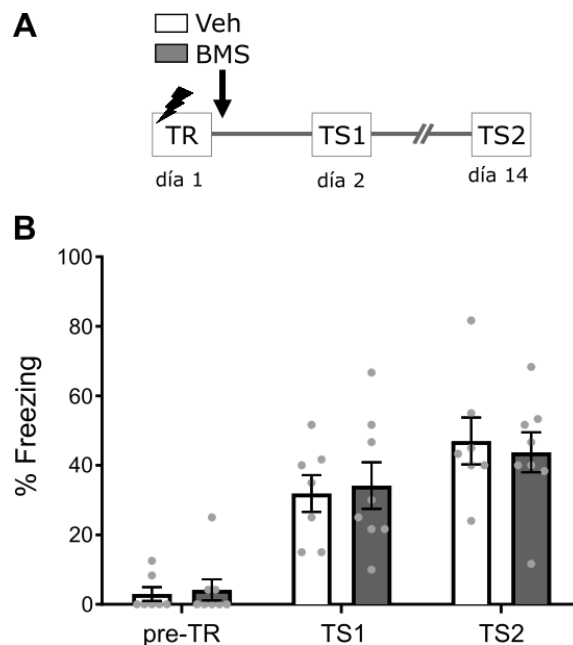


FIGURA 16. La inhibición de LIMK en el hipocampo dorsal inmediatamente después de la sesión de entrenamiento no produce un efecto sobre la consolidación de la memoria de miedo contextual. **(A)** Diseño experimental para el protocolo de entrenamiento e inyección de la solución de 10 mM BMS-5 (BMS) o vehículo (Veh) inmediatamente después de la sesión de entrenamiento. TR: sesión de entrenamiento; TS1 y 2: sesiones de evaluación de 5 min al contexto de entrenamiento. **(B)** Porcentaje de *freezing* de animales inyectados con BMS o Veh. pre-TR: exposición de 2 min al contexto de entrenamiento para establecer el

nivel de *freezing* basal; n=6-8. Factor tiempo: $F_{1,24} = 61,27$, $p < 0,0001$; factor droga: $F_{1,24}=0,32$, $p = 0,5822$; interacción: $F_{2,24} = 0,28$, $p = 0,7579$.

En este trabajo, la administración de BMS fue local (en el hipocampo dorsal), lo que implica que el tiempo necesario para que la droga llegue a las células es menor que con la administración sistémica [398] y se realizó inmediatamente después de la sesión de entrenamiento. De todos modos, es posible que el período de tiempo en el que la actividad de LIMK es necesaria en el proceso de estabilización de la memoria sea anterior al momento en el que su inhibidor estuvo disponible. Es por eso que realizamos el mismo procedimiento que en el experimento anterior con una nueva cohorte de animales, pero esta vez administramos la droga o la solución vehículo 20 minutos antes del inicio de la sesión de entrenamiento (FIGURA 17 A). De esta manera, nos aseguramos de que tanto BMS o Veh estén disponibles para las células de manera previa a lo que habían estado en el experimento anterior y, además, evitamos posibles efectos inespecíficos en el comportamiento generados por el estrés asociado a la inyección sin anestesia que podría provocar la administración inmediatamente antes de la sesión de entrenamiento.

Bajo las condiciones mencionadas, el comportamiento de ambos grupos de animales no mostró diferencias significativas en el período pre-TR y en el tiempo comprendido entre las presentaciones de los *shocks* eléctricos (FIGURA 17 B, $p = 0,3524$), lo que parecería indicar que BMS no produce un cambio significativo en el comportamiento de *freezing per se* mientras está disponible para las células del hipocampo dorsal, en comparación al producido por el vehículo. En cambio, durante la primera sesión de evaluación, 24 horas después del entrenamiento, los animales pertenecientes al grupo inyectado con BMS mostraron un porcentaje de comportamiento de *freezing* significativamente menor que el correspondiente a sus pares control (TS1 en FIGURA 17 B; $p = 0,0061$). Durante la siguiente sesión de evaluación, 14 días después del entrenamiento, se puede observar una marcada tendencia en el comportamiento de ambos grupos que es acorde a los resultados del TS1, aunque éstos no difieren significativamente (TS2 en FIGURA 17 B; $p = 0,1020$). Esto puede deberse a que los niveles de *freezing* expresados por el grupo control Veh disminuyeron con respecto al TS1, acercándose en promedio a los del grupo BMS.

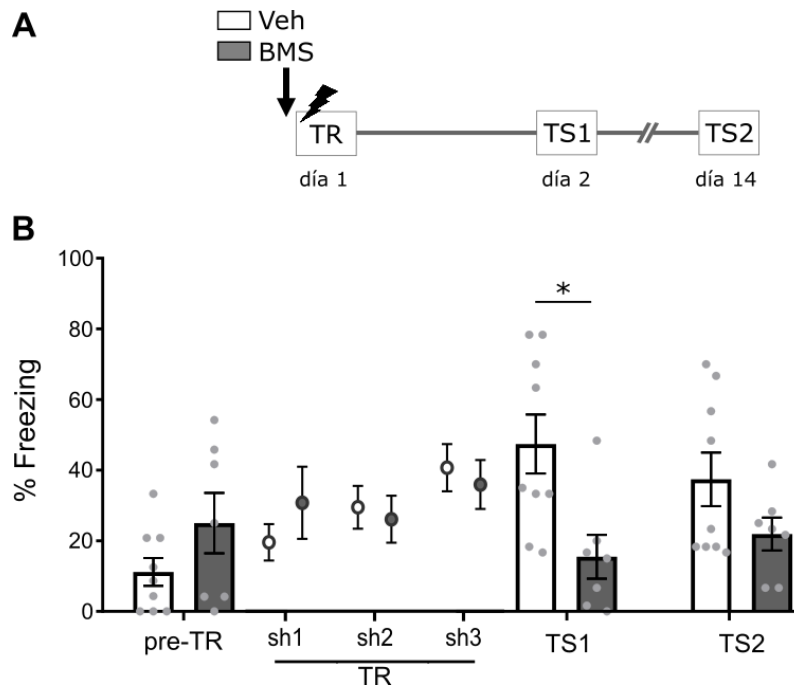


FIGURA 17. La inhibición de LIMK en el hipocampo dorsal desde antes de la sesión de entrenamiento produce un impedimento sobre la consolidación de la memoria de miedo contextual. **(A)** Diseño experimental para el protocolo de entrenamiento e inyección de la solución de 10 mM BMS-5 (BMS) o vehículo (Veh) 20 min antes de la sesión de entrenamiento. TR: sesión de entrenamiento; TS1 y 2: sesiones de evaluación de 5 min al contexto de entrenamiento. **(B)** Porcentaje de *freezing* de animales inyectados con BMS o Veh. pre-TR: exposición de 2 min al contexto de entrenamiento para establecer el nivel de *freezing* basal; n=7-9. Factor tiempo: $F_{2,28} = 2,08$, $p = 0,1436$; factor droga: $F_{1,28}=0,32$, $p = 0,2736$; interacción: $F_{2,28} = 6,36$, $p = 0,0053$. Contraste en TS1: BMS vs Veh: $F_{1,28} = 8,79$, $p = 0,0061$.

Con los resultados descriptos hasta ahora se puede observar que únicamente cuando se inhibe LIMK previa pero no posteriormente a la sesión de entrenamiento se produce un efecto en los niveles de retención a largo término de la memoria de miedo. Este efecto puede explicarse con dos hipótesis que, aunque no son contradictorias, tienen implicancias muy diferentes. La primera hipótesis sostiene que la inhibición de LIMK tiene un efecto sobre la adquisición de la memoria, es decir, sobre el aprendizaje de la asociación que se le presenta al animal a través de la contingencia entre el contexto y los sucesivos *shocks* eléctricos. La hipótesis alternativa sostiene, en cambio, que el proceso impedido por la inhibición de LIMK es la consolidación de la memoria, es decir, la estabilización a largo término de la traza mnésica formada durante el aprendizaje. Si esta última hipótesis fuese verdadera, el período ventana en el que la consolidación es posible de ser interrumpida por la inhibición de la quinasa se limitaría a un corto lapso de tiempo que está comprendido durante la sesión de entrenamiento, ya que la

administración de su inhibidor inmediatamente después de esta sesión no tuvo un efecto sobre la retención de la memoria a largo término (TS1 y 2 en **FIGURA 16 B**).

Para poder discernir si la primera hipótesis es verdadera, es decir, si la inhibición de LIMK en el hipocampo dorsal impide la adquisición de una memoria de miedo, diseñamos y realizamos un experimento muy similar al anterior, en el que inyectamos en el hipocampo dorsal BMS o Veh a animales que luego fueron entrenados en el paradigma de miedo contextual. Sin embargo, en vez de evaluar la retención de la memoria de miedo a largo plazo (24 horas después de la sesión de entrenamiento), elegimos hacerlo a las 4 horas del evento de adquisición (**FIGURA 18 A**). De esta manera, estudiamos la presencia de una memoria a corto término que, aunque se forma en paralelo a la de largo término, es independiente de su consolidación [61, 399–402]. La evidencia de una memoria a corto término luego de la administración de la droga indicaría que la falta de retención a 24 horas de la sesión de entrenamiento (TS1 en **FIGURA 17 B**) no se debe a un impedimento en el proceso de adquisición por parte del inhibidor de LIMK, sino que la memoria formada a partir del aprendizaje no pudo estabilizarse de manera exitosa, confirmando así la segunda hipótesis planteada.

Vale aclarar en esta instancia que, aunque ambas hipótesis no son excluyentes, en el caso de los experimentos planteados no podríamos diferenciar entre la posibilidad de que la primera hipótesis sea verdadera o ambas lo sean a la vez. Es decir, si a partir de los resultados del experimento planteado no se confirmase la presencia de una memoria a corto plazo formada a partir de la sesión de entrenamiento, podríamos postular que la administración del inhibidor de LIMK impide la adquisición de la memoria contextual de miedo, pero no podríamos descartar que, a la vez, genera algún tipo de impedimento en la estabilización a largo término de esa traza de memoria, es decir, en su consolidación.

En la **FIGURA 18 B** se puede observar que ambos grupos de animales presentan valores altos de *freezing* durante la primera sesión de evaluación, aumentando en promedio 20 veces los valores presentados durante el pre-TR. Sin embargo, el comportamiento de ambos grupos no difiere significativamente ($p = 0,1757$), indicando que la inhibición de LIMK en el hipocampo dorsal no impide la formación de la memoria a corto término, es decir, no impide su adquisición.

De esta manera, a partir de los experimentos descritos en esta sección, podemos concluir que la inhibición de LIMK en el hipocampo impide la consolidación de la memoria de miedo, pero no así su adquisición. Además, este impedimento se produce si la inhibición comienza de manera previa al proceso de aprendizaje, como ya ha sido visto para la inhibición de polimerización del citoesqueleto de actina en otro paradigma de aprendizaje [391].

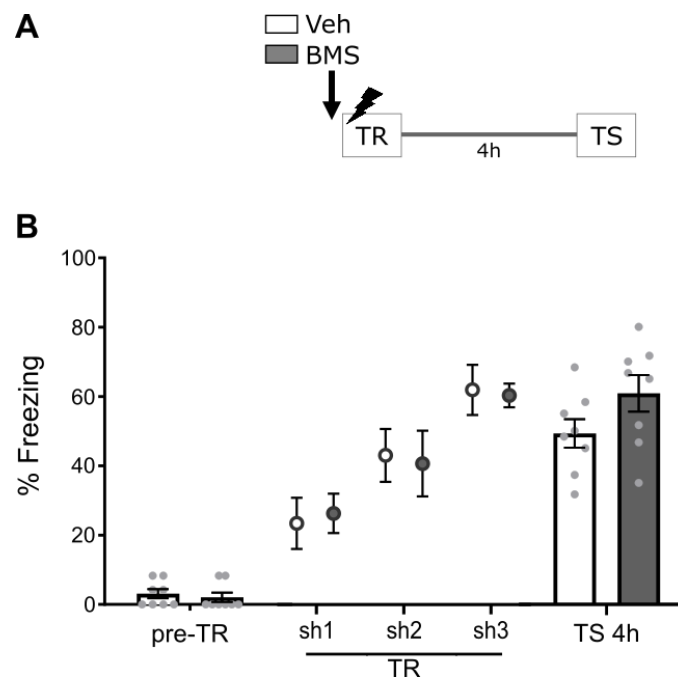


FIGURA 18. La inhibición de LIMK en el hipocampo dorsal desde antes de la sesión de entrenamiento no tiene efecto sobre la memoria a corto plazo de miedo contextual. **(A)** Diseño experimental para el protocolo de entrenamiento e inyección de la solución de 10 mM BMS-5 (BMS) o vehículo (Veh) 20 min antes de de la sesión de entrenamiento. TR: sesión de entrenamiento; TS: sesión de evaluación de 5 min al contexto de entrenamiento. **(B)** Porcentaje de *freezing* de animales inyectados con BMS o Veh. pre-TR: exposición de 2 min al contexto de entrenamiento para establecer el nivel de *freezing* basal; n=8-9. Factor tiempo: $F_{1,30} = 174,82$, $p < 0,0001$; factor droga: $F_{1,28}=1,92$, $p = 0,1757$; interacción: $F_{2,28} = 1,32$, $p = 0,2592$.

3.2 Extinción de la memoria

Como ya he descrito en secciones anteriores, una sesión corta de re-exposición al estímulo condicionado luego de la consolidación de la memoria es capaz de provocar los procesos de labilización y reconsolidación. Sin embargo, si esa sesión se prolonga en el tiempo y/o se agregan sesiones sucesivas de re-exposición, puede inducirse la formación de una memoria de extinción [4, 24, 403, 404]. Este proceso implica la disminución de la expresión de la respuesta condicionada como respuesta al estímulo condicionado. En el caso del condicionamiento contextual de miedo, el contexto de entrenamiento ya no predice al *shock* eléctrico.

En términos de mecanismos involucrados, hay suficiente evidencia para sostener que la formación de una memoria de extinción no implica el olvido de la memoria original, sino que inhibe temporalmente su expresión. De esta manera, la re-exposición prolongada al estímulo condicionado genera una nueva traza de memoria que compite con la original en su expresión, ya que codifica para la falta de asociación entre los estímulos [24, 97, 98, 405, 406]. Esta inhibición de la traza original decae con el tiempo, eventualmente dando lugar a que ésta se vuelva a expresar a partir de un recordatorio específico (recuperación espontánea; [97, 103, 114, 407]).

La formación de una memoria de extinción comparte ciertas características con la consolidación de la memoria original, como la necesidad de síntesis de proteínas y expresión génica, NMDA-R funcionales anclados en membrana, las vías de quinasas MAP y PI-3 [113, 115, 408–410]; a la vez que ambos procesos se diferencian en otros aspectos moleculares [91, 92, 110, 411]. En lo que respecta al citoesqueleto de actina, su dinámica es esencial para la correcta consolidación de una memoria de extinción [271]. La extinción de la respuesta condicionada generada por una memoria aversiva de gusto a través de sesiones sucesivas de exposición al estímulo condicionado aumentó el nivel de actividad de Cfl1 y disminuyó el de LIMK en la corteza infralímbica, zona de la corteza prefrontal medial ventral que está involucrada en la extinción de este tipo de respuestas [409, 412–418]. Además, la formación de esta memoria de extinción fue dependiente de la actividad de Cfl1 en esta zona cortical [273], así como también lo fue en el hipocampo dorsal para la extinción de la respuesta condicionada de una memoria contextual de miedo [272].

3.2.1 LIMK en la extinción de la memoria

Considerando que los resultados descriptos hasta ahora en este trabajo indican que la inhibición de LIMK es capaz de impedir tanto la consolidación como la reconsolidación de la memoria, y que los procesos involucrados en la formación de una memoria de extinción comparten características con los de la consolidación de la memoria original [113, 115, 408–410], nos propusimos evaluar si la inhibición de la quinasa también tiene un efecto sobre la formación de una memoria de extinción.

Para ello, entrenamos una nueva cohorte de animales de la misma manera que en los experimentos anteriores y, 24 horas después, los dividimos aleatoriamente en cuatro grupos. Dos de esos grupos fueron administrados en el hipocampo dorsal con BMS y los dos restantes con Veh. Luego de 20 minutos, un grupo inyectado con BMS y uno inyectado con Veh fueron re-expuestos al contexto de entrenamiento por 30 minutos consecutivos (BMS-EXT y Veh -EXT, respectivamente). Este protocolo ha sido utilizado en trabajos previos para inducir la extinción de la memoria original [91, 272]. Por otra parte, el punto temporal de inyección de la droga o la solución vehículo fue previo a la sesión de re-exposición, ya que ésta tuvo una duración mayor que en los protocolos anteriores, y fue precisamente 20 minutos antes de la misma para evitar posibles artefactos en el comportamiento debido a la inyección de las soluciones sin anestesia, como ya fue descrito [en la sección anterior](#). Los restantes grupos, uno inyectado con BMS y otro con Veh, no fueron re-expuestos al contexto de entrenamiento, sirviendo como grupos control (BMS-noEXT y Veh-noEXT, respectivamente; **FIGURA 19 A**). Como puede verse en la **FIGURA 19 B**, durante los primeros 5 minutos de la sesión de extinción, ambos grupos que pasaron por la sesión de extinción mostraron un alto porcentaje de comportamiento de *freezing* en comparación al pre-TR (aumento de 11,5 y 4,6 veces para los grupos BMS-EXT y Veh-EXT, respectivamente) y los valores no difirieron significativamente entre sí, indicando que la administración en el hipocampo dorsal de BMS no tuvo un efecto en la expresión de la memoria original ($p = 0,7765$; primeros 5 min de EXT en **FIGURA 19 B**).

Por otro lado, y como era de esperar a partir del protocolo, ambos grupos disminuyeron sus niveles de *freezing* para el final de la sesión de en el hipocampo dorsal tinción, en cuyos últimos 5 minutos en promedio muestran una disminución de un 81.4% y que, comparados con los valores iniciales de la sesión, cambian significativamente

indicando una adquisición exitosa de la memoria de extinción ($p < 0,0001$). Por otro lado, ambos grupos re-expuestos no difirieron significativamente en su comportamiento de *freezing* durante los últimos 5 minutos de la sesión, indicando que esta adquisición no fue afectada por el inhibidor ($p = 0,5937$; últimos 5 min de EXT en FIGURA 19 B).

Según nuestra predicción, el grupo de ratones que había sido administrado con solución vehículo y luego sometido a la sesión de extinción formaría una nueva traza de memoria que, temporalmente, inhibiría la expresión de la memoria original. A la vez, el grupo de animales que había sido administrado con el inhibidor de LIMK y luego sometido a la sesión de extinción no sería capaz de estabilizar esa nueva traza de memoria, debido a que, dentro de la dinámica del citoesqueleto de actina, estaría favorecida su despolimerización. De esta manera, los filamentos de actina polimerizada no podrían mantenerse en ese estado, concluyendo en un impedimento en la estabilización de esa nueva memoria. Con el objetivo de evaluar la extinción del comportamiento de miedo y, por lo tanto, formación y consolidación a largo término de la nueva traza de memoria de extinción, todos los animales fueron evaluados 24 horas, 8 días y 15 días después del entrenamiento (TS1, TS2 y TS3, respectivamente, en la FIGURA 19 B). En ninguna de estas instancias de evaluación encontramos diferencias significativas en el comportamiento observado entre los grupos Veh-EXT y BMS-EXT ($p = 0,4409$ para el TS1, $p = 0,7097$ para el TS2 y $p > 0,9999$ para el TS3), aunque el promedio de *freezing* de ambos grupos siempre se mantuvo por debajo del promedio de los grupos control no re-expuestos (43,6% de diferencia promedio para el TS1, 30,4% de diferencia promedio para el TS2 y 26,1% de diferencia promedio para el TS3). Estos resultados indican que, al menos bajo los parámetros utilizados, la inhibición de LIMK no tiene un efecto en la consolidación de una memoria de extinción, en contraposición a antecedentes realizados en rata utilizando el mismo paradigma [272].

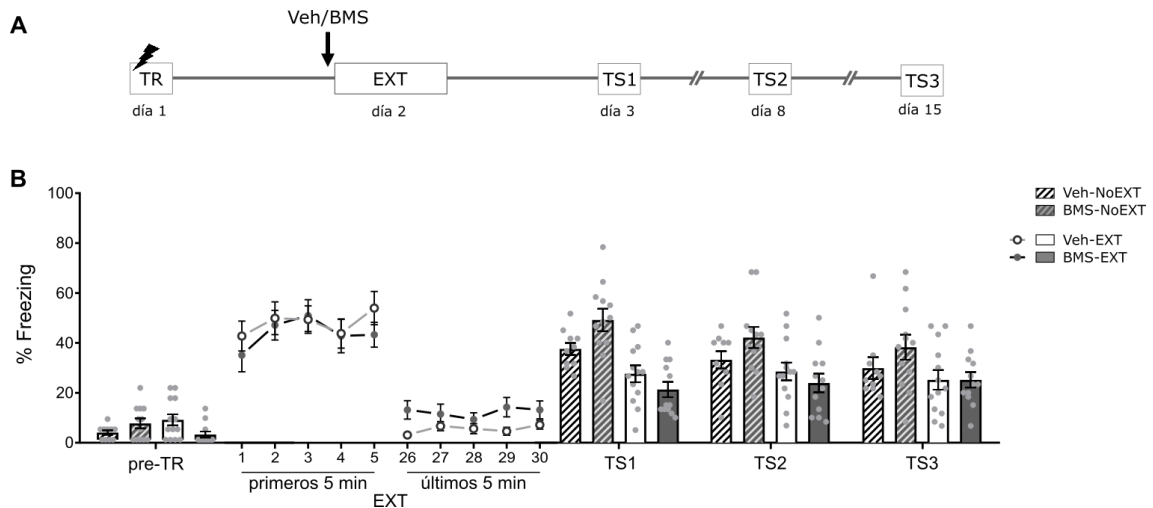


FIGURA 19. La inhibición de LIMK en el hipocampo dorsal desde antes de la sesión de extinción no tiene efecto sobre la consolidación de la memoria de extinción de miedo contextual. **(A)** Diseño experimental para el protocolo de entrenamiento e inyección de la solución de 10 mM BMS-5 o vehículo 20 min antes de de la sesión de extinción (BMS-EXT o Veh-EXT, respectivamente), o en puntos temporales equivalentes en animales no re-expuestos (BMS-noEXT o Veh-noEXT, respectivamente). TR: sesión de entrenamiento; EXT: sesión de extinción de 30 min al contexto de entrenamiento; TS1, TS2 y TS3: sesiones de evaluación de 5 min al contexto de entrenamiento. **(B)** Porcentaje de *freezing* de animales re-expuestos por 30 min al contexto de entrenamiento (EXT) o no re-expuestos (noEXT) e inyectados con BMS o Veh. pre-TR: exposición de 2 min al contexto de entrenamiento para establecer el nivel de *freezing* basal; n=10-13. Análisis para todas las sesiones excepto EXT: Factor tiempo: $F_{3,129} = 139,95$, $p < 0,0001$; factor grupo: $F_{3,43}=7,18$, $p = 0,0005$; interacción: $F_{9,129} = 4,63$, $p < 0,0001$. Contraste en TS1: BMS-EXT vs Veh-EXT: $F_{1,129} = 1,85$, $p = 0,4409$; en TS2: BMS-EXT vs Veh-EXT: $F_{1,129} = 0,93$, $p = 0,7097$; en TS3: BMS-EXT vs Veh-EXT: $F_{1,129} = 5,2E-06$, $p > 0,9999$. Para la sesión de EXT: Factor tiempo: $F_{1,22} = 103,61$, $p < 0,0001$; factor grupo: $F_{1,22}=0,04$, $p = 0,8510$; interacción: $F_{1,22} = 1,44$, $p = 0,2426$. Contraste en los primeros 5 min: BMS-EXT vs Veh-EXT: $F_{1,22} = 0,41$, $p = 0,7765$; en los últimos 5 min: BMS-EXT vs Veh-EXT: $F_{1,22} = 0,86$, $p = 0,5937$.

3.3.2 La dinámica del citoesqueleto de actina en la extinción de la memoria

Alterar el nivel de actividad de LIMK en el hipocampo dorsal no tuvo un efecto sobre la consolidación de la una memoria de extinción, pero existe evidencia que sostiene que ciertos mecanismos hipocampales mediando este proceso de memoria necesitan de una dinámica específica del citoesqueleto de actina, que no estarían siendo afectados por el tratamiento anterior [271].

Entonces, con el objetivo de probar la hipótesis que sostiene que la consolidación de una memoria de extinción depende de la dinámica del citoesqueleto de actina, repetimos el experimento descrito en la sesión anterior con una nueva cohorte de animales. En este caso, inyectamos la droga Latrunculina A (LatA) o su solución vehículo en el hipocampo dorsal 20 minutos antes de la sesión de extinción de la memoria (LatA-EXT y Veh-EXT, respectivamente). Esta droga se une al extremo positivo de los filamentos

de actina que se encuentran polimerizados (F-actina), provocando su desestabilización y, a la vez, secuestra a los monómeros de G-actina, disminuyendo de esta manera el *pool* disponible y favoreciendo la despolimerización de F-actina en su extremo negativo [419–422]. Los dos grupos restantes fueron inyectados con LatA o con Veh, pero no así re-expuestos al contexto de entrenamiento, sirviendo como controles (LatA-noEXT y Veh-noEXT, respectivamente).

Durante los primeros 5 minutos de la sesión de extinción, ambos grupos presentaron niveles altos de *freezing* (aumento de 37 y 7,9 veces para los grupos LatA-EXT y Veh-EXT, respectivamente, con respecto al pre-TR), indicando retención de la memoria contextual de miedo a largo plazo. Aunque observamos que en promedio los valores del comportamiento de *freezing* del grupo LatA-EXT son 74% mayores a los del grupo Veh-EXT, esta tendencia no se refleja en una diferencia significativa entre las medias de ambos grupos (primeros 5 minutos de EXT en la FIGURA 20 B; $p = 0,1084$). Sin embargo, la droga LatA parecería generar un aumento, al menos parcial, en la expresión de la memoria original o en los niveles de *freezing* que son inespecíficos de la memoria en cuestión.

Por otro lado, hacia el final de la sesión de extinción ambos grupos de animales disminuyeron significativamente su comportamiento de *freezing* con respecto al inicio de la sesión (disminución del 43,38% para Veh-EXT y de 73,33% para LatA-EXT; $p = 0,0002$) y no difirieron significativamente entre sí ($p = 0.8084$), indicando, por un lado, que ambos grupos adquirieron la memoria de extinción y, por el otro, que la droga no tuvo un efecto en tal adquisición (últimos 5 minutos de EXT en la FIGURA 20 B).

Al evaluar la memoria de extinción a largo término 24 horas después de su adquisición, observamos niveles significativamente menores de comportamiento de *freezing* en el grupo Veh-EXT, en comparación con el grupo control administrado con LatA (LatA-EXT; $p = 0,0143$), indicando que la desestabilización del citoesqueleto de actina impide la consolidación de la memoria de extinción (TS en FIGURA 20 B).

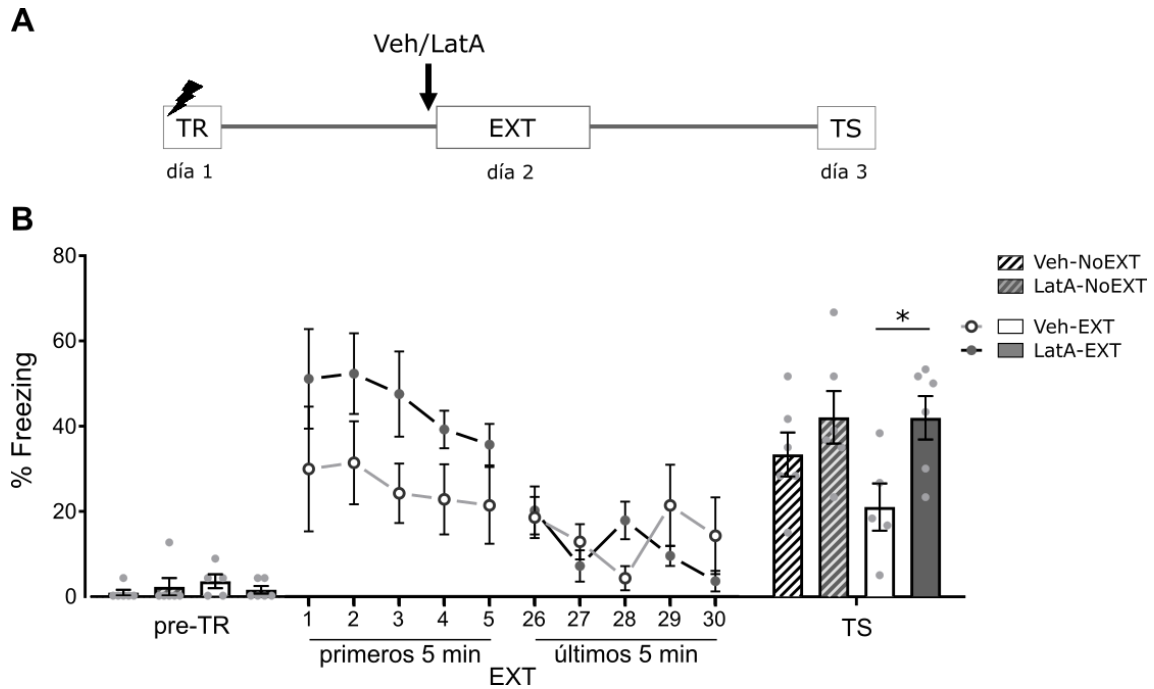


FIGURA 20. La disminución de la polimerización de actina en el hipocampo dorsal desde antes de la sesión de extinción provoca un impedimento en la consolidación de la memoria de extinción de miedo contextual. **(A)** Diseño experimental para el protocolo de entrenamiento e inyección de la solución de 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Latrinculina A (LatA) o solución vehículo (Veh) 20 min antes de de la sesión de extinción (LatA-EXT o Veh-EXT, respectivamente), o en puntos temporales equivalentes en animales no re-expuestos (LatA-noEXT o Veh-noEXT, respectivamente). TR: sesión de entrenamiento; EXT: sesión de extinción de 30 min al contexto de entrenamiento; TS1 y 2: sesiones de evaluación de 5 min al contexto de entrenamiento. **(B)** Porcentaje de *freezing* de animales re-expuestos por 30 min al contexto de entrenamiento (EXT) o no re-expuestos (noEXT) e inyectados con LatA o Veh. pre-TR: exposición de 2 min al contexto de entrenamiento para establecer el nivel de *freezing* basal; $n=5-6$. Análisis para todas las sesiones excepto EXT: Factor tiempo: $F_{1,23} = 133,65$, $p < 0,0001$; factor grupo: $F_{3,23}=3,24$, $p = 0,0408$; interacción: $F_{3,23} = 4,42$, $p = 0,0135$. Contrastes en el TS1: LatA-EXT vs Veh-EXT: $F_{1,23} = 8,70$, $p = 0,0143$; LatA-EXT vs LatA-NR: $F_{1,23} = 1,7\text{E}-04$, $p = 0,9999$. Para la sesión de EXT: factor tiempo: $F_{1,9} = 36,78$, $p = 0,0002$; factor grupo: $F_{1,10} = 2,03$, $p = 0,1850$; interacción: $F_{1,9} = 8,12$, $p = 0,0191$. Contrastes en los primeros 5 minutos: LatA-EXT vs Veh-EXT: $F_{1,9} = 4,82$, $p = 0,1084$; en los últimos 5 minutos: LatA-EXT vs Veh-EXT: $F_{1,9} = 0,5623$, $p = 0,8084$.

Partiendo de la hipótesis que sostiene que el impedimento observado en la consolidación de la memoria de extinción a partir de la administración de LatA se produce gracias a la falta de estabilidad en los filamentos de actina, que conduce a la incapacidad de estabilizar nuevas memorias para que perduren en el tiempo, es posible considerar la posibilidad de que, produciendo el efecto contrario, es decir, favoreciendo la estabilización del citoesqueleto en filamentos de actina, la consolidación de una memoria de extinción pueda verse favorecida.

Para probar esta hipótesis, necesitábamos un protocolo dentro del paradigma que contuviese en alguna medida un error de predicción que lograra generar la

reactivación de la traza de memoria, pero que, a la vez, no fuera lo suficientemente saliente como para producir por sí sólo una nueva memoria de extinción que inhibiese la expresión de la original. Por esta razón, implementamos un protocolo de re-exposición al contexto de entrenamiento de 5 minutos, idéntico al utilizado en [la primera sección](#) de este Capítulo. Este tipo de re-exposición, como ya se ha descrito, produce la labilización y reconsolidación de la memoria original, no así la adquisición de una memoria de extinción [91, 92, 423]. Con el objetivo de favorecer la polimerización de los filamentos de actina, inyectamos inmediatamente después de la sesión de re-exposición en el hipocampo dorsal de un grupo de animales una solución con la droga Jasplakinolide (Jas). Esta droga ha sido utilizada en bibliografía como estabilizador del citoesqueleto de actina e inductor de la polimerización [424]. Como control se utilizó un grupo de animales que fue entrenado y re-expuesto a la par del grupo anterior, pero fue administrado con solución vehículo (Veh; FIGURA 21 A).

Cuando analizamos los resultados que se muestran en la FIGURA 21 B, pudimos observar que ambos grupos mostraron un aumento en su comportamiento de *freezing* entre el día 1 y el día 2, lo que indica que formaron una memoria contextual de miedo de largo término (aumento de 25,3 y 45,7 veces para los grupos Veh y Jas, respectivamente, entre RE y pre-TR en FIGURA 21 B). Sin embargo, 24 horas después de la sesión de re-exposición y posterior inyección, el grupo de animales que fue inyectado con Jas presenta niveles de *freezing* significativamente menores a los observados en el grupo control Veh ($p = 0,0212$; TS1 en FIGURA 21 B). Este resultado podría deberse tanto a que la estabilización y mayor polimerización del citoesqueleto de actina facilitaron la consolidación de una memoria de extinción que inhibe la expresión de la memoria original, o que, por el contrario, generaron un impedimento en el proceso de reconsolidación de la memoria original, inhibiendo la re-estabilización de esa traza mnésica. Con el objetivo de discernir entre ambas posibilidades recurrimos a la única herramienta metodológica que permite diferenciar los eventos de inhibición temporal de la expresión de una traza de memoria y su desestabilización permanente: la capacidad de que la memoria original pueda ser recuperada, lo que se manifiesta en la expresión de un mayor porcentaje de *freezing* en el comportamiento. Es por eso que evaluamos la retención de la memoria original a 15 días del entrenamiento (TS2 en FIGURA 21 A), considerando que, si fuese verdadera la

hipótesis que sostiene que la estabilización del citoesqueleto favorece la consolidación de una memoria de extinción, se podría observar la recuperación espontánea de la expresión de la memoria original [97, 103, 114, 407].

Efectivamente, durante el TS2, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos Jas y Veh ($p = 0,3649$; FIGURA 21 B), con medias comparables a las observadas en la sesión de re-exposición para el grupo Veh, lo que sugiere que la estabilización y aumento en la polimerización del citoesqueleto de actina parecería favorecer la consolidación de una memoria de extinción. Sin embargo, el grupo experimental que fue administrado con Jas presenta una mayor dispersión en la respuesta comportamental al contexto de entrenamiento durante el TS2. Esto puede indicar que la recuperación espontánea no sucedió en todos los animales evaluados, sino que algunos mantuvieron la inhibición de la expresión de la memoria original por parte de la nueva memoria de extinción, o que, por el contrario, la administración de la droga generó un impedimento transitorio del proceso de reconsolidación de la memoria [396], que volvió a ser expresada 14 días después del entrenamiento original.

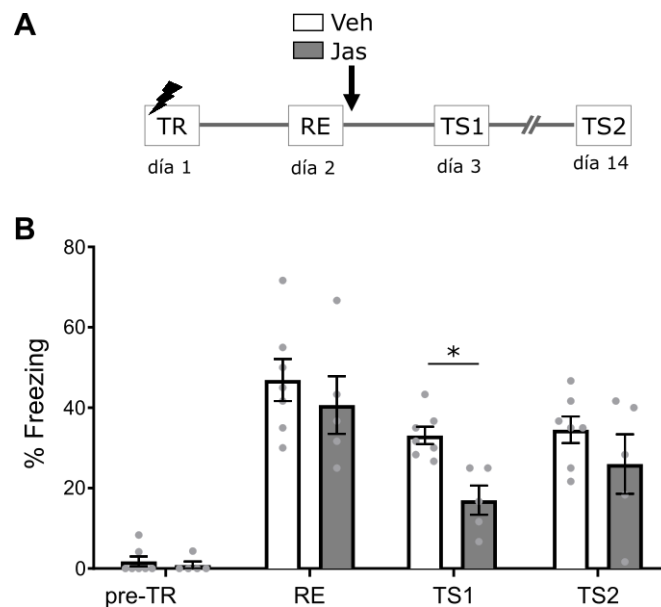


FIGURA 21. La estabilización de polímeros de actina en el hipocampo dorsal inmediatamente después de la sesión de extinción provoca una facilitación en la consolidación de la memoria de extinción de miedo contextual. **(A)** Diseño experimental para el protocolo de entrenamiento e inyección de la solución de 200 μ M Jasplakinolide (Jas) o solución vehículo (Veh), inmediatamente después de la reactivación. TR: sesión de entrenamiento; RE: re-exposición de 5 min al contexto de entrenamiento; TS: sesión de evaluación de 5 min al contexto de entrenamiento. **(B)** Porcentaje de *freezing* de animales del grupo Jas y Veh en

diferentes sesiones comportamentales. pre-TR: exposición de 2 min al contexto de entrenamiento para establecer el nivel de *freezing* basal; n=5-7. Factor tiempo: $F_{3,30} = 75,71$, $p < 0,0001$; factor grupo: $F_{1,10} = 7,15$, $p = 0,0233$; interacción: $F_{1,9} = 2,48$, $p = 0,0803$. Contrastes en el TS1: Jas vs Veh: $F_{1,30} = 7,42$, $p = 0,0212$; en el TS2 : Jas vs Veh: $F_{1,23} = 1,69$, $p = 0,3649$.

Capítulo 4. Caracterización del perfil de ARNm de Cfl1 y Actb luego de la activación celular en cultivo primario de hipocampo y corteza cerebral

La plasticidad sináptica, en términos del aumento de la eficacia sináptica a largo término, puede suceder gracias a la estimulación de alta frecuencia de las sinapsis, resultando en LTP [34]. Este aumento sostenido en la fuerza sináptica es considerado el sustrato principal del aprendizaje y la memoria [28, 45, 151, 425] y genera un aumento en el tamaño y la densidad de las espinas dendríticas, a través la activación específica de cascadas de señalización que involucran a moléculas que modulan la dinámica de actina [199, 207]. A partir de la inducción del LTP, moléculas activas de Cfl1 ingresan inmediatamente a las espinas dendríticas, en lo que se conoce como la etapa inicial de esta potenciación neuronal [288, 426, 427], lo que implicaría un aumento en la desestabilización de los filamentos de actina. Luego, mientras el volumen dendrítico aumenta, la potenciación se estabiliza y se observa un aumento en la inactivación de Cfl1, a través de su fosforilación por LIMK, favoreciendo así la estabilización de los filamentos de actina [175, 288, 305, 426, 428, 429]. En términos de receptores, específicamente en la subárea CA1 hipocampal, un proceso de LTP se inicia por la activación de NMDA-R, que genera una entrada masiva de iones de calcio, que, a través de las cascadas de señalización que dependen de la proteína CAMKII, resulta en la inserción de AMPA-R en la membrana postsináptica (revisado en [37]).

Considerando que:

- a. en base a resultados anteriores descriptos en [la sección 3.1.2](#) de esta Tesis, la cantidad de ARNm disponible para ser traducido, tanto de Cfl1 como de Actb, cambiaron su perfil en la subárea CA1 del hipocampo luego de la reactivación de la memoria,
- b. en base a resultados anteriores descriptos en [la sección 3.1.1](#) de esta Tesis, la reestabilización de la traza mnésica fue impedida a través de la administración de un inhibidor de LIMK en el hipocampo inmediatamente después de la reactivación de la memoria,

- c. y que la potenciación sináptica a largo plazo es considerada el sustrato principal del aprendizaje y la memoria [131–134] y genera un aumento en el tamaño y la densidad de espinas dendríticas, a través la activación específica de cascadas de señalización que involucran a moléculas que modulan la dinámica de actina [135, 136],

nos propusimos evaluar el efecto de la inhibición farmacológica de LIMK y la activación neuronal en la disponibilidad traduccional de los ARNm de Cfl1 y Actb en diferentes compartimentos neuronales. Para ello, realizamos cultivos primarios de tejido hipocampal y cortical, a los que sometimos a diferentes tratamientos.

En una primera instancia, dividimos a las placas de cultivo en dos grupos. Al primer grupo le realizamos un pre-tratamiento que consistió en la exposición de las células en cultivo a 100 μ M BMS-5 por el lapso de 4 horas y el segundo grupo, sirviendo de control, fue expuesto de la misma manera a la solución vehículo [352]. Luego, cada uno de los grupos fue, a su vez, dividido en dos grupos más, generando 4 grupos diferentes. A la mitad de estos grupos les realizamos un protocolo químico de activación neuronal (o LTP químico, LTPq) a partir de una solución de aCSF con 200 μ M glicina por el lapso de 3 minutos. Al resto, se los expuso a la solución de aCSF sin glicina, por el mismo período de tiempo. La utilización de glicina en el medio extracelular para generar activación neuronal es ampliamente utilizada en cultivos celulares, ya que hace varias décadas fue probado su fuerte efecto de potenciación sobre la apertura de NMDA-R, que sucede de manera independiente a la actividad de los receptores inhibitorios sensibles a glicina [324–326]. Este LTPq generado por el agregado de glicina al medio extracelular sucede por la rápida inserción de nuevos AMPA-R y la reorganización de este tipo de receptores en grupos más concentrados dentro de la membrana postsináptica [430].

De esta manera, y como se puede observar en las **FIGURA 22 FIGURA 23 A**, obtuvimos un total de cuatro grupos: un grupo pre-tratado con BMS y tratado con LTPq (grupo BMS-LTPq), un grupo pre-tratado con solución vehículo y tratado con LTPq (grupo LTPq), un grupo pre-tratado con BMS y tratado con solución aCSF (grupo BMS), y un grupo pre-tratado con solución vehículo y tratado con solución aCSF (grupo Ctrl). Es necesario aclarar en este punto que la activación neuronal química a través del tratamiento con glicina se realizó con aCSF como solución vehículo con el objetivo de mantener el medio

extracelular lo más controlado posible. Por lo tanto, durante los últimos 30 min del pre-tratamiento se mantuvo la concentración de droga, cambiando la solución de medio de cultivo condicionado de las células a aCSF.

Luego del protocolo descrito (**FIGURA 22 FIGURA 23 A**), fijamos los cultivos celulares y realizamos FISH de alta resolución utilizando sondas que hibridan con el ARNm de Cfl1 o de Actb, cuya señal se amplifica hasta acoplarla a un fluoróforo para su detección, de la misma manera que ya fue descrito en [la sección 3.1.2](#). Luego, realizamos inmunocitoquímica de fluorescencia para un marcador dendrítico (anticuerpo anti-MAP2) y tinción nuclear con DAPI sobre los cultivos fijados (**FIGURA 22 FIGURA 23 B**). Ambas señales nos permitieron diferenciar las neuronas de las células gliales y, a la vez, delimitar los compartimentos neuronales.

4.1 Perfil de ARNm de Cfl1

Al evaluar los cultivos neuronales que fueron tratados con sondas complementarias al ARNm de Cfl1, pudimos observar que, comparando la señal correspondiente a los somas y a las dendritas de manera separada, las diferentes combinaciones de tratamientos produjeron un perfil similar en ambos compartimentos neuronales. Tomando los valores de la señal relativa al grupo control (Ctrl) y comparando los valores con los de este grupo, tanto el pre-tratamiento con BMS como el tratamiento con LTPq, generaron de forma individual un aumento significativo en la cantidad de ARNm de Cfl1 disponible para su traducción, tanto en dendritas (Ctrl vs BMS: $p < 0,0001$; Ctrl vs LTPq: $p = 0,0001$), como en los somas neuronales (Ctrl vs BMS: $p = 0,0001$; Ctrl vs LTPq: $p = 0,0075$; **FIGURA 22 C** y **TABLA 3**). Este es un efecto que esperábamos de la incubación de las células con una solución de BMS, ya que la inhibición que provoca este compuesto en la actividad de LIMK generaría un aumento en la actividad de Cfl1. Por otro lado, esta misma tendencia se observó para los cultivos tratados con LTPq, resultado consistente con trabajos previos [288, 426, 427]. Ambos efectos, generados por dos tratamientos distintos, apuntan a una desestabilización del citoesqueleto de actina, ya sea por inhibición de LIMK o por activación neuronal, aumentando ambos la disponibilidad del mensajero de Cfl1 para su traducción.

Con respecto al tratamiento que combinó tanto la pre-incubación con BMS, como la activación neuronal a través del LTPq (grupo BMS+LTPq), se puede observar que el efecto en los diferentes compartimentos neuronales fue en la misma dirección, pero con magnitudes diferentes. Dentro de los somas neuronales, el grupo BMS+LTPq presentó un aumento significativo de los niveles de ARNm de Cfl1 disponibles para su traducción únicamente con respecto al grupo LTPq, que no tuvo un pre-tratamiento con BMS ($p = 0,0133$; panel derecho en la FIGURA 22 C y TABLA 3). Por otro lado, en este compartimento, ambos tratamientos (BMS y LTPq) no tuvieron un efecto de interacción en la disponibilidad de este ARNm ($p = 0,6190$; TABLA 3), por lo que se deduce que ambos efectos fueron independientes entre sí.

En cambio, en las dendritas, no sólo el grupo BMS+LTPq tuvo un aumento significativo de la cantidad de ARNm de Cfl1 disponible para traducir, con respecto al efecto generado por cada uno de los grupos BMS y LTPq (BMS+LTPq vs BMS: $p = 0,0014$; BMS+LTPq vs LTPq: $p = 0,0001$; panel izquierdo en FIGURA 22 C y TABLA 3), sino que la interacción entre ambos tratamientos sobre esta variable fue significativa ($p = 0,0031$; TABLA 3).

Con el objetivo de evaluar si la cantidad relativa de ARNm de Cfl1 disponible para ser traducido presente en cada compartimento presenta cambios con respecto a cada tratamiento, realizamos un cociente entre los valores obtenidos en las dendritas en relación a los obtenidos en los somas neuronales. De esta manera, pudimos observar que la proporción entre ambos compartimentos no se ve afectada tanto por el tratamiento individual con BMS o LTPq, como por su combinación (efecto del pre-tratamiento con BMS: $p = 0,1176$; de la activación neuronal con LTPq: $p = 0,1198$; y de la interacción de ambos: $p = 0,2718$; panel derecho en FIGURA 22 D y TABLA 3).

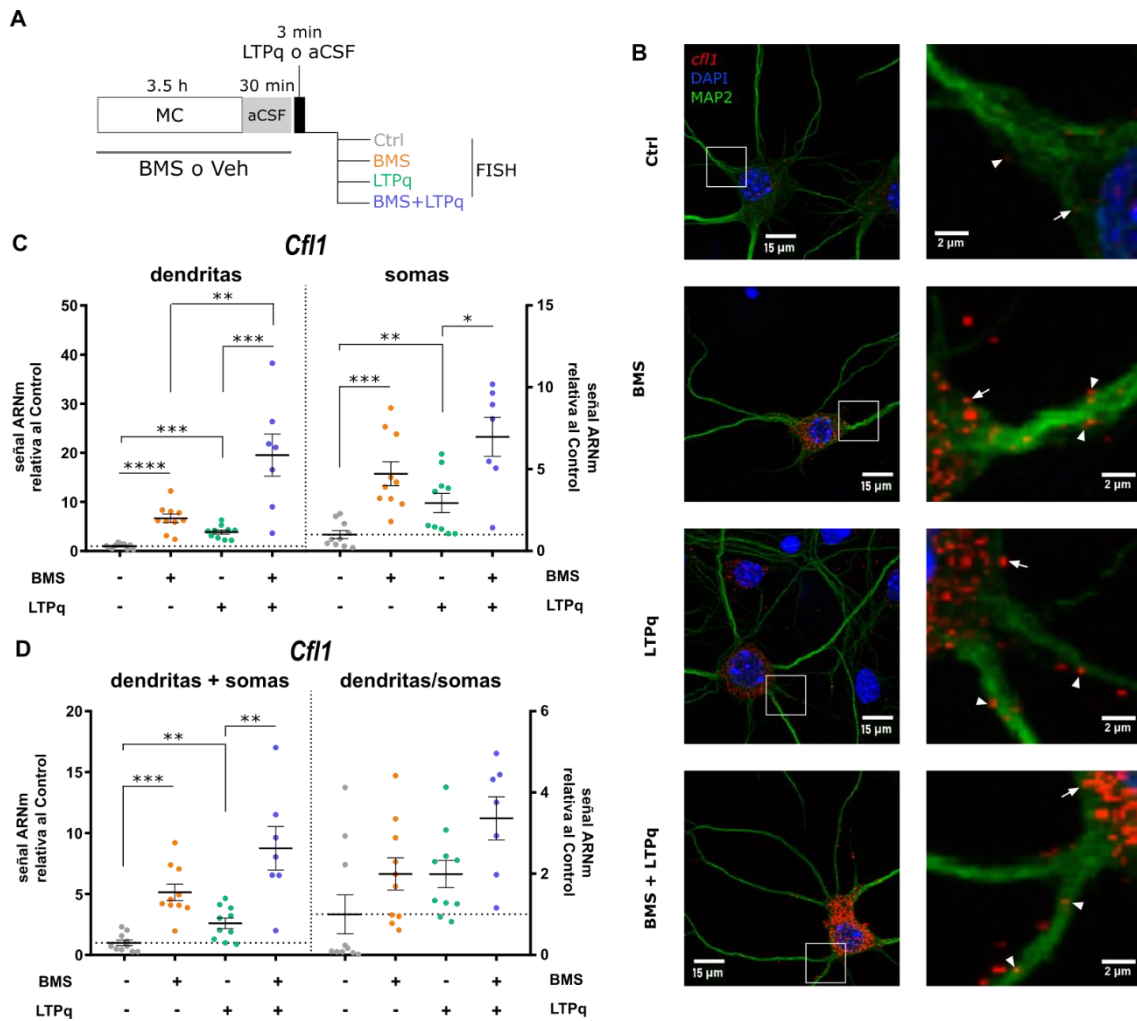


FIGURA 22. Perfil de ARNm de *Cfl1* luego del pre-tratamiento con BMS y la activación neuronal (LTPq). **(A)** Diseño experimental para el protocolo desarrollado. Las células del cultivo primario fueron pre-tratadas con una solución de BMS 100 μ M o Veh (0,01% DMSO) disuelta en una primera instancia en su medio de cultivo (MC) por 3,5 h y luego disuelta en una solución de aCSF suplementada por 30 min. Pasado ese tiempo, las células en cultivo fueron tratadas por 3 min ya sea con la misma solución control aCSF o con LTPq (aCSF con 200 μ M glicina). Luego, las células fueron lavadas y fijadas. **(B)** Imágenes representativas de neuronas en cultivo pre-tratadas por 4 h con BMS o Veh y tratadas por 3 min con LTPq o aCSF. Se realizó FISH de alta resolución contra ARNm de *Cfl1*, inmunocitoquímica contra MAP2 (como marcador dendrítico) y tinción nuclear con DAPI. Las imágenes del panel de abajo muestran una selección de las imágenes del panel de arriba, con un aumento mayor. Las cabezas de flecha marcan ejemplos de señal de ARNm de *Cfl1* correspondientes a las dendritas y las flechas enteras ejemplos correspondientes a los somas. **(D y E)** Cuantificación de la señal de ARNm de *Cfl1* en somas, dendritas (en **E**), la suma de los valores de ambas áreas (dendritas + somas en **F**) y su cociente (dendritas/somas en **F**) relativa al grupo Ctrl. El análisis estadístico asociado está descrito en la **TABLA 3**.

ARNm Cfl1	Factor			Contraste			
				Ctrl vs		BMS+LTPq vs	
Compartimento	Pre-trat. BMS/Veh	Trat. LTPq/aCSF	Interacción	BMS	LTPq	BMS	LTPq
Dendritas	F _{1,34} = 37,84	F _{1,34} = 21,95	F _{1,34} = 10,11	F _{1,34} = 33,50	F _{1,34} = 25,27	F _{1,34} = 15,82	F _{1,34} = 23,30
	< 0,0001	< 0,0001	0,0031	< 0,0001	0,0001	0,0014	0,0001
Soma	F _{1,34} = 25,82	F _{1,34} = 8,29	F _{1,34} = 0,25	F _{1,34} = 24,04	F _{1,34} = 11,35	F _{1,34} = 3,26	F _{1,34} = 9,96
	< 0,0001	0,0068	0,6190	0,0001	0,0075	0,2825	0,0133
Dendritas + Somas	F _{1,35} = 23,28	F _{1,35} = 9,03	F _{1,35} = 3,47	F _{1,35} = 35,24	F _{1,35} = 11,45	F _{1,35} = 6,09	F _{1,35} = 11,92
	< 0,0001	0,0049	0,0711	< 0,0001	0,0071	0,0723	0,0059
Dendritas / Somas	F _{1,34} = 2,58	F _{1,34} = 2,55	F _{1,34} = 1,25	F _{1,34} = 0,15	F _{1,34} = 0,14	F _{1,34} = 3,11	F _{1,34} = 3,14
	0,1176	0,1198	0,2718	0,9924	0,9930	0,3041	0,3005

TABLA 3. Detalle de los valores del estadístico F, los grados de libertad correspondientes (celdas en color gris) y valores p asociados (celdas en color negro) a los factores del modelo y a los contrastes entre grupos, para la señal de ARNm de Cfl1 evaluada en cada compartimento. Las comparaciones entre dos grupos que resultaron significativamente diferentes están señaladas en las **FIGURA 22 D Y E**. n=9-10 imágenes por placa, una placa por grupo experimental.

Considerando los resultados obtenidos en esta sección, podemos resaltar que, a pesar de que en ambos compartimentos neuronales la cantidad de ARNm de Cfl1 disponible para ser traducido aumenta a partir de los diferentes tratamientos con un perfil muy similar, el efecto generado por la combinación de los mismos no es equivalente. Mientras que en los somas el efecto generado por la combinación de la inhibición de LIMK y la activación neuronal fue aditivo con respecto al generado por los tratamientos de manera individual, en las dendritas se observó un efecto sinérgico positivo en la cantidad de ARNm de Cfl1 generado por ambos tratamientos en conjunto.

4.2 Perfil de ARNm de *Actb*

Al evaluar los cultivos primarios de hipocampo y corteza cerebral que fueron tratados con sondas complementarias al ARNm de *Actb*, pudimos observar que, comparando la señal correspondiente a los somas y a las dendritas de manera separada, en este caso las diferentes combinaciones de tratamientos produjeron un perfil diferente entre ambos compartimentos neuronales. Tomando los valores de la señal relativa al grupo control (Ctrl) y comparando los valores con los de este grupo, el pre-tratamiento con BMS no generó un cambio significativo en la cantidad de ARNm de *Actb* en los dos compartimentos (en dendritas: $p = 0,7001$; en somas: $p = 0,9944$). La activación neuronal con LTPq, en cambio, produjo una disminución en la cantidad de este ARNm con respecto al grupo Ctrl en ambos compartimentos, siendo significativamente menor en su cantidad presente en somas (en dendritas: $p = 0,0771$; en somas: $p = 0,0016$; FIGURA 23 C y TABLA 3).

Con respecto al tratamiento que combinó tanto la pre-incubación con BMS, como la activación neuronal a través del LTPq (grupo BMS+LTPq), se puede observar que el efecto producido en la cantidad de ARNm de *Actb* disponible para ser traducido difirió entre ambos compartimentos neuronales. En las dendritas, el grupo BMS+LTPq presentó un aumento significativo en los niveles de ARNm únicamente con respecto al grupo LTPq, que no tuvo un pre-tratamiento con BMS ($p = 0,0002$; panel derecho en la FIGURA 22 C y TABLA 4). En cambio, en los somas neuronales, el grupo BMS+LTPq mostró una diferencia significativa en la cantidad de ARNm de *Actb* sólo con respecto al efecto generado por el grupo BMS ($p = 0,0046$; panel izquierdo en FIGURA 23 C y TABLA 4) que no fue activado a través de un LTPq.

De esta manera, en los somas neuronales, el grupo que combina ambos tratamientos tiene niveles similares al grupo con activación neuronal, mientras que en las dendritas el mismo grupo experimental muestra valores similares al grupo control, que no fue expuesto a ningún tratamiento. Este perfil de ARNm de *Actb* observado en cada compartimento neuronal estudiado puede explicarse con la falta de interacción entre ambos tratamientos individuales, generando un efecto aditivo para el grupo que combina ambos tratamientos (en somas: $p = 0,7593$; en dendritas: $p = 0,5598$; TABLA 4).

Al igual que procedimos en [la sección anterior](#), para evaluar si la cantidad relativa de ARNm de *Actb* disponible para ser traducido presente en cada compartimento

presenta cambios con respecto a cada tratamiento, realizamos un cociente entre los valores obtenidos en las dendritas en relación a los obtenidos en los somas neuronales. Esta vez pudimos observar una disminución significativa en la proporción entre ambos compartimentos, tanto en comparación con el tratamiento con BMS, como con la activación a partir del LTPq (BMS-LTPq vs BMS: $p = 0,0154$; BMS-LTPq vs LTPq: $p = 0,0017$; panel derecho en FIGURA 23 D y TABLA 4). Sin embargo, ambos tratamientos parecen ser independientes en su efecto sobre la cantidad de ARNm de *Actb* ($p = 0,4678$; TABLA 4), siendo el efecto del pre-tratamiento con BMS un sutil aumento de la cantidad del ARNm en dendritas y el efecto de la activación neuronal con LTPq una disminución mayor de la cantidad del ARNm en somas, en comparación con el grupo control.

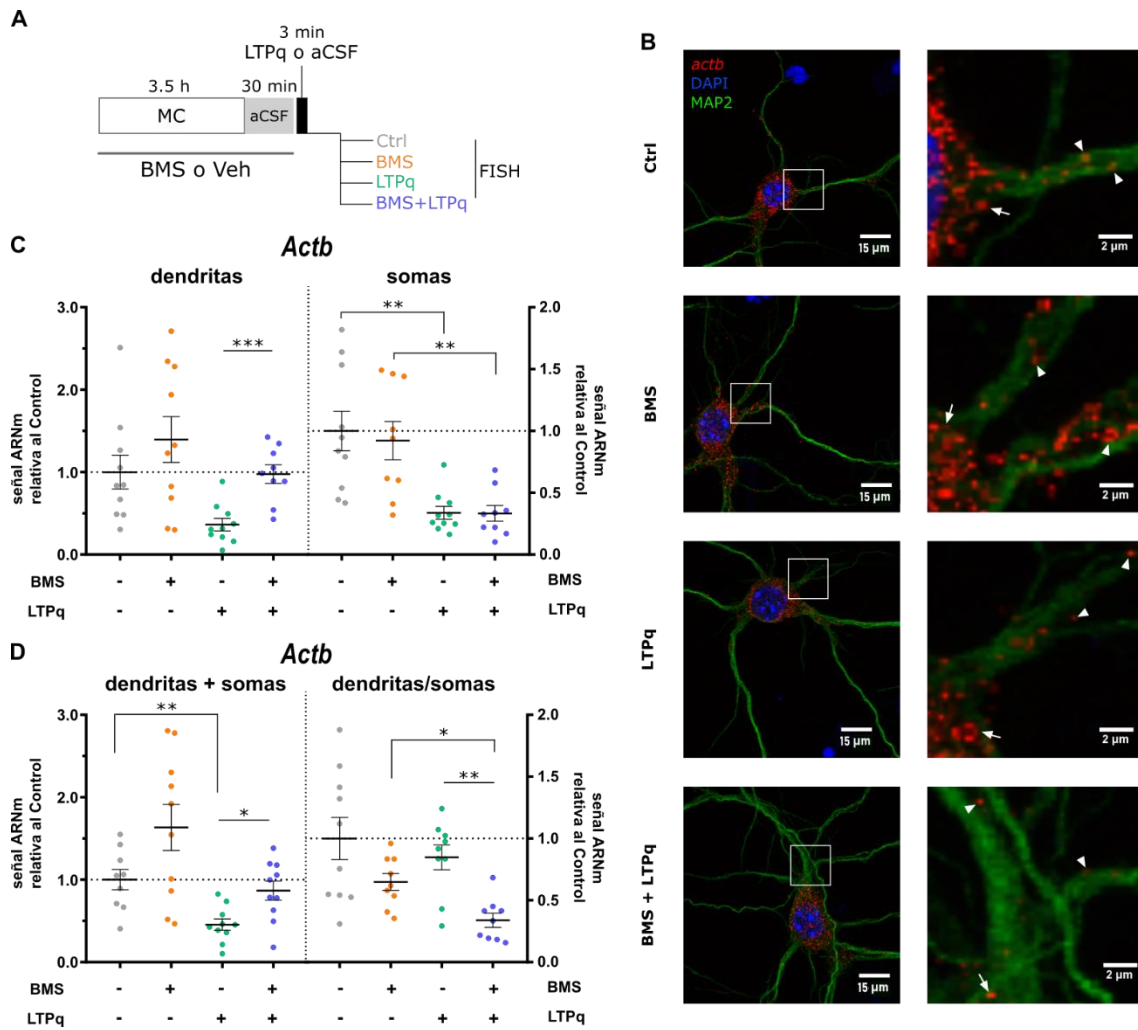


FIGURA 23. Perfil de ARNm de *Actb* luego del pre-tratamiento con BMS y la activación neuronal (LTPq). **(A)** Diseño experimental para el protocolo desarrollado. Las células del cultivo primario fueron pre-tratadas con una solución de BMS 100 μ M o Veh (0,01% DMSO) disuelta en una primera instancia en su medio de cultivo (MC) por 3,5 h y luego disuelta en una solución de aCSF suplementada por 30 min. Pasado ese tiempo, las células en cultivo fueron tratadas por 3 min ya sea con la misma solución control aCSF o con LTPq (aCSF con 200 μ M glicina). Luego, las células fueron lavadas y fijadas. **(B)** Imágenes representativas de neuronas en cultivo pre-tratadas por 4 h con BMS o Veh y tratadas por 3 min con LTPq o aCSF. Se realizó FISH de alta resolución contra ARNm de *Actb*, inmunocitoquímica contra MAP2 (como marcador dendrítico) y tinción nuclear con DAPI. Las imágenes del panel de abajo muestran una selección de las imágenes del panel de arriba, con un aumento mayor. Las cabezas de flecha marcan ejemplos de señal de ARNm de *Actb* correspondientes a las dendritas y las flechas enteras ejemplos correspondientes a los somas. **(D y E)** Cuantificación de la señal de ARNm de *Actb* en somas, dendritas (en **E**), la suma de los valores de ambas áreas (dendritas + somas en **F**) y su cociente (dendritas/somas en **F**) relativa al grupo Ctrl. El análisis estadístico asociado está descrito en la

TABLA 4.

ARNm Actb	Factor			Contraste			
				Ctrl vs		BMS+LTPq vs	
Compartimento	Pre-trat. BMS/Veh	Trat. LTPq/aCSF	Interac.	BMS	LTPq	BMS	LTPq
Dendritas	F _{1,35} = 7,43	F _{1,35} = 8,13	F _{1,35} = 0,35	F _{1,35} = 1,31	F _{1,35} = 5,96	F _{1,35} = 2,54	F _{1,35} = 21,21
	0,0100	0,0073	0,5598	0,7001	0,0771	0,3998	0,0002
Soma	F _{1,34} = 0,12	F _{1,34} = 27,92	F _{1,34} = 0,10	F _{1,34} = 0,12	F _{1,34} = 11,35	F _{1,34} = 12,60	F _{1,34} = 0,0042
	0,7259	< 0,0001	0,7593	0,9944	0,0016	0,0046	> 0,9999
Dendritas + Somas	F _{1,35} = 9,89	F _{1,35} = 15,52	F _{1,35} = 0,44	F _{1,35} = 4,28	F _{1,35} = 12,76	F _{1,35} = 6,71	F _{1,35} = 10,08
	0,0034	0,0004	0,5111	0,1717	0,0042	0,0544	0,0124
Dendritas / Somas	F _{1,33} = 16,25	F _{1,33} = 4,70	F _{1,33} = 0,54	F _{1,33} = 4,31	F _{1,33} = 0,66	F _{1,33} = 9,65	F _{1,33} = 15,35
	0,0003	0,0375	0,4678	0,1707	0,8896	0,0154	0,0017

TABLA 4. Detalle de los valores del estadístico F, los grados de libertad correspondientes (celdas en color gris) y valores p asociados (celdas en color negro) a los factores del modelo y a los contrastes entre grupos, para la señal de ARNm de *Actb* evaluada en cada compartimento. Las comparaciones entre dos grupos que resultaron significativamente diferentes están señaladas en las **FIGURA 23 D Y E**. n=9-10 imágenes por placa, una placa por grupo experimental.

Considerando los resultados obtenidos en esta sección, podemos resaltar que, a diferencia de lo observado con el ARNm de *Cfl1*, la cantidad de ARNm de *Actb* disponible para ser traducido se ve afectada principalmente por la activación neuronal, en contraste con la inhibición del LIMK que no parece ser un factor modulador para esta variable.

Capítulo 5. Estudio sobre la densidad y morfología de las espinas dendríticas de la subárea CA1 hipocampal luego de la reactivación de la memoria de miedo

Como ya se ha mencionado, la morfología y densidad de las espinas dendríticas determina la fuerza, estabilidad y eficacia de las conexiones sinápticas, que, a su vez, permiten la formación de memorias a largo término [431–435]. Cuando hablamos de morfología, nos referimos tanto a su volumen como a sus proporciones, ya que de acuerdo a su forma las espinas dendríticas pueden cumplir diferentes tipos de funciones sinápticas [185, 338, 340, 436, 437]. A pesar de que la morfología y tamaño de las espinas es variable, hace ya décadas Peters y Kaiserman-Abramof han categorizado a estas protrusiones dendríticas en tres grandes categorías: *thin*, *stubby* y *mushroom* [340]. Esta clasificación se deduce de los tamaños relativos entre el cuello y la cabeza de las espinas y, aunque se han sugerido otras variedades de morfologías generalmente relacionadas a precursores de espinas [438, 439], esta división sigue siendo la más utilizada en la bibliografía específica. Las espinas *thin* se caracterizan por su largo cuello y cabeza pequeña, las *stubby* por no tener ningún tipo de cuello entre la cabeza y el punto de unión a la dendrita, y las *mushroom* típicamente muestran una cabeza grande unida al eje dendrítico por un cuello angosto y corto [185]. Debido a estas características morfológicas, las diferentes categorías se relacionan con la maduración relativa de las espinas dendríticas y su nivel de estabilidad en el tiempo: espinas *thin* o *stubby* son catalogadas como inmaduras, generalmente transientes y, por lo tanto, más plásticas; mientras que las *mushroom* se consideran espinas estables a lo largo del tiempo, involucradas en procesos de plasticidad de largo término [208, 432, 440].

Muchos de estos cambios morfológicos asociados a fenómenos plásticos fueron estudiados en las neuronas piramidales de la subárea CA1 del hipocampo, debido a su rol principal en el procesamiento y mantenimiento de memorias de largo término [425, 441–443]. Como puede apreciarse en la FIGURA 24, las neuronas piramidales poseen un árbol dendrítico muy particular que consiste en proyecciones basales, compuestas por entre tres y cinco dendritas basales principales (*stratum oriens*), y proyecciones apicales, que

surgen de una única dendrita apical, de la que se desprenden dendritas secundarias en el *stratum radiatum* y termina en el *stratum lacunosum-moleculare*, en donde finalmente se arboriza [444, 445]. Estas neuronas, por otro lado, integran información proveniente de distintas regiones: las fibras colaterales de Schaffer provenientes del área CA3 del mismo hipocampo se comunican directamente con dendritas de neuronas piramidales en los *strata radiatum* y *oriens*, siendo este último *stratum* también el lugar de sinapsis de fibras colaterales recurrentes de las mismas neuronas piramidales de la subárea CA1, mientras que la corteza entorrinal y otras estructuras subcorticales (amígdala y corteza media prefrontal, a través del núcleo reuniens, por ejemplo) hacen sinapsis en dendritas apicales dentro del *stratum lacunosum-moleculare* [445–447].

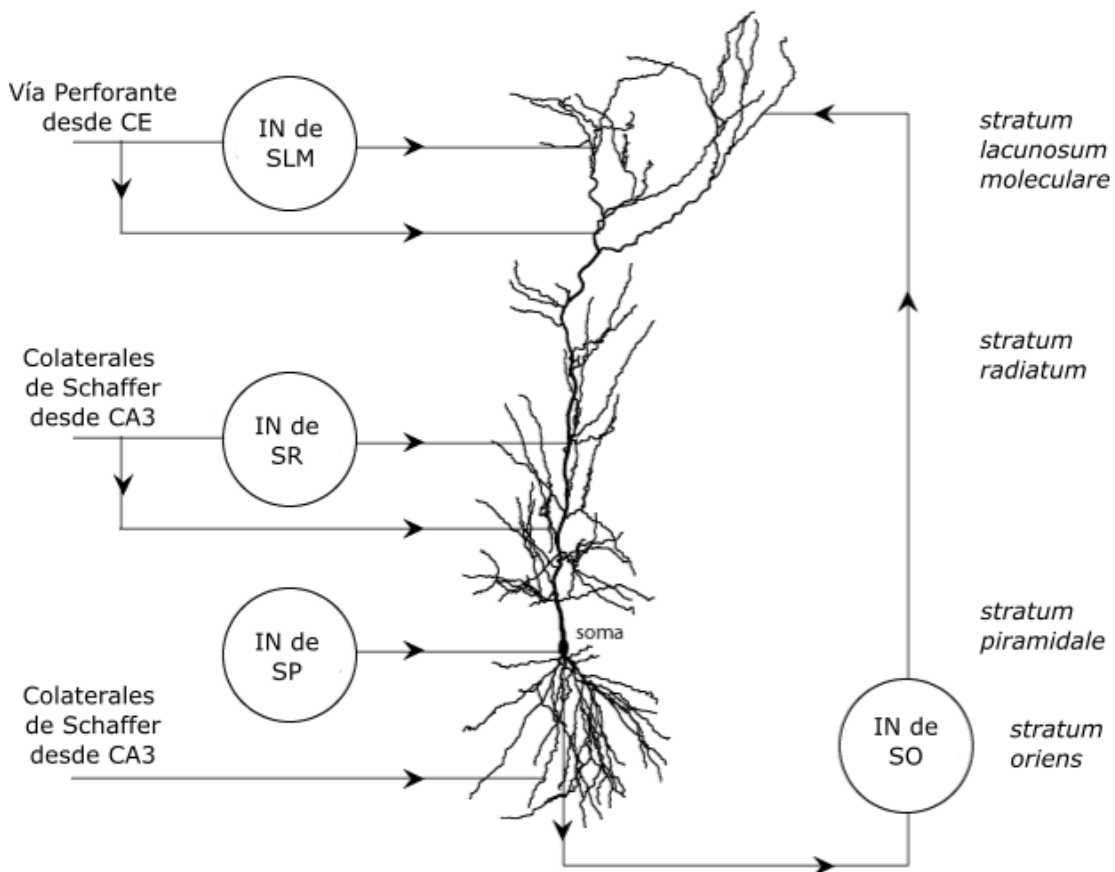


FIGURA 24. Esquema de la morfología de una neurona piramidal de la subárea CA1 del hipocampo. CE: corteza entorrinal; IN: interneurona; SLM: *stratum lacunosum-moleculare*; SR: *stratum radiatum*; SP: *stratum piramidale*; SO: *stratum oriens* (Figura adaptada de la Base de Datos de Modelados Neuronales de Spruston/Kath [448]).

En base a la relación directa entre las espinas dendríticas y el guardado de información en circuitos neuronales [211, 440, 449, 450], la morfología de las espinas

dendríticas, su volumen y su densidad han sido correlacionadas con la consolidación de procesos mnésicos en abundantes trabajos. Knafo y colaboradores encontraron una disminución significativa del largo de la cabeza de las espinas dendríticas de la corteza piriforme 36 horas de ratas después de finalizar un entrenamiento de discriminación de claves olfativas [451], González-Tapia y colaboradores observaron cambios dinámicos en la densidad de los diferentes tipos de espinas dendríticas en la corteza prefrontal de animales del mismo modelo durante el aprendizaje de una tarea acrobática [452], mientras que Leuner y colaboradores registraron un aumento en la densidad de espinas dendríticas de neuronas piramidales de la región CA1 de ratas 24 horas y 7 días después de un aprendizaje asociativo [453]. Además, O'Malley y colaboradores reportaron cambios dinámicos en la densidad de espinas dendríticas del giro dentado de la misma especie después del entrenamiento de una tarea asociativa: a las 6 horas de la finalización del aprendizaje la densidad total aumenta significativamente, mientras que vuelve a niveles basales luego de 72 horas [454]. Relacionado específicamente al paradigma de condicionamiento de miedo contextual, se ha observado un aumento en la densidad de espinas dendríticas de la región CA1 de ratones 24 horas después del entrenamiento [212, 329, 455]. Sin embargo, Matsuo y colaboradores no observaron ninguna diferencia significativa 24 o 72 horas después del condicionamiento de miedo en la densidad total o diferenciada por tipo de espina dendrítica de neuronas piramidales de la región CA1 en el modelo de ratón [190], mientras que Rusakov y colaboradores no encontraron diferencias en el tamaño, densidad total o diferenciada por tipo de espina, aunque sí en su ubicación espacial dentro de la dendrita en la región CA1 y giro dentado del hipocampo de ratas 6 días después de la finalización de un aprendizaje espacial asociativo [456].

Resultados previos obtenidos por la Dra. de la Fuente en el transcurso de su Tesis doctoral trabajando en el modelo de ratón sugieren que, 24 h después de la reactivación de la memoria de miedo contextual, la densidad de espinas dendríticas basales de la subárea CA1 dorsal disminuye significativamente, mientras que las espinas de dendritas apicales no muestran cambios en su densidad. Además, la inhibición farmacológica en el hipocampo dorsal del factor nuclear κB (NF κB), un factor de transcripción necesario para el proceso de reconsolidación de la memoria [46, 91, 327, 457–462], produce una disminución en la densidad de espinas dendríticas apicales de la subárea CA1 dorsal

[329]. Este factor de transcripción está implicado en procesos de formación de espinas dendríticas y sinapsis excitatorias *de novo*, además de ser parte de la regulación de la morfología dendrítica [463–470]. Con respecto a una memoria de miedo contextual, NFκB se activa en el hipocampo 15 minutos después de su reactivación y esta activación, junto con la re-estabilización de la memoria, son impedidas por la administración de un oligodeoxinucleótido de inhibición específica (κB decoy) inmediatamente después de la re-exposición contextual [327].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos preguntamos si los cambios estructurales en espinas dendríticas hipocampales asociados a los procesos generados por la reactivación de la memoria de miedo contextual podían ser específicos del tipo de espina dendrítica. Si éste fuese el caso, estas modificaciones estructurales podrían basarse en cambios en la densidad, en el volumen o en otras variables morfométricas de las espinas. De esta manera, decidimos realizar un experimento similar a los descritos en la [Sección 3.1](#) de esta tesis, entrenando animales en el paradigma de condicionamiento de miedo contextual y reactivando esa memoria 24 horas después, pero esta vez utilizamos ratones transgénicos. Estos ratones expresan la proteína fluorescente eGFP bajo el control de una región del promotor Thy1 modificada, que contiene las secuencias necesarias para su expresión neuronal, pero carece de las secuencias requeridas para la expresión en células no neuronales. Estos ratones que, de aquí en más serán llamados Thy1-eGFP, expresan el fluoróforo en una variedad de estructuras cerebrales, incluido el hipocampo. Específicamente en la región dorsal de la CA1, el transgén reportero no se expresa en todas las neuronas pero, cuando sí lo hace, es de una manera homogénea y consistente a lo largo de cada neurona (**FIGURA 27 A Y FIGURA 31 A**). Es por eso que esta línea de ratones resultó una herramienta ideal para evaluar distintas variables morfométricas en dendritas específicas, pudiendo generar un buen contraste con la ausencia de fluoróforo en dendritas circundantes a la evaluada.

Con el objetivo de generar reproducibilidad y continuidad con los experimentos realizados con anterioridad en esta línea de trabajo dentro del grupo de laboratorio [329], decidimos utilizar el requerimiento de NFκB en el proceso de re-estabilización de la memoria como estrategia para impedir el proceso de reconsolidación de la misma, además de que el factor tiene un rol central en la sinaptogénesis [463–470].

Entonces, en una primera instancia, evaluamos el efecto de la inhibición de este factor de transcripción en el proceso de re-estabilización de una memoria de miedo contextual, tal y como se ha hecho con anterioridad en trabajos publicados [91, 135, 329]. Utilizando ratones *wild-type*, repetimos el protocolo comportamental utilizado en los experimentos descritos en la [Sección 3.1](#), útiles para disparar los procesos de labilización y reconsolidación de la memoria, e inyectamos el inhibidor específico del factor de transcripción, κ B decoy (decoy, de aquí en más), inmediatamente después de la reactivación de la memoria. Luego, evaluamos a los animales en esta tarea 48 horas después del entrenamiento (**FIGURA 25 A**). Como se puede observar en la **FIGURA 25 B**, el grupo experimental inyectado con el oligodeoxinucleótido inhibidor de NF κ B presentó niveles significativamente menores en su comportamiento de *freezing* durante la sesión de evaluación, en comparación al grupo control, que fue inyectado de la misma manera con un oligodeoxinucleótido control ($p = 0,0003$), que posee las mismas características que el decoy, excepto su efecto inhibitorio del factor nuclear, ya que posee una base mutada (mdecoy). Es decir, la inhibición farmacológica de NF κ B en el hipocampo dorsal inmediatamente después de la reactivación de la memoria produjo un impedimento en su re-estabilización a largo término.

De esta manera, procedimos a evaluar la densidad, el volumen y la morfometría de espinas dendríticas apicales y basales de la subárea CA1 dorsal del hipocampo 24 horas después de la reactivación de la memoria. Además, evaluamos el efecto del impedimento del proceso de reconsolidación de la memoria de miedo, a través de la inhibición de NF κ B, en estas mismas variables. Para ello, repetimos el procedimiento comportamental descrito con anterioridad en ratones Thy1-eGFP y, 24 horas después de la reactivación de la memoria y posterior inyección de decoy o mdecoy, los anestesiados y sacrificamos para evaluar la densidad y morfometría de espinas dendríticas en la subárea CA1 dorsal del hipocampo (**FIGURA 25 C**). Como grupos control, además del grupo de animales cuya memoria fue reactivada y luego fueron inyectados con mdecoy (Re-Exp-mdecoy), utilizamos:

- Un par de grupos de animales que fueron re-expuestos al contexto de entrenamiento de la misma manera, pero por el lapso de 1 minuto en vez de 5 minutos, y luego fueron inyectados con decoy o mdecoy. Este tiempo más

acotado de re-exposición al contexto de entrenamiento genera la evocación de la memoria de miedo, pero no así los procesos de labilización y reconsolidación [91, 92, 423]. Estos dos grupos controlan el efecto del inhibidor específico en el proceso de evocación de la memoria, diferenciándolo del generado sobre los procesos de labilización y reconsolidación.

- Un par de grupos de animales que fueron entrenados al contexto y, 24 horas después, no fueron re-expuestos al mismo, pero sí inyectados con decoy (NR-decoy) o mdecoy. Estos dos grupos controlan el efecto del inhibidor específico en la re-exposición al contexto de entrenamiento, independientemente si luego se produce únicamente la evocación o también se reactiva esa traza mnésica.
- Un par de grupos *naïve*, que no fueron entrenados ni expuestos al contexto, pero sí fueron inyectados con decoy o mdecoy en puntos temporales equivalentes a los animales del resto de los grupos. Estos dos grupos controlan el efecto del inhibidor específico en el mantenimiento de una memoria asociativa de miedo.

Cabe destacar en esta instancia que los resultados que se muestran a continuación en este Capítulo son preliminares, ya que aún no se han podido evaluar muestras de diferentes grupos control, debido a las restricciones generadas por la pandemia de Covid-19. Por esta razón, los resultados muestran únicamente los datos de densidad y variables morfométricas de espinas dendríticas de la subárea CA1 dorsal correspondientes a los grupos re-expuestos por 5 minutos al contexto de aprendizaje e inyectados con decoy (Re-Exp-decoy) y mdecoy (Re-Exp-mdecoy), y no re-expuestos inyectados con decoy (NR-decoy). En lo que respecta a procesos mnésicos, esperamos que el grupo Re-Exp-mdecoy reactive, labilice y re-estabilice la memoria de miedo generada 24 horas antes, mientras que el grupo Re-Exp-decoy tenga un impedimento en la re-estabilización de su traza. Por otro lado, los animales del grupo NR-decoy no deberían presentar impedimentos en la retención de la memoria de miedo, ya que, como se ha evaluado previamente, NFκB no es necesario 24 horas después del entrenamiento

de miedo contextual (FIGURA 25 A). Por lo tanto, ambos grupos control (NR-decoy y Re-Exp-mdecoy) nos permiten evaluar el efecto conjunto de la inhibición de NFκB y la reactivación de la memoria, al compararlos con el grupo Re-Exp-decoy.

Como se puede observar en la FIGURA 25 D, todos los ratones presentaron un aumento en los niveles de *freezing* durante la sesión de re-exposición en función de los niveles presentados previos al entrenamiento en el día 1, sin que se observaran diferencias significativas entre los grupos experimentales (más de 7 veces su valor para Re-Exp-decoy y casi 15 veces para Re-Exp-mdecoy; $p = 0,2875$).

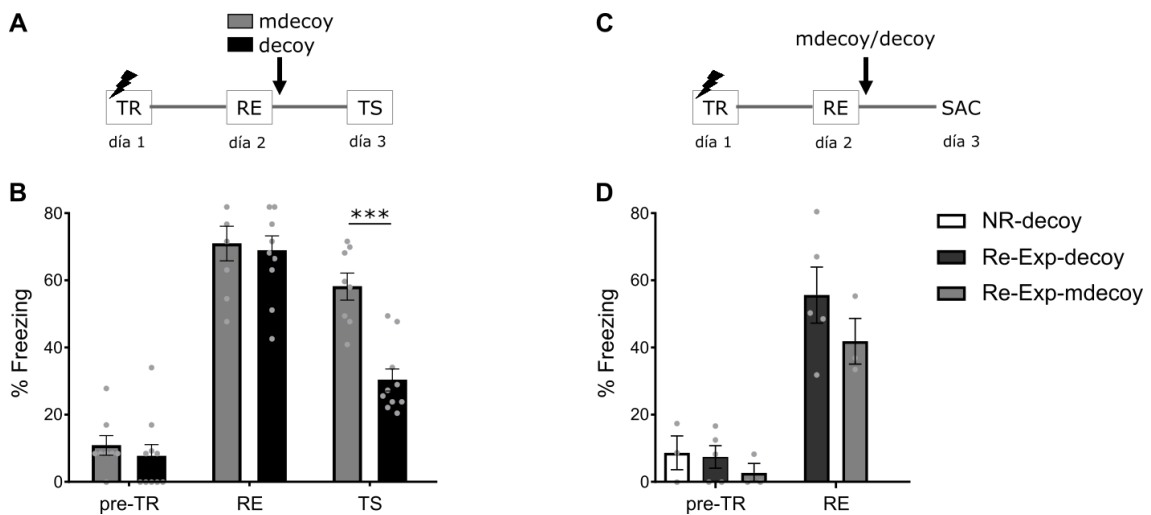


FIGURA 25. La inhibición de NF-κB en el hipocampo dorsal inmediatamente después de la reactivación de la memoria produce un impedimento sobre el proceso de reconsolidación de la memoria. **(A)** Diseño experimental para el protocolo de entrenamiento e inyección de la solución del oligodeoxinucleótido decoy o mdecoy, inmediatamente después de la reactivación en animales *wild-type*. TR: sesión de entrenamiento; RE: re-exposición de 5 min al contexto de entrenamiento; TS: sesión de evaluación de 5 min al contexto de entrenamiento; SAC: sacrificio de los animales. **(B)** Porcentaje de *freezing* de animales re-expuestos al contexto de entrenamiento e inyectados con decoy o mdecoy. pre-TR: exposición de 2 min al contexto de entrenamiento para establecer el nivel de *freezing* basal; $n=8-10$. Factor tiempo: $F_{2,32} = 168,4$, $p < 0,0001$; factor grupo: $F_{1,16} = 7,402$, $p = 0,0151$; interacción $F_{2,32} = 9,645$, $p = 0,0005$; Contrastes en RE: $t = 0,3088$, $p = 0,7618$; en TS: $F_{1,48} = 5,372$, $p = 0,0003$. **(C)** Idem (A), para animales Thy1-eGFP inyectados inmediatamente después de la re-exposición al contexto de entrenamiento (para animales RE) o en puntos temporales equivalentes (para animales NR). Este protocolo fue utilizado en el experimento descrito en las siguientes secciones del Capítulo. **(D)** Porcentaje de *freezing* de animales re-expuestos al contexto de entrenamiento (RE) o no re-expuestos (NR), e inyectados con decoy o mdecoy. pre-TR: exposición de 2 min al contexto de entrenamiento para establecer el nivel de *freezing* basal; $n=3-5$. Factor tiempo: $F_{1,6} = 81,56$, $p = 0,0001$; factor grupo: $F_{1,6} = 1,362$, $p = 0,2875$; interacción $F_{1,6} = 0,8676$, $p = 0,3876$.

En las siguientes secciones de este Capítulo, se describirán los diferentes resultados de los tratamientos sobre la densidad y variables morfométricas de las espinas

dendríticas de la subárea CA1 dorsal. Los mismos fueron divididos en dos secciones, en base a la ubicación de las dendritas evaluadas, correspondiendo a las sub-áreas apical o basal de las neuronas piramidales. Este análisis diferencial según la ubicación espacial de las dendritas se basa en sus respectivas conexiones con otras áreas cerebrales: tanto las apicales como las basales reciben inervación de la subárea CA3 hipocampal y fibras recurrentes de la misma CA1, mientras que áreas extra-hipocampales involucradas en este tipo de memoria sólo se conectan con las dendritas apicales de estas neuronas piramidales [445–447].

5.1 Análisis en espinas dendríticas basales

Primero, evaluamos la densidad de espinas en dendritas basales de tres grupos de animales que fueron entrenados en el paradigma de condicionamiento de miedo: re-expuestos al contexto de entrenamiento e inyectados, ya sea con decoy (Re-Exp-decoy) o mdecoy (Re-Exp-mdecoy), o no re-expuestos al contexto e inyectados con decoy (NR-decoy). Todos los animales fueron sacrificados 48 horas después de la sesión de entrenamiento y la posterior cuantificación incluyó tanto la densidad total de espinas dendríticas basales, como su discriminación por tipo de espina: *mushroom*, *thin* y *stubby*, ejemplificadas en la FIGURA 27. Como se puede observar en el panel izquierdo de la FIGURA 27 A, la densidad total de espinas es significativamente menor en el grupo Re-Exp-decoy con respecto al grupo que no fue reactivado (Re-Exp-decoy vs NR-decoy; $p = 0,0341$) y presenta una tendencia no significativa con respecto al grupo inyectado con mdecoy (Re-Exp-decoy vs Re-Exp-mdecoy; $p = 0,1033$). Entonces, un impedimento en el proceso de reconsolidación tiene el efecto de reducir no significativamente la densidad total de espinas dendríticas basales en los animales cuya memoria fue reactivada. Lamentablemente, con los datos disponibles en el momento de la escritura de esta Tesis, no es posible evaluar el efecto de la administración de mdecoy con respecto a la reactivación de la memoria. El grupo Re-Exp-mdecoy presenta una mayor variabilidad en sus datos, con respecto a los otros dos grupos, probablemente debido a una cantidad menor de animales evaluados bajo esa combinación de tratamientos. Por lo tanto, con una cantidad de datos mayor para este grupo esperaríamos que la estimación de su media sea fuera precisa y así dilucidar si la diferencia observada con respecto al grupo Re-Exp-decoy resulta significativa.

Por otro lado, esta diferencia en la densidad total de espinas basales no parece estar determinada por un cambio en la cantidad de un solo tipo específico de espina, sino más bien por una tendencia a la disminución por parte de las espinas *mushroom* y *thin* (panel derecho de la FIGURA 27 B). Sin embargo, esta tendencia no se ve reflejada en un cambio en las proporciones de cada tipo de espina, ya que la proporción de espinas *mushroom* disminuye sólo un 6% y las *thin* no varían en su proporción 24 horas después de la re-exposición al contexto de entrenamiento (FIGURA 27 B).

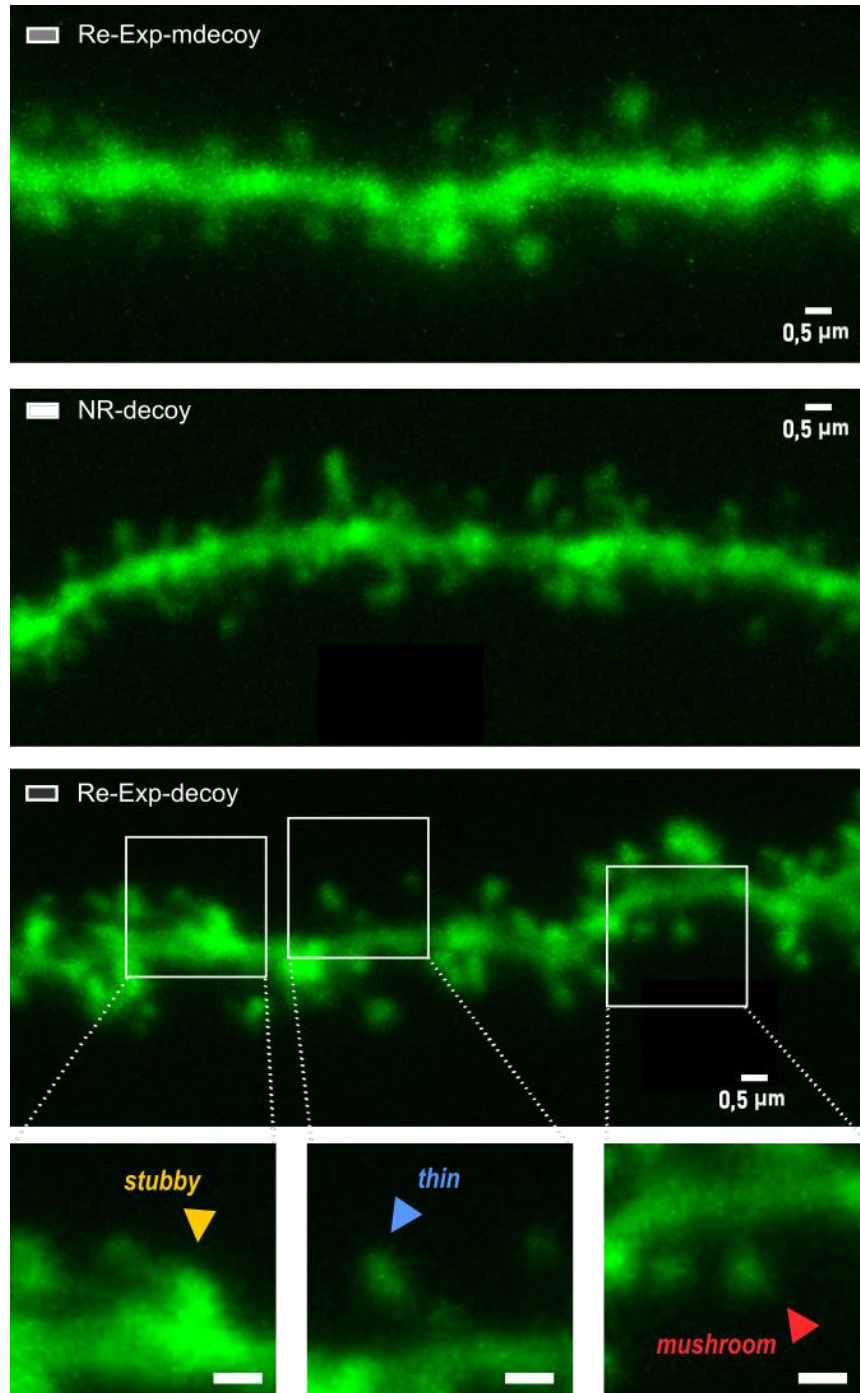


FIGURA 26. Imagen representativa de una dendrita basal de la subárea CA1 dorsal del hipocampo de un ratón de cada grupo experimental (los mismos individuos se muestran en la Figura 25). Se puede observar la señal del fluoróforo eGFP en el eje de la dendrita y sus espinas (panel superior). Se muestran ejemplos de cada tipo de espina, según la clasificación mencionada con anterioridad, señaladas con cabezas de flecha (panel inferior). La escala representa 0,5 μm.

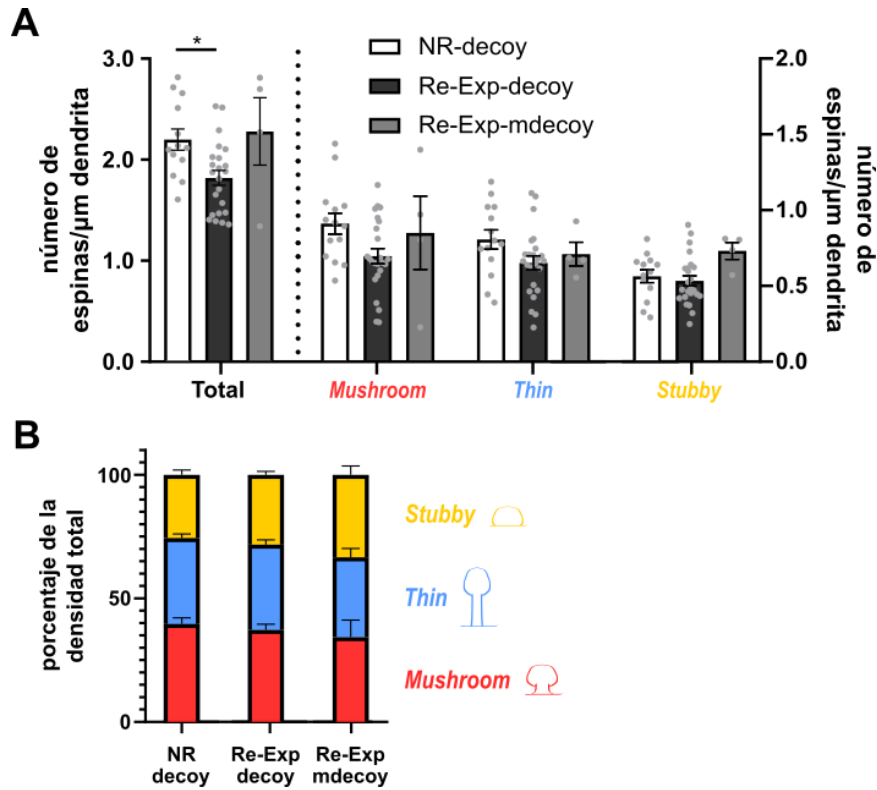


FIGURA 27. La inhibición de NF-κB en el hipocampo dorsal inmediatamente después de la reactivación de la memoria produce una disminución en la densidad total de espinas dendríticas basales de la subárea CA1 dorsal. **(A)** Densidad de espinas dendríticas (expresada como número de espinas cada μm de dendrita) clasificadas por tipo (panel izquierdo) y totales (panel derecho); $n=1-7$ imágenes por animal, 3-5 animales por grupo. Para espinas *mushroom*: Factor grupo: $F_{2,6} = 1,43$, $p = 0,3110$; para espinas *thin*: Factor grupo: $F_{2,6} = 1,14$, $p = 0,3795$; para espinas *stubby*: Factor grupo: $F_{2,6} = 2,23$, $p = 0,1506$; para el total de espinas: Factor grupo: $F_{2,6} = 5,01$, $p = 0,0261$; Contrastes: NR-decoy vs Re-Exp-decoy: $F_{1,6} = 7,63$, $p = 0,0341$; Re-Exp-mdecoy vs RE-decoy: $F_{1,6} = 4,60$, $p = 0,1033$. **(B)** Porcentaje de cada tipo de espina dendrítica que compone la densidad total de cada grupo.

Con respecto al volumen, evaluamos dos variables diferentes que aportan distinto tipo de información al análisis. Por un lado, promediamos el volumen de todas las espinas dendríticas de cada dendrita basal de cada sujeto experimental, arribando al volumen medio de las espinas (FIGURA 28 A). Por otro, consideramos los valores individuales de cada espina perteneciente al decil más alto de la distribución dentro de cada dendrita basal de cada sujeto experimental (FIGURA 28 B). De esta manera, esta última variable nos habla del efecto de los tratamientos sobre las espinas con mayor volumen, lo que nos permite evaluar si la re-exposición al contexto de entrenamiento y/o la inhibición del proceso de reconsolidación de la memoria generan una diferencia en el volumen máximo registrado en las espinas basales. Esta misma distinción no se realizó con el primer decil de la distribución de volumen de cada espina (espinas con menor volumen de cada dendrita de cada sujeto), ya que en la distribución de los datos se pudo observar que había una

cota inferior, probablemente debida al umbral de detección de la técnica utilizada y el posterior procesamiento de los datos.

Tanto para la variable de volumen medio de las espinas de una dendrita basal como para los volúmenes individuales del último decil de espinas, no se observaron diferencias significativas a partir de la re-exposición al contexto de entrenamiento o la inhibición del proceso de reconsolidación de la memoria (FIGURA 28).

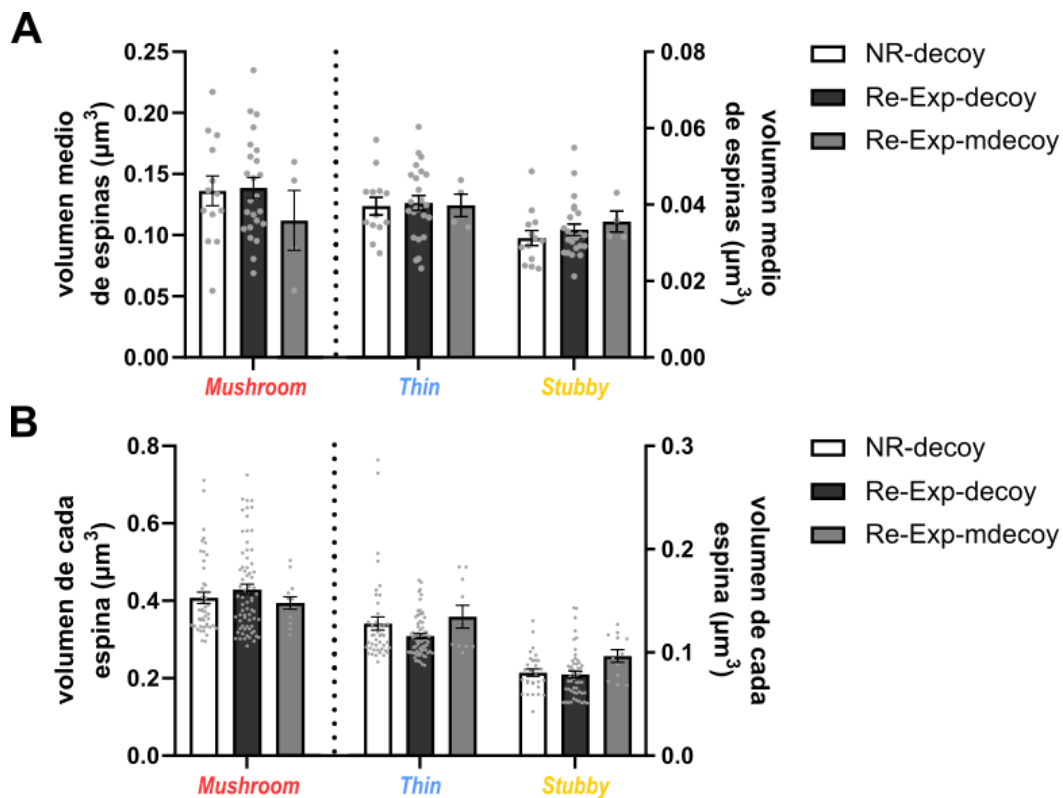


FIGURA 28. La inhibición de NF-κB en el hipocampo dorsal inmediatamente después de la reactivación de la memoria no produce cambios significativos en el volumen de las espinas dendríticas basales de la subárea CA1 dorsal. **(A)** Volumen medio de las espinas dendríticas (en μm^3); $n=1-7$ imágenes por animal, 3-5 animales por grupo. Para espinas *mushroom*: Factor grupo: $F_{2,6} = 0,53$, $p = 0,6113$; para espinas *thin*: Factor grupo: $F_{2,6} = 0,40$, $p = 0,6889$; para espinas *stubby*: Factor grupo: $F_{2,6} = 0,85$, $p = 0,4713$. La línea punteada denota los grupos de espinas que deben evaluarse en cada eje de ordenadas (vertical). **(B)** Volumen de cada espina dendrítica (en μm^3); $n=1-15$ espinas por imagen, 1-7 imágenes por animal, 3-5 animales por grupo. Para espinas *mushroom*: Factor grupo: $F_{2,6} = 0,41$, $p = 0,6824$; para espinas *thin*: Factor grupo: $F_{2,6} = 2,60$, $p = 0,1534$; para espinas *stubby*: Factor grupo: $F_{2,6} = 0,43$, $p = 0,6685$. La línea punteada denota los grupos de espinas que deben evaluarse en cada eje de ordenadas (vertical).

En base a estos resultados y debido a que es posible que la proporción o volumen de cada tipo de espina no varíe a partir de los tratamientos aplicados, pero sí lo hagan

diferentes variables morfométricas que componen al análisis que determina el volumen y la clasificación en los diferentes tipos de espinas, decidimos evaluar esas variables. Para ello, utilizamos los valores individuales de cada espina perteneciente al decil más alto de la distribución de cada variable, dentro de cada dendrita de cada sujeto experimental, debido a las razones anteriormente explicadas. Como se puede observar en las FIGURA 29 A, B y D, el diámetro de la cabeza de la espina, el diámetro del cuello y su largo total, evaluadas dentro de cada tipo de espina, no varían significativamente entre grupos experimentales. Sin embargo, en el caso de la primera variable, que está correlacionada con la presencia de una densidad postsináptica más grande [199, 200, 426, 471–474], presenta una tendencia a disminuir en espinas *mushroom* cuando se impide la reconsolidación de la memoria (Re-Exp-decoy vs Re-Exp-mdecoy en la FIGURA 29 A). A su vez, se observa una tendencia no significativa a disminuir el diámetro del cuello de las espinas *mushroom* a partir de la inhibición de este proceso de memoria (Re-Exp-decoy vs Re-Exp-mdecoy en la FIGURA 29 B), característica que se correlaciona con un mayor aislamiento de corrientes de calcio involucradas en la eficacia sináptica [167, 189, 194, 440, 475–479]. Por lo tanto, estamos observando, por un lado, un efecto que indicaría una disminución en el tamaño de la PSD, lo que llevaría a una menor eficacia sináptica, mientras que, por otro, el aislamiento de la espina aumenta, implicando un aumento en la compartimentalización de la espina. A pesar de esta contradicción en las tendencias observadas para los diámetros de la cabeza y cuello de las espinas *mushroom* basales, se observa también una tendencia no significativa a aumentar la relación entre ambas variables, expresada como su cociente, lo que habla de una tendencia a aumentar la compartimentalización en este tipo de espinas a partir del impedimento de la reconsolidación de la memoria (Re-Exp-decoy vs Re-Exp-mdecoy en la FIGURA 29 C).

Con respecto a las espinas del tipo *thin*, se puede observar que la relación entre los diámetros de la cabeza y el cuello es significativamente menor a partir de la inhibición del proceso de reconsolidación de la memoria (Re-Exp-decoy vs Re-Exp-mdecoy en la FIGURA 29 C; $p = 0,0288$), diferencia que no se aprecia al evaluar las variables por separado (FIGURA 29 A y B). Esto puede deberse a una mayor dispersión presentada por este tipo de espinas basales en la morfología, con respecto a los otros dos tipos de espina. De esta manera, hay mayor variabilidad en lo que respecta a cada parámetro evaluado por

separado, aunque no así cuando se considera la relación entre ambos, lo que habla de una mayor dispersión entre las morfologías posibles dentro de las espinas *thin* basales, pero con una diferencia significativa en una variable que se correlaciona con la compartimentalización de estas espinas. Los animales que fueron re-expuestos al contexto de entrenamiento, pero la estabilización de esa memoria fue impedida presentan niveles de compartimentalización de las espinas *thin* basales comparables a los animales cuya memoria no fue reactivada, valores que, a su vez, son significativamente mayores a los presentados por animales que reactivaron y re-estabilizaron su traza mnésica.

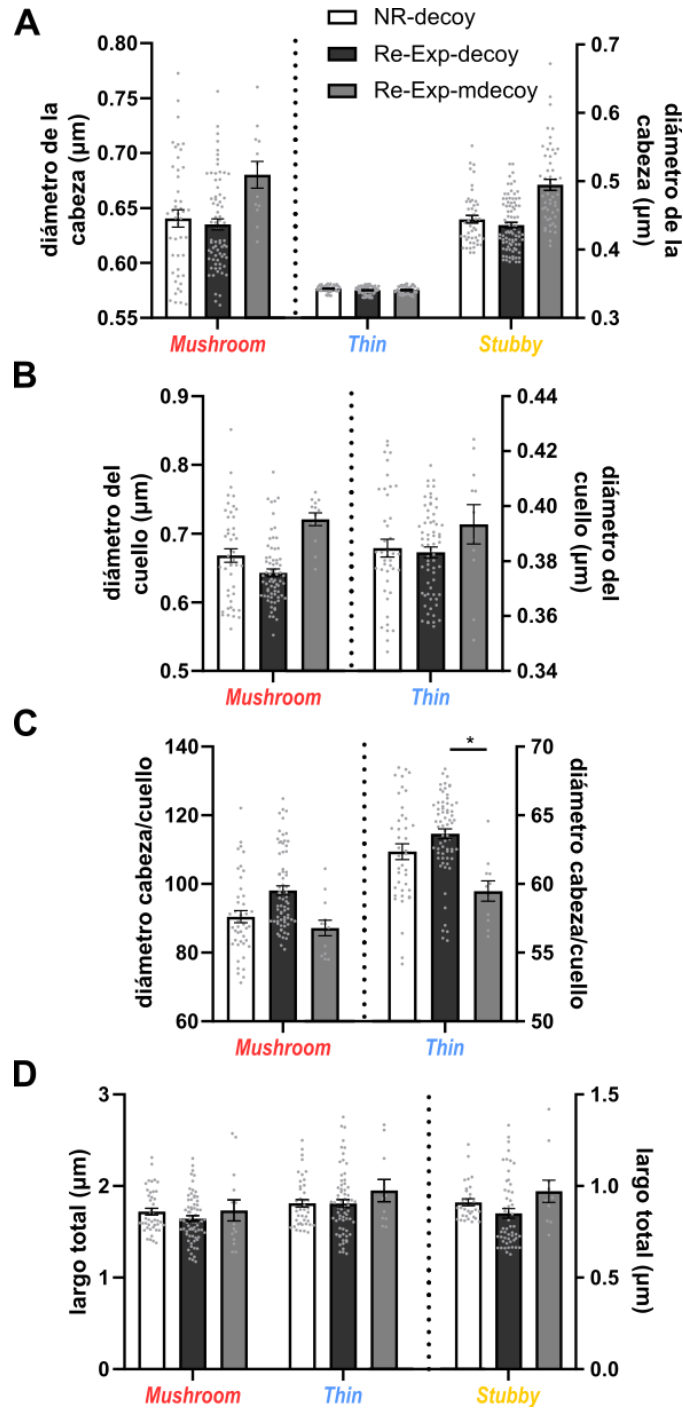


FIGURA 29. La inhibición de NF-κB en el hipocampo dorsal inmediatamente después de la reactivación de la memoria produce la disminución significativa de la relación entre la cabeza y el cuello de las espinas dendríticas *thin* basales de la subárea CA1 dorsal. **(A)** Diámetro de la cabeza de las espinas dendríticas (en µm); n=1-15 espinas por imagen, 1-7 imágenes por animal, 3-5 animales por grupo. Para espinas *mushroom*: Factor grupo: $F_{2,6} = 0,74$, $p = 0,5148$; para espinas *thin*: Factor grupo: $F_{2,6} = 0,02$, $p = 0,9803$; para espinas *stubby*: Factor grupo: $F_{2,6} = 0,76$, $p = 0,5067$. La línea punteada denota los grupos de espinas que deben evaluarse en cada eje de ordenadas (vertical). **(B)** Diámetro del cuello de las espinas dendríticas (en µm); n=1-15 espinas por imagen, 1-7 imágenes por animal, 3-5 animales por grupo. Para espinas *mushroom*: Factor grupo: $F_{2,6} = 2,95$, $p = 0,1282$; para espinas *thin*: Factor grupo: $F_{2,6} = 0,34$, $p = 0,7270$. La línea punteada denota los grupos de espinas que deben evaluarse en cada eje de ordenadas (vertical). **(C)** Cociente entre el diámetro de la cabeza y el del cuello de las espinas dendríticas; n=1-15 espinas por imagen, 1-7 imágenes por animal, 3-5 animales por grupo. Para espinas *mushroom*: Factor grupo: $F_{2,6} =$

1,39, $p = 0,3184$; para espinas *thin*: Factor grupo: $F_{2,6} = 6,18$, $p = 0,0349$; Contrastes: NR-decoy vs RE-decoy: $F_{1,6} = 3,18$, $p = 0,2339$; Re-Exp -mdecoy vs Re-Exp -decoy: $F_{1,6} = 11,55$, $p = 0,0288$. La línea punteada denota los grupos de espinas que deben evaluarse en cada eje de ordenadas (vertical). **(D)** Largo total de las espinas dendríticas (en μm); $n=1-15$ espinas por imagen, 1-7 imágenes por animal, 3-5 animales por grupo. Para espinas *mushroom*: Factor grupo: $F_{2,6} = 0,17$, $p = 0,8482$; para espinas *thin*: Factor grupo: $F_{2,6} = 0,45$, $p = 0,6572$; para espinas *stubby*: Factor grupo: $F_{2,6} = 0,76$, $p = 0,5081$. La línea punteada denota los grupos de espinas que deben evaluarse en cada eje de ordenadas (vertical).

En resumen, por un lado, el tratamiento con el inhibidor de NF κ B, que genera un impedimento en el proceso de reconsolidación de la memoria, genera una tendencia a la disminución de la densidad total de espinas dendríticas basales en los animales cuya memoria fue reactivada. Por otro, este impedimento dio lugar a niveles de compartimentalización de las espinas *thin* basales comparables a los animales cuya memoria no fue reactivada, valores que, a su vez, son significativamente mayores a los presentados por animales que reactivaron y re-estabilizaron su traza mnésica.

5.2 Análisis en espinas dendríticas apicales

De la misma forma que en [la sección anterior](#), evaluamos la densidad de espinas en dendritas apicales de los tres grupos de animales 24 horas después de la sesión de reactivación de la memoria (**FIGURA 30**). En este caso, la densidad total de espinas no varía significativamente a partir de la re-exposición al contexto de entrenamiento o el impedimento del proceso de reconsolidación (panel izquierdo en la **FIGURA 31 A**). Sin embargo, ambos tratamientos tienen un efecto particular en la densidad de las espinas *mushroom*, al disminuir sus valores de forma significativa (NR-decoy vs Re-Exp-decoy: $p = 0,0133$; Re-Exp -mdecoy vs Re-Exp -decoy: $p = 0,0011$; panel derecho de la **FIGURA 31 A**). Existe la posibilidad de que ambos efectos no sean aditivos, sino que, considerando que ambos producen una disminución en la densidad, su combinación resulte en un efecto sinérgico. Es decir, por ejemplo, que tanto la reactivación de la memoria, como el impedimento del proceso de reconsolidación, *per se* produzcan la disminución parcial de espinas *mushroom* en dendritas apicales de la subárea CA1 dorsal, pero al combinarse ese efecto sea mayor. Con los datos disponibles hasta la escritura de esta Tesis, esa hipótesis no puede probarse aún, ya que no contamos con suficientes grupos experimentales que puedan dar cuenta del efecto de la interacción de ambos tratamientos en las variables evaluadas.

Con respecto a la proporción de cada tipo, como se puede observar en la **FIGURA 31 B**, las espinas *mushroom* son las únicas que presentan una disminución a partir de la reactivación de la memoria y el impedimento del proceso de reconsolidación (14,79 % y 12,28 % de disminución, en cada caso). Los otros dos tipos de espinas, *thin* y *stubby*, que se corresponden con una menor madurez en las conexiones sinápticas, aumentan en proporción a partir de ambos tratamientos (9,74 % y 17,18 % de aumento producto de la reactivación de la memoria, y 14,85 % y 6,16 % de aumento producto del impedimento en la reconsolidación, para espinas *thin* y *stubby*, respectivamente).

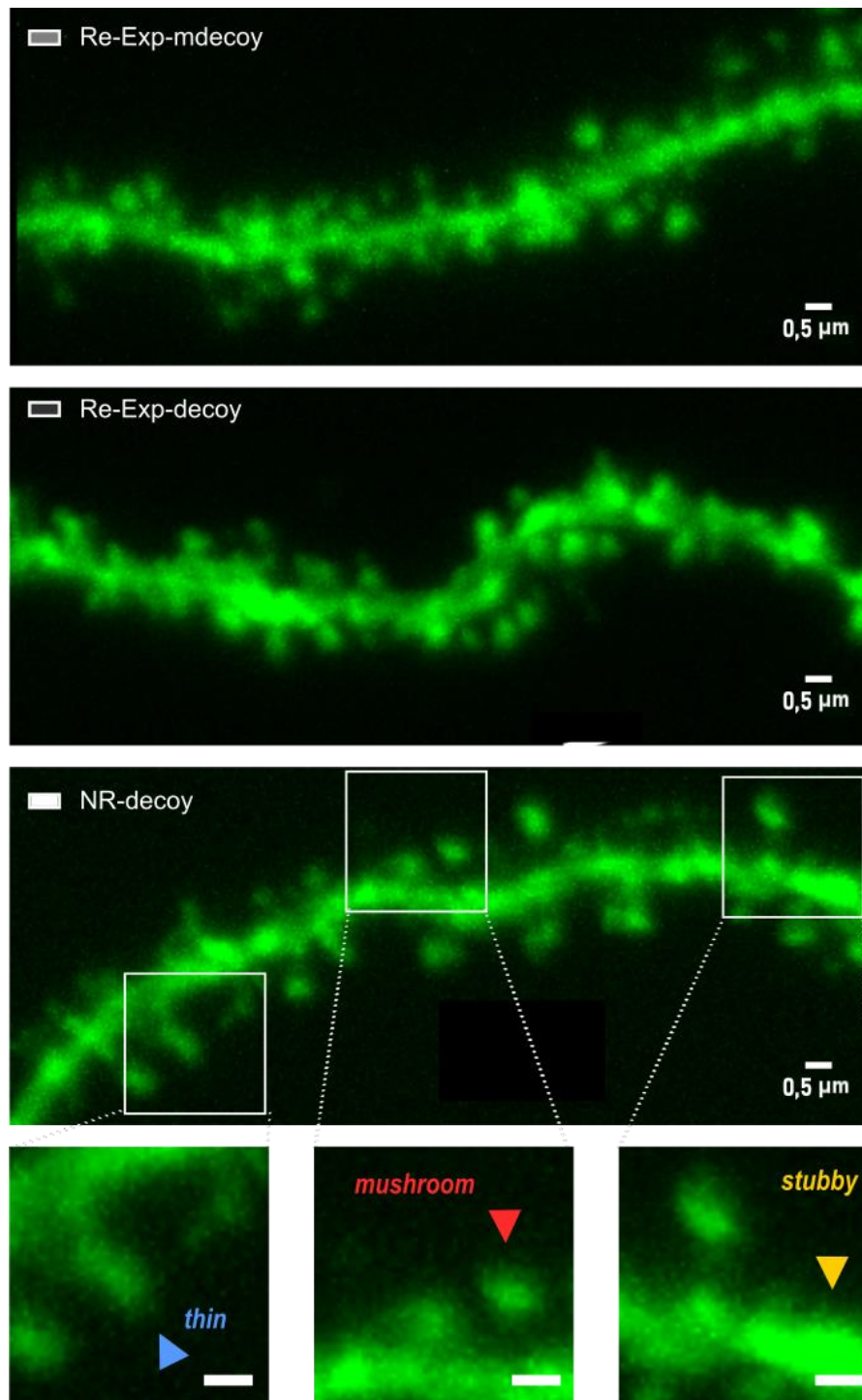


FIGURA 30. Imagen representativa de una dendrita basal de de la subárea CA1 dorsal del hipocampo de un ratón de cada grupo experimental (los mismos individuos se muestran en la Figura 21). Se puede observar la señal del fluoróforo eGFP en el eje de la dendrita y sus espinas (panel superior). Se muestran ejemplos de cada tipo de espina, según la clasificación mencionada con anterioridad, señaladas con cabezas de flecha (panel inferior). La escala representa 0,5 μm.

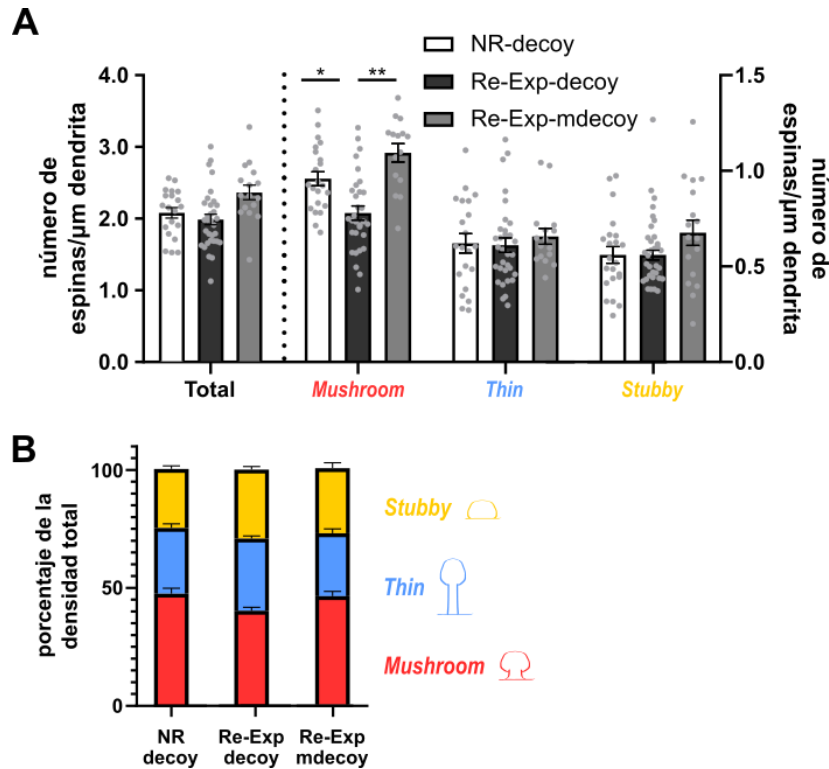


FIGURA 31. La re-exposición al contexto de entrenamiento y la inhibición de NF-κB en el hipocampo dorsal inmediatamente después de la reactivación de la memoria producen una disminución significativa en la densidad de espinas dendríticas apicales del tipo mushroom en la subárea CA1 dorsal. **(A)** Densidad de espinas dendríticas (expresada como número de espinas cada μm de dendrita) clasificadas por tipo (panel izquierdo) y totales (panel derecho); $n=4-8$ imágenes por animal, 3-5 animales por grupo. Para espinas *mushroom*: Factor grupo: $F_{2,6} = 16,67$, $p = 0,0014$; Contrastes: NR-decoy vs Re-Exp-decoy: $F_{1,6} = 13,18$, $p = 0,0133$; Re-Exp -mdecoy vs Re-Exp -decoy: $F_{1,6} = 30,60$, $p = 0,0011$; para espinas *thin*: Factor grupo: $F_{2,6} = 0,17$, $p = 0,8456$; para espinas *stubby*: Factor grupo: $F_{2,6} = 0,46$, $p = 0,6455$; para el total de espinas: Factor grupo: $F_{2,6} = 1,76$, $p = 0,2320$. **(B)** Porcentaje de cada tipo de espina dendrítica que compone la densidad total de cada grupo.

Con respecto al volumen, evaluamos las mismas dos variables que se explicaron en [la sección anterior](#), las cuales, en este caso, presentan tendencias similares en los grupos experimentales analizados. Ya sea para la variable de volumen medio de las espinas de una dendrita basal (**FIGURA 32 A**), como para los volúmenes individuales del último decil de espinas (**FIGURA 32 B**), y al igual que se había observado para las espinas basales, no se presentaron diferencias significativas a partir de la re-exposición al contexto de entrenamiento o la inhibición del proceso de reconsolidación de la memoria.

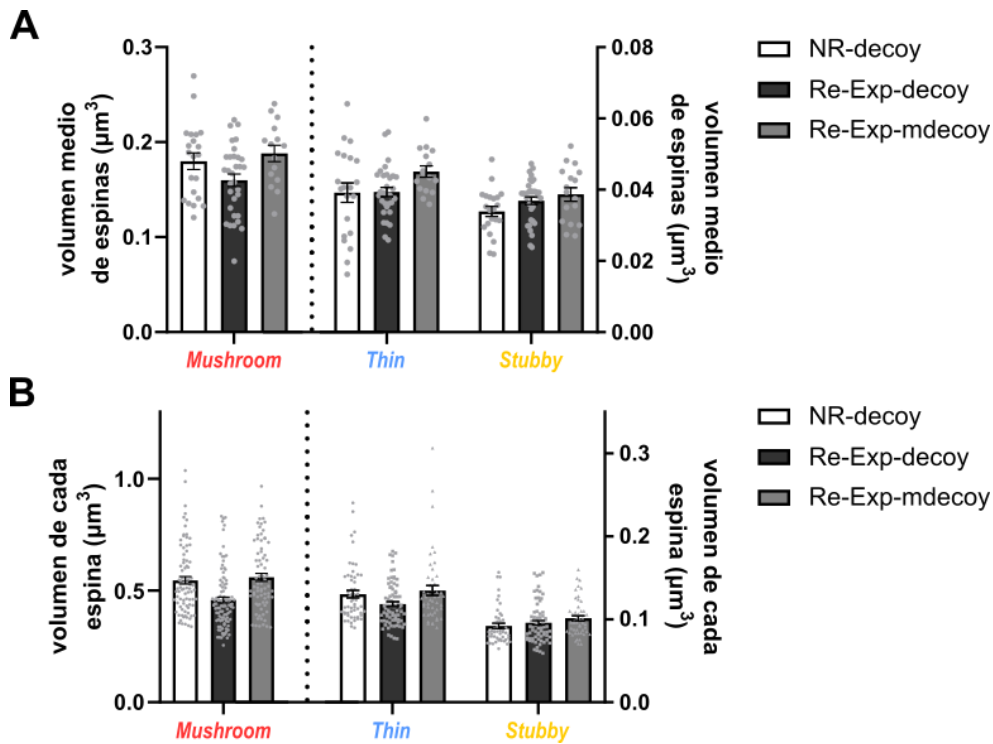


FIGURA 32. La inhibición de NF-κB en el hipocampo dorsal inmediatamente después de la reactivación de la memoria no produce cambios significativos en el volumen de las espinas dendríticas apicales de la subárea CA1 dorsal. **(A)** Volumen medio de las espinas dendríticas (en μm^3); $n=4-8$ imágenes por animal, 3-5 animales por grupo. Para espinas *mushroom*: Factor grupo: $F_{2,6} = 1,29$, $p = 0,3259$; para espinas *thin*: Factor grupo: $F_{2,6} = 1,62$, $p = 0,2560$; para espinas *stubby*: Factor grupo: $F_{2,6} = 2,18$, $p = 0,1441$. La línea punteada denota los grupos de espinas que deben evaluarse en cada eje de ordenadas (vertical). **(B)** Volumen de cada espina dendrítica (en μm^3); $n=1-14$ espinas por imagen, $n=4-8$ imágenes por animal, 3-5 animales por grupo. Para espinas *mushroom*: Factor grupo: $F_{2,6} = 2,18$, $p = 0,1754$; para espinas *thin*: Factor grupo: $F_{2,6} = 2,10$, $p = 0,1848$; para espinas *stubby*: Factor grupo: $F_{2,6} = 1,11$, $p = 0,3752$. La línea punteada denota los grupos de espinas que deben evaluarse en cada eje de ordenadas (vertical).

De la misma manera que para las espinas basales, evaluamos luego las diferentes variables morfométricas que componen al análisis que determina el volumen y la clasificación en los diferentes tipos de espinas. En la **FIGURA 33** se muestran los resultados obtenidos para los valores individuales de cada espina perteneciente al decil más alto de la distribución de cada variable, dentro de cada dendrita de cada sujeto experimental. Como se puede observar, los animales que reactivaron su memoria, pero no pudieron reestabilizarla correctamente presentan niveles significativamente menores en el diámetro de la cabeza de las espinas *mushroom* (Re-Exp -mdecoy vs Re-Exp -decoy: $p = 0,0475$; **FIGURA 33 A**) y en el largo total de las espinas *stubby* (Re-Exp -mdecoy vs Re-Exp -decoy: $p = 0,0136$; **FIGURA 33 D**). Esta misma tendencia entre ambos grupos, pero en este caso no significativa, se presentó con respecto al diámetro del cuello de las espinas *mushroom*

(Factor grupo: $p = 0,2146$; FIGURA 33 B). En cambio, y a diferencia de lo que sucede en las espinas basales, la madurez de las espinas en términos de relación cabeza-cuello no varía de forma significativa a partir de los tratamientos realizados (FIGURA 33 C).

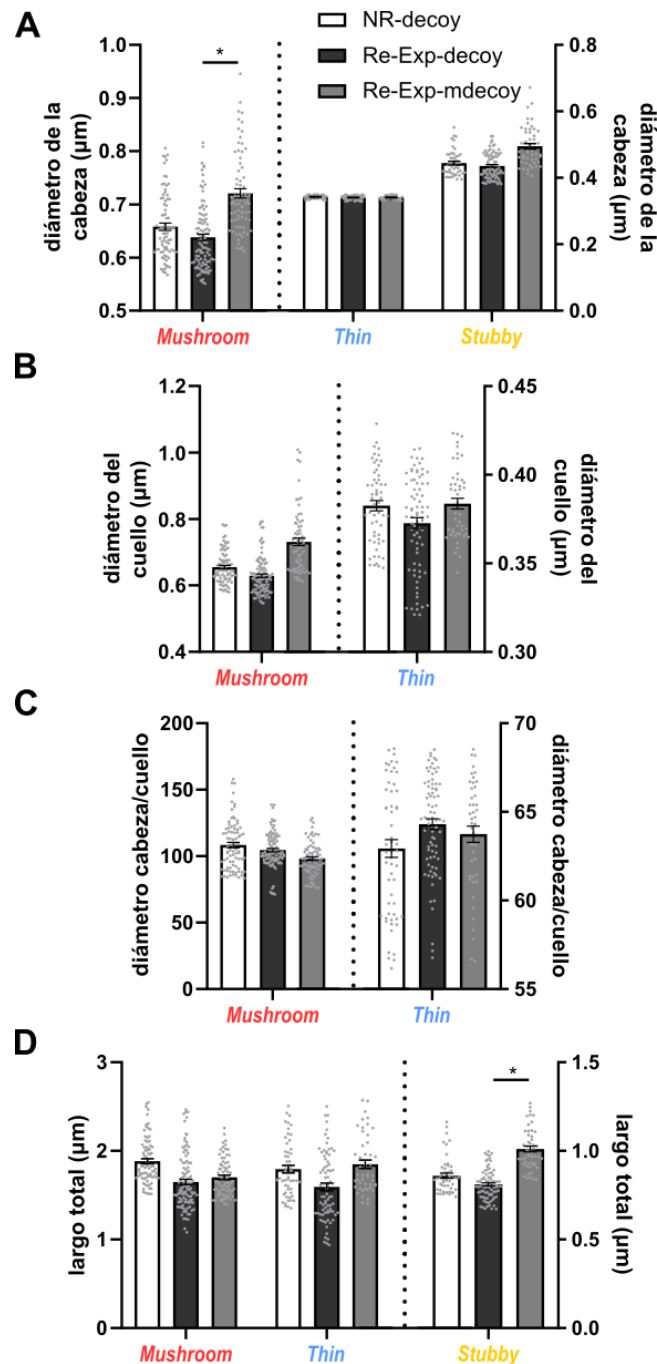


FIGURA 33. La inhibición de NF- κ B en el hipocampo dorsal inmediatamente después de la reactivación de la memoria no produce cambios significativos en variables morfométricas de las espinas dendríticas apicales de la subárea CA1 dorsal. **(A)** Diámetro de la cabeza de las espinas dendríticas (en μm); $n=1-14$ espinas por imagen, $n=4-8$ imágenes por animal, 3-5 animales por grupo. Para espinas *mushroom*: Factor grupo: $F_{2,6} = 3,92$, $p = 0,0650$; Contrastes: NR-decoy vs Re-Exp -decoy: $F_{1,6} = 0,51$, $p = 0,7465$; Re-Exp -mdecoy vs Re-Exp -decoy: $F_{1,6} = 7,71$, $p = 0,0475$; para espinas *thin*: Factor grupo: $F_{2,6} = 0,43$, $p = 0,6621$; para espinas *stubby*:

Factor grupo: $F_{2,6} = 2,09$, $p = 0,1866$. La línea punteada denota los grupos de espinas que deben evaluarse en cada eje de ordenadas (vertical). **(B)** Diámetro del cuello de las espinas dendríticas (en μm); $n=1-14$ espinas por imagen, 1-7 imágenes por animal, 3-5 animales por grupo. Para espinas *mushroom*: Factor grupo: $F_{2,6} = 1,88$, $p = 0,2146$; para espinas *thin*: Factor grupo: $F_{2,6} = 0,15$, $p = 0,8669$. La línea punteada denota los grupos de espinas que deben evaluarse en cada eje de ordenadas (vertical). **(C)** Cociente entre el diámetro de la cabeza y el del cuello de las espinas dendríticas; $n=1-14$ espinas por imagen, $n=4-8$ imágenes por animal, 3-5 animales por grupo. Para espinas *mushroom*: Factor grupo: $F_{2,6} = 0,53$, $p = 0,6065$; para espinas *thin*: Factor grupo: $F_{2,6} = 0,70$, $p = 0,5259$. La línea punteada denota los grupos de espinas que deben evaluarse en cada eje de ordenadas (vertical). **(D)** Largo total de las espinas dendríticas (en μm); $n=1-14$ espinas por imagen, 1-7 imágenes por animal, 3-5 animales por grupo. Para espinas *mushroom*: Factor grupo: $F_{2,6} = 2,00$, $p = 0,1973$; para espinas *thin*: Factor grupo: $F_{2,6} = 2,68$, $p = 0,1283$; para espinas *stubby*: Factor grupo: $F_{2,6} = 6,76$, $p = 0,0191$; Contrastes: NR-decoy vs Re-Exp -decoy: $F_{1,6} = 1,21$, $p = 0,5153$; Re-Exp -mdecoy vs Re-Exp -decoy: $F_{1,6} = 13,07$, $p = 0,0136$. La línea punteada denota los grupos de espinas que deben evaluarse en cada eje de ordenadas (vertical).

En resumen, por un lado, la reactivación de una memoria de miedo contextual produce una disminución significativa en la densidad de las espinas apicales de tipo *mushroom*. Por otro, el tratamiento con el inhibidor de NF κ B, que genera un impedimento en el proceso de reconsolidación de la memoria, dio lugar a un efecto similar, disminuyendo la densidad de las espinas apicales de tipo *mushroom* en la subárea CA1 dorsal, además de producir un decremento en el diámetro de la cabeza de las espinas *mushroom* y el largo total de las espinas *stubby*.

Capítulo 6. Discusión general

6.1 Rol de ADF/Cofilina y LIMK hipocampal en labilización y reconsolidación de la memoria

Considerando que la plasticidad estructural de las espinas dendríticas es esencial para la formación y mantenimiento de una memoria de largo plazo, que tales cambios dependen fuertemente del citoesqueleto de actina y de su regulación, y que los procesos de labilización y reconsolidación de la memoria implican cambios en las conexiones sinápticas que subyacen a la traza mnésica, nos propusimos evaluar el rol de los factores ADF/Cofilina y LIMK en estos procesos. Los resultados expuestos en la [sección 3.1](#) y el [Capítulo 4](#) de esta Tesis muestran que los factores ADF/Cofilina y LIMK poseen un rol que subyace a los procesos de labilización y reconsolidación de la memoria de miedo en el ratón *Mus musculus*.

Por un lado, 30 minutos después de la reactivación de la memoria contextual, a partir de un recordatorio que desencadena los procesos de labilización y reconsolidación de la memoria, se produce la inhibición de la actividad despolimerizante y de corte de la Cfl1 sobre el citoesqueleto de actina, favoreciendo su estabilización (**FIGURA 9**). Además, observamos que, en el mismo punto temporal luego de la reactivación de la memoria, se produce una disminución significativa en la cantidad de ARNm de Cfl1 en la capa del neuropilo de la subárea CA1 hipocampal y un aumento significativo de ARNm de Actb en la capa de los somas neuronales en comparación con las cantidades observadas en secciones de animales control no re-expuestos al contexto de entrenamiento (**FIGURA 11**). Por otro lado, la inhibición de la actividad de LIMK en el hipocampo dorsal inmediatamente después de la reactivación de la memoria contextual de miedo produce un impedimento en la reconsolidación de esta traza mnésica, en línea con trabajos similares realizados en el modelo de rata (**FIGURA 14**) [272].

Considerando que, al inhibir LIMK en neuronas en cultivo, la disponibilidad del ARNm de Cfl1 para su traducción aumenta tanto en los somas como en las dendritas (**FIGURA 22**), podemos hipotetizar que la disminución en su disponibilidad que sucede *in vivo* a partir de la reactivación de la memoria está siendo regulada por la actividad de LIMK. Es decir, nuestra hipótesis plantea que, a partir de los procesos de labilización y

reconsolidación de la memoria, la actividad de LIMK aumenta, generando, por un lado, la inhibición de la actividad de la proteína Cfl1 y, por otro lado, la disminución en la disponibilidad de su ARNm para ser traducido. Ambos efectos estarían involucrados en la estabilización del citoesqueleto de actina, que es necesaria para la re-estabilización de la traza mnésica.

Futuros estudios ayudarían a establecer si esta hipótesis es correcta, evaluando, por ejemplo, el nivel de activación de LIMK, es decir, sus niveles de fosforilación a partir de la reactivación de la memoria. De manera complementaria, resultaría interesante determinar la disponibilidad para la traducción del ARNm de Cfl1 a partir de la inhibición de la actividad de LIMK inmediatamente después de la reactivación de la memoria.

Por otro lado, los niveles de la proteína Cfl1 total se mantienen constantes en los sinaptoneurosomas de neuronas del hipocampo dorsal 30 minutos después de la reactivación de la memoria, en comparación a animales control no re-expuestos (FIGURA 11), aunque sería esperable que la disminución en la disponibilidad del ARNm de Cfl1 se traduzca en una menor cantidad de moléculas del factor. Es posible que esa disminución resulte evidente en un punto temporal más lejano, considerando que, en una primera instancia se produce la disminución de su actividad y de su traducción, y luego esto se ve reflejado en la cantidad de proteína total. Sin embargo, eso no es evidente, al menos, 15 minutos después. Por lo tanto, resultaría interesante evaluar la cantidad de proteína total de Cfl1 en la CA1 hipocampal en sucesivos puntos temporales a partir de la reactivación de la memoria, con una técnica que permita una evaluación más detallada de su perfil. Por ejemplo, técnicas inmunohistológicas permitirían un estudio con mayor resolución espacial, pudiendo concentrarse en diferentes compartimentos neuronales dentro de la subárea CA1 del hipocampo, junto con un umbral de detección menor a cambios que puedan producirse a partir de los procesos mnésicos involucrados.

6.2 ADF/Cofilina y LIMK

6.2.1 Diferenciación entre ADF y Cfl1

Como ya he mencionado, los miembros de la familia ADF/Cofilina son pequeñas proteínas codificadas por diferentes genes que comparten gran parte de su secuencia aminoacídica [247]. La mayoría de los mamíferos expresan las tres isoformas, aunque en

tejido cerebral únicamente se encuentran ADF y Cfl1, siendo ésta última de 5 a 10 veces más abundante [248, 249]. El rol que cumple cada una de estas proteínas en procesos neuronales y mnésicos no está debidamente delimitado en la bibliografía, ya que la mayoría de los trabajos que estudian la actividad de esta familia de proteínas no discriminan entre estas isoformas. Esto se debe, principalmente, a la idea generalizada de que sus funciones se superponen, de la que se desprende que sería correcto considerarlas como equivalentes. Justamente, si los trabajos que evalúan las funciones de esta familia de proteínas pudiesen diferenciar sus roles, esta idea generalizada dentro del campo de estudio sería debidamente contrastada con una mayor cantidad de evidencias en diferentes especies animales. Cabe destacar que, en la gran mayoría de los casos, no se cuentan con anticuerpos específicos que discriminen las isoformas de manera individual, o se ha utilizado el conjunto de proteínas de esta familia expresado en una especie para “rescatar” el fenotipo de animales *knock-out* de otra especie, por ejemplo, sin considerar las diferencias en su expresión [250].

En nuestro trabajo, la caracterización de los niveles de activación de la proteína Cfl1 y de su ARNm disponible para traducción fue realizada específicamente para esta isoforma, ya que los reactivos utilizados permiten diferenciarla de los otros factores de la familia. Sin embargo, es necesario aclarar que la inhibición de LIMK es probable que haya tenido un efecto tanto sobre Cfl1 como sobre ADF, ya que su actividad regulatoria no es específica de un factor dentro de la familia de proteínas [276, 480]. Por lo tanto, el impedimento observado en diferentes procesos de la memoria de miedo al inhibir la actividad regulatoria de LIMK podría estar producido por un aumento en la actividad de Cfl1, de ADF o de ambos factores.

A pesar de la dificultad en la diferenciación de sus roles, un trabajo recientes postula que la actividad de Cfl1, pero no de ADF, está involucrada en la plasticidad morfológica de las espinas dendríticas, mientras que ambos factores participan de la liberación de vesículas por parte de la presinapsis [481]. Si este fuese el caso, a través del inhibidor de LIMK no se hace posible la diferenciación entre la necesidad de la remodelación de las postsinapsis o de la plasticidad en la liberación de vesículas en la presinapsis para la re-estabilización de la traza mnésica. En cambio, un inhibidor específico de Cfl1 sería clave para poder dilucidar si el efecto de inhibición de la actividad

de LIMK sobre Cfl1 es el mecanismo de regulación del citoesqueleto que subyace al proceso de reconsolidación de la memoria.

6.2.2 Rol dual de ADF/Cofilina

A lo largo de las últimas décadas se han acumulado estudios que describen, a medida que el desarrollo de técnicas novedosas lo permiten, cada vez en mayor detalle los mecanismos a través de los cuales la actividad de ADF/Cofilina sobre la dinámica del citoesqueleto de actina [263, 266, 482–485]. De esta manera, a través de estudios *in vitro* sobre su actividad, sabemos que cada molécula de ADF/Cofilina se une a dos subunidades de F-actina a la vez, posicionándose en el espacio entre ambas, y que el cambio estructural que provoca en los filamentos se puede propagar hasta cientos de subunidades desde el punto de unión de la ADF/Cofilina (revisado en [486]). Esta actividad desestabilizante comprende tanto un aumento en la tasa de despolimerización desde el extremo puntiagudo de los filamentos, como su corte en secciones, pero estos dos procesos que parecieran apuntar hacia la misma dirección de desestabilización son, en esencia, diferentes. El corte de un filamento de actina en diferentes partes, a diferencia de un aumento en su tasa de despolimerización, genera nuevos extremos barbados. Estos extremos, en presencia de monómeros de actina y de la correcta regulación por parte de proteínas de unión a la misma, podrían ser el inicio de nuevos filamentos ramificados. Así, la actividad de corte ejercida por ADF/Cofilina, que parecería implicar una desestabilización, podría ser, en realidad, un mecanismo que permitiría la ramificación de los filamentos y, por lo tanto, el crecimiento de la espina dendrítica.

Un estudio que generó un punto de inflexión dentro de este campo de estudio, llevado a cabo por Andrianantoandro y Pollard (2006), describe que, efectivamente, ante la unión de ADF/Cofilina con actina se puede producir un aumento en la tasa de despolimerización o el corte de los filamentos de actina, pero que el *switch* entre ambos mecanismos está determinado por la concentración relativa de ADF/Cofilina que rodea a los filamentos [263]. Junto con evidencias provistas por trabajos posteriores, se deduce que, en bajas concentraciones del factor, la tasa de corte de F-actina es máxima, debido a la tensión estructural que se produce entre las porciones de filamento que están unidas a ADF/Cofilina y las que no lo están [483, 487, 488]. En cambio, a medida que aumenta la

concentración de ADF/Cofilina, su tasa de unión a los filamentos de actina también aumenta y la de corte de estos filamentos, por lo tanto, disminuye. En esta situación específica, parecería que la despolimerización de F-actina desde los extremos puntiagudos es el mecanismo de acción principal de ADF/Cofilina, aunque hay evidencias contradictorias en base a si esta tasa de despolimerización aumenta efectivamente con la unión del factor a la actina (revisado en [486]). Finalmente, en concentraciones muy altas de ADF/Cofilina, ésta favorece la nucleación de monómeros de actina y su polimerización en nuevos filamentos [489, 490]. Por supuesto, este último caso depende de la presencia de monómeros de actina disponibles para la polimerización y de proteínas de unión, por ejemplo, para *capping*, que favorezcan el proceso. Entonces, de acuerdo al microambiente de concentraciones relativas de ADF/Cofilina, G-actina y otras proteínas de unión a la actina en diferentes partes de la espina dendrítica podría estar favoreciéndose un proceso u otro, permitiendo generar una plasticidad más compleja en la estructura postsináptica [486].

Queda aún por dilucidar cuáles de estos procesos están efectivamente sucediendo *in vivo*, no sólo a partir de concentraciones locales de ADF/Cofilina en diferentes regiones de las espinas dendríticas, sino en función de la relación de este factor con la actividad de otras proteínas de unión a la actina [491]. Por otro lado, en la presente Tesis no se evidenciaron cambios significativos en la cantidad de Cfl1 presente en sinaptoneurosomas del hipocampo dorsal a partir de la reactivación de la memoria de miedo, aunque sí observamos una disminución del nivel de activación del factor en el hipocampo dorsal a partir de este proceso (FIGURA 9). Sin embargo, la técnica utilizada no permite diferenciar entre subregiones dentro de las espinas dendríticas, evaluación que sería posible a través de un estudio a nivel histológico de la subregión CA1 del hipocampo dorsal, para determinar el nivel de activación y la concentración relativa de Cfl1 con respecto a la de actina en compartimentos más pequeños dentro de las espinas dendríticas.

6.2.3 Relación entre LIMK y la dinámica del citoesqueleto de tubulina

Los microtúbulos son estructuras proteicas cilíndricas huecas generadas por la polimerización de heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina y forman parte del citoesqueleto

neuronal en el soma, axones, dendritas e, inclusive, algunas espinas dendríticas. Dentro de las funciones celulares que los involucran se encuentra el transporte de cargas a través de la actividad de proteínas motoras, la segregación cromosómica, la morfología y polaridad características de las neuronas, además de la regulación de la actividad en algunos compartimentos neuronales [205]. Aunque los microtúbulos no suelen estar de manera usual o permanente en las espinas dendríticas, son capaces de ingresar a ellas a partir de una activación neuronal dependiente de NMDA-R [492–494], facilitados por la polimerización de filamentos de actina presentes en su cabeza y cuello [495, 496]. Se especula que una función posible de la entrada transiente de los microtúbulos en las espinas dendríticas consistiría en la facilitación del tráfico de AMPA-R hacia la membrana plasmática, lo que sería consistente con una mayor frecuencia de entrada de estos microtúbulos en espinas maduras [497]. De manera complementaria, el proceso de LTD produce una inhibición en la entrada de microtúbulos en espinas dendríticas [498].

Además del efecto canónico de regulación por parte de LIMK sobre la dinámica del citoesqueleto de actina a través de la fosforilación de ADF/Cofilina, estudios recientes sugieren que la quinasa también ejerce un rol de modulación de la función de los microtúbulos. Por un lado, diferentes estudios *in vitro* muestran un efecto desestabilizante de la quinasa sobre el citoesqueleto de tubulina, aunque ninguno de ellos fue realizado en cultivos neuronales [499–501]. Efectos similares se han observado en estudios realizados tanto *ex vivo* en glándulas salivares [502], como *in vivo* en tumores experimentales [503]. Por otro lado, el tratamiento de microtúbulos con inhibidores de la actividad de LIMK (dentro de los cuales el que está incluido el compuesto utilizado en este trabajo de Tesis, BMS-5), produjeron un aumento en la estabilización de los polímeros de tubulina [504–506]. Este efecto desestabilizante de los microtúbulos por parte de la actividad de LIMK parecería ser contradictorio con el ejercido sobre el citoesqueleto de actina, ya que la actividad de esta quinasa favorece la estabilización de los filamentos de actina, al inhibir la actividad de su principal factor despolimerizante, ADF/Cofilina. Por otro lado, aunque los mecanismos de acción de LIMK sobre las funciones de los microtúbulos aún no han sido elucidados, se sabe que, al menos parcialmente, su rol no sería a través del citoesqueleto de actina. A pesar de que los diferentes componentes del citoesqueleto están fuertemente interconectados y actúan de manera concertada, el efecto estabilizante de LIMK sobre los microtúbulos parecería

ser independiente de la dinámica del citoesqueleto de actina [504] y de la actividad de ADF/Cofilina [507].

Considerando que la entrada de los microtúbulos en las espinas dendríticas es transiente y depende fuertemente en el estado de maduración de las espinas, es decir, no sucede en todas ellas a partir de la activación neuronal, la probabilidad de que la plasticidad postsináptica dependiente de la actividad se vea afectada por un efecto sobre los microtúbulos por la inhibición farmacológica de LIMK es baja. Sin embargo, no deja de ser importante la posibilidad de que esta inhibición sobre LIMK tenga un efecto más general que para el que fue pensado y afecte las proyecciones presinápticas que sí dependen fuertemente de los microtúbulos para su plasticidad. Entonces, sería interesante evaluar en futuros estudios la dinámica de regulación de la quinasa sobre el citoesqueleto de tubulina neuronal específicamente, además de contrastar el efecto observado sobre los procesos mnésicos al inhibir LIMK con experimentos que evalúen el efecto de la inhibición directa de Cfl1.

6.3 Rol de la actividad de LIMK en los procesos de consolidación y reconsolidación de la memoria

En relación al rol de LIMK en el proceso de formación de una memoria de miedo contextual, pudimos observar que la inhibición de su actividad genera un impedimento en su consolidación a largo término (**FIGURA 17**), pero no así en la formación de una memoria de corto plazo (**FIGURA 18**). De esta manera, los resultados presentados indican, por un lado, que la actividad de LIMK no es una parte esencial de las vías de señalización y los mecanismos moleculares involucrados en el aprendizaje y la formación de una memoria de corta duración, como sí lo es la actividad de otras proteínas con actividad de quinasas (PKA y MAPK, entre otras) [65–69, 71]. Pero, por otro lado, la actividad regulatoria de LIMK es necesaria para la estabilización a largo término de este tipo de memorias, como también lo es para su re-estabilización [272].

Debido a que, en última instancia, tanto la consolidación como la reconsolidación de la memoria son procesos que conllevan a la estabilización de una traza mnésica y dependen de síntesis proteica, originalmente se ha propuesto a la reconsolidación como, tal como su nombre lo indica, un evento de repetición de la consolidación de la memoria

[77, 136]. En efecto, ambos procesos mnésicos no sólo tienen en común su dependencia en la síntesis de proteínas, sino que existen mecanismos moleculares específicos que están involucrados en ambos tipos de estabilización de la traza (Zif268, MAPK, PKA, CREB, NFκB, entre muchos otros) [93, 135, 424, 508–513], dentro de los cuales se incluye a la actividad de LIMK, a partir de los estudios realizados en esta Tesis.

Sin embargo, el rol de la actividad regulatoria de LIMK no parece ser idéntico en ambos procesos mnésicos. Mientras que la reconsolidación de la memoria fue impedida a través de la inhibición de LIMK inmediatamente después de la re-exposición al contexto de entrenamiento, este mismo tratamiento no tuvo un efecto sobre la estabilización original, al inhibirse la actividad de la quinasa inmediatamente después de la sesión de entrenamiento (FIGURA 16). En cambio, el proceso de estabilización a largo término de una memoria de miedo contextual sí sufrió un impedimento cuando la inhibición de la actividad de LIMK se produjo a partir de un breve tiempo antes del condicionamiento (FIGURA 17). Estos resultados van en línea con numerosos trabajos que sostienen la existencia de mecanismos celulares y moleculares diferenciales que subyacen a los procesos mnésicos en cuestión [92, 417, 510, 514–518].

Por lo tanto, considerando los resultados observados en la presente Tesis respecto a este tema, proponemos que el rol de la actividad de LIMK en el proceso de consolidación de una memoria de miedo contextual tiene un inicio previo al demostrado por la re-estabilización de la traza a través de su reconsolidación, y que esta diferencia se suma a la interpretación vigente de que ambos procesos comparten mecanismos moleculares pero con características distintivas [82, 93].

6.4 LIMK y dinámica del citoesqueleto de actina en la extinción de la memoria

En sus trabajos seminales, Pavlov [4] y Konorski [24] han postulado la existencia de mecanismos que subyacen tanto a la consolidación de una memoria, como a su extinción. Luego, sucesivas evidencias demostraron que, al igual que la consolidación de una memoria, su extinción implica la formación y estabilización a largo término de una nueva traza mnésica que inhibe la expresión de la original en el comportamiento del animal [96–101]. Sin embargo, ambos procesos difieren en muchos mecanismos

moleculares e, inclusive, en gran cantidad de estructuras cerebrales involucradas en su consolidación [91, 98, 113–115].

En el presente trabajo se muestran, por un lado, resultados que evidencian mecanismos que son disímiles para ambos procesos mnésicos y, por otro, resultados que apoyan la idea de una base molecular común que caracteriza a ambos procesos de memoria [98, 113]. La inhibición de la actividad de LIMK durante la extinción de la memoria de miedo contextual no tuvo un efecto evidente sobre la formación o el mantenimiento de la nueva traza mnésica de extinción, en línea con trabajos similares realizados en el modelo de rata (**FIGURA 19**) [272]. Esto se contrapone no sólo a los resultados observados para la formación de una memoria de miedo contextual (**FIGURA 17**), sino también a las evidencias que apuntan a un rol de LIMK dentro de la re-estabilización de la memoria (**FIGURA 14**). Es importante considerar que los protocolos experimentales utilizados para desencadenar la labilización y reconsolidación de una memoria o su extinción difieren únicamente en la duración de la sesión de re-exposición al contexto en este paradigma. Diversos trabajos han planteado diferentes hipótesis sobre la identidad del mecanismo que determina el “destino” de la memoria original a partir del recordatorio del evento de condicionamiento, ya sea hacia su reconsolidación o hacia su extinción [88, 91, 92, 110–112]. Sin embargo, ambos procesos parecen ser mutuamente excluyentes y resulta imperativo asegurarse si el protocolo utilizado desencadena, efectivamente, el proceso mnésico de interés. En el caso de experimentos que utilizan como herramienta la modulación farmacológica para evaluar un posible efecto de interrupción del proceso de extinción de una memoria, esta condición se vuelve aún más importante, ya que la respuesta comportamental del animal no es muestra inequívoca de la ocurrencia de un solo proceso. Es decir, si la inhibición de LIMK durante una sesión prolongada de re-exposición al contexto resultara en una disminución en los niveles de *freezing* con respecto al grupo control (cuya quinasa no fue inhibida) en la sesión de evaluación, una hipótesis posible que explicaría estos resultados es la falta de efecto de la inhibición de la actividad en la quinasa sobre el proceso de extinción. Sin embargo, también es posible que la sesión de re-exposición no haya desencadenado la extinción de la memoria, sino que haya producido la labilización y reconsolidación de la misma, en su lugar. Si fuese ese el caso, la inhibición de LIMK, en base a los experimentos descritos en la [sección 3.1.3](#), generaría un impedimento en la re-estabilización de la traza mnésica,

efecto que se traduciría en el comportamiento como una disminución en los niveles de *freezing* en comparación al grupo control, en los que la actividad de LIMK no fue alterada. Entonces, debido a que, en base a ambas respuestas comportamentales, las dos hipótesis son indistinguibles, es preciso contar con los debidos controles que permitan la identificación del efecto prevalente en ese caso.

En los estudios presentados en la [sección 3.2.1](#), se puede observar que los animales en los que se aplicó el tratamiento de inhibición de la actividad de LIMK mientras fueron re-expuestos al contexto de entrenamiento tuvieron niveles inferiores de *freezing* durante la sesión de evaluación, con respecto a los animales que no pasaron por la sesión de re-exposición. En cambio, los animales que fueron re-expuestos, pero la actividad de LIMK en su hipocampo dorsal no se vio inhibida, presentaron un comportamiento comparable a los del primer grupo (FIGURA 19). Estos resultados sugieren que la disminución en la respuesta condicionada de miedo no se debe a un impedimento en el proceso de reconsolidación de la memoria contextual, sino a la formación de una memoria de extinción que inhibe la expresión de la original en el comportamiento del animal. Por otro lado, el protocolo utilizado que comprende una sesión prolongada de re-exposición al contexto de entrenamiento para desencadenar la extinción de la memoria original ha sido utilizado con anterioridad, probando su eficacia para este objetivo [91, 329, 457].

En cambio, cuando la dinámica del citoesqueleto de actina fue alterada de manera directa favoreciendo su desestabilización, la formación de una memoria de extinción se vio impedida (FIGURA 20). Estos resultados están en línea con trabajos anteriores en los que se alteró de igual manera el citoesqueleto de actina en el hipocampo dorsal de ratones, aunque el protocolo de extinción implicó numerosas sesiones cortas, a diferencia de una única sesión prolongada como la utilizada en esta Tesis [271]. Cabe destacar que la inhibición de la actividad de LIMK generaría un efecto equivalente en la dinámica del citoesqueleto de actina, ya que favorecería indirectamente la activación de ADF/Cofilina y, por lo tanto, la desestabilización de los filamentos. Entonces, estos resultados sugieren que la dinámica del citoesqueleto de actina en el hipocampo dorsal cumple un rol esencial en la extinción de una memoria de miedo contextual, pero no así su regulación por parte de la actividad de LIMK. Esto no sería inverosímil, considerando que la dinámica de polimerización y despolimerización de la actina es un proceso regulado por numerosas

proteínas de unión a la actina, que se ha demostrado que varían su estado de activación y/o su cantidad total en regiones específicas de la espina en función de la plasticidad sináptica [207]. Muchos de estos factores podrían estar involucrados en la formación de la memoria de extinción, aunque el rol de las fosfatasas en este proceso parece ser preponderante. La inhibición de la actividad de PKA en neuronas del cerebro anterior parecería favorecer la extinción de una memoria de miedo contextual, a través de la activación de calcineurina (CaN) y la proteína fosfatasa 1 (PP1, por su nombre en inglés *protein phosphatase 1*) [110, 457, 519–523]. Por lo tanto, sería de interés evaluar el rol de SSH en el proceso de extinción de una memoria de miedo, pues es la proteína que ejerce la regulación opuesta a LIMK sobre ADF/Cofilina, ya que la desfosforila y favorece su activación [299]. No sólo hay evidencias que respaldan que la actividad regulatoria de SSH sobre ADF/Cofilina está mediada por la activación de CaN [524–526], sino que, como ya he mencionado, el aumento de la actividad de ADF/Cofilina en la corteza infralímbica facilitó la extinción de una memoria aversiva en el modelo de rata [273].

6.5 Efecto de la estabilización del citoesqueleto de actina sobre la extinción de la memoria

Basándonos en el experimento que muestra que la desestabilización del citoesqueleto de actina produce un impedimento en la extinción de la memoria de miedo contextual (**FIGURA 20**), evaluamos la posibilidad de que el tratamiento complementario produzca un efecto opuesto sobre la memoria de extinción. Pudimos observar que, al estabilizar el citoesqueleto de actina luego de una sesión de re-exposición al contexto acotada en el tiempo (es decir, un protocolo que desencadena los procesos de labilización y reconsolidación, pero no el de extinción), los animales presentaron una disminución transiente en el comportamiento de miedo (**FIGURA 21**). Este cambio en el comportamiento podría deberse a que la estabilización del citoesqueleto facilite la formación de una nueva memoria de extinción. Según esta hipótesis, un aumento en la polimerización de monómeros de actina y la estabilización de los filamentos existentes favorecería que la plasticidad inherente a la formación de una nueva traza mnésica se produzca y ésta, a su vez, inhiba la expresión de la memoria original. Con el objetivo de confirmar que,

efectivamente, se trata de una facilitación de la formación de una memoria de extinción, evaluamos la presencia de recuperación espontánea de la memoria original, una característica que permite diferenciar este proceso de un mecanismo de disrupción sobre el de reconsolidación. A pesar de que los animales cuyo citoesqueleto de actina fue estabilizado después de la reactivación de la memoria presentaron un aumento en la respuesta de miedo que sería indicativa de una recuperación espontánea 14 días después del condicionamiento, observamos mucha dispersión en las respuestas comportamentales correspondientes a este grupo de animales.

Por otro lado, una hipótesis alternativa plantea la posibilidad de que la disminución en la expresión de la respuesta de miedo se deba a un impedimento transiente en la reconsolidación de la memoria. A pesar de que el concepto de la reconsolidación de la memoria que permanece vigente actualmente sostiene que, si a partir de su reactivación la traza vuelve a un estado lábil, es necesario de un proceso de re-estabilización que depende de síntesis proteica para que se mantenga a lo largo del tiempo, se han encontrado evidencias que desafían este postulado. Estudios llevados a cabo por Lattal y colaboradores muestran evidencias de que la administración del inhibidor de síntesis proteica anisomicina después de la reactivación de la memoria resulta en un impedimento en la expresión de la misma que es transiente, ya que duraría menos de 14 días, efecto que no es evidente cuando el tratamiento se aplica luego de la adquisición, ya que éste resulta en un impedimento del proceso de consolidación más duradero [396, 527]. Estos trabajos sugieren que la memoria original no es afectada por la inhibición de la síntesis proteica inmediatamente después de la reactivación de la traza mnésica, sino que el efecto observado daría cuenta de una inhibición transiente en la evocación de esa traza (revisado en [528]).

Una forma posible de dilucidar si la estabilización del citoesqueleto luego de la reactivación de la memoria genera efectivamente su extinción implica el análisis de la actividad de factores moleculares característicos de este proceso mnésico. El nivel de actividad de CaN y de NFκB, además de la traslocación al núcleo del factor nuclear de células T activadas (NFAT, por su nombre en inglés *nuclear factor of activated T-cells*) podrían ser marcadores esenciales en un futuro análisis más pormenorizado de los procesos propuestos [91, 110, 529, 530].

6.6 Plasticidad en el perfil de ARNm de Actb a partir de la activación neuronal e inhibición de la actividad de LIMK

Además de la regulación ejercida sobre su nivel de activación por modificaciones postraduccionales, la actividad de una proteína puede modularse a través del transporte de ARNm a compartimentos neuronales específicos [44, 357]. Esta localización diferencial de moléculas de ARNm permite, no sólo generar muchas moléculas de proteína en el compartimento blanco de una manera más eficiente en términos energéticos, sino que, además, la neurona es capaz de responder de manera rápida y local a estímulos específicos [359].

La actina puede presentar tres isoformas posibles (α , β y γ), que difieren principalmente en su secuencia del extremo amino-terminal [531]. Sin embargo, hay secuencias no traducidas del extremo 3' de sus ARNm que son específicas de cada isoforma y que, a la vez, determinan su localización subcelular (secuencia *zip code*) [532, 533]. Así, podemos observar que, de las dos isoformas β y γ que se expresan en neuronas [237], los ARNm de la primera se ubican principalmente en zonas ricas en actina cercanas a la membrana, como espinas dendríticas de neuronas maduras y conos de crecimiento de neuronas en desarrollo, mientras que los pertenecientes a la segunda isoforma se localizan principalmente en la zona perinuclear [534]. Un estudio reciente ha relacionado la activación sináptica en espinas dendríticas con un aumento en la traslocación de ARNm de Actb en cultivo disociado de neuronal hipocampales. A partir de la estimulación específica de espinas dendríticas, Yoon y colaboradores pudieron observar un aumento en la cantidad de ARNm de Actb en estos compartimentos neuronales que se mantuvo hasta 10 minutos luego de la activación. Este aumento lo adjudicaron a un traslado de ARNm desde otras espinas dendríticas, descartando la posibilidad de que un aumento en la transcripción del gen sea el responsable del efecto. A su vez, estas moléculas de ARNm dieron lugar a nuevas proteínas de actina que se circunscribieron a la espina y se localizaron, principalmente, en la punta de la misma. Además, los autores notaron que, cuando las moléculas de ARNm de Actb estaban estáticas, estaban posicionadas en la base de las espinas dendríticas, facilitando, así, un traslado más rápido a espinas distales a partir de su estimulación [535].

Los resultados presentes en esta Tesis apuntan en un sentido opuesto, ya que, a partir de la activación neuronal mediante LTPq, observamos una disminución en la cantidad de ARNm de Actb disponible para ser traducido, tanto en dendritas como en somas de neuronas en cultivo, presentando en este último compartimento diferencias significativas con respecto al control no estimulado (**FIGURA 23**). Esta discrepancia entre ambos resultados puede deberse a las diferencias existentes en los protocolos de estimulación y la técnica de visualización utilizada. Yoon y colaboradores se concentraron en la cinética temporal del ARNm individuales en espinas dendríticas específicas, generando su estimulación por la liberación de glutamato. Esta técnica apunta a la activación puntual de una espina determinada, pudiendo evitar efectos colaterales en las adyacentes. Nuestro trabajo, por el contrario, evaluó el efecto de una estimulación neuronal general en toda la placa de cultivo celular sobre la cantidad de ARNm disponible para ser traducido inmediatamente después en dos compartimentos neuronales (somas y dendritas). Por lo tanto, las diferencias en términos de escala temporal y espacial son notables, lo que genera una falta en puntos de comparación entre ambos. Cabe destacar, sin embargo, que las evidencias observadas en el trabajo citado están en línea con otros trabajos previos, que utilizan variedad de técnicas moleculares para evaluar la traslocación de moléculas de ARNm de Actb dentro de compartimentos neuronales [365, 536–538]. Por lo tanto, resultaría interesante continuar nuestros estudios para evaluar el perfil de ARNm de Actb disponible para ser traducido y ahondar en su distribución y traslocación en función de la activación neuronal de una manera más específica.

6.7 Relación entre LTP y procesos mnésicos

Como ya he mencionado en la [sección 1.3](#), la plasticidad sináptica en términos del aumento a largo término de la eficacia en las conexiones, puede ser lograda a través de LTP [28, 34–36]. Este tipo de plasticidad, que es considerada el sustrato celular principal del aprendizaje y la memoria [45, 425, 539], produce cambios estructurales en la densidad y morfología de espinas dendríticas a través de la actividad de numerosas vías de señalización y proteínas de unión a la actina [199, 207].

A partir de la inducción del LTP, moléculas activas de Cfl1 ingresan a la espina dendrítica produciendo una primera fase de reorganización general del citoesqueleto de

actina [288, 426, 427]. Luego, a medida que el volumen de la espina va en aumento, las moléculas de Cfl1 presentes en la misma disminuyen su nivel de activación a través de la regulación por parte de LIMK, dando lugar a una fase de estabilización de la potenciación, en la que los filamentos de actina están notablemente favorecidos en su estabilidad [288, 305, 426, 428, 429]. Los resultados presentados en esta Tesis están en línea con esta dinámica, ya que, por un lado, los experimentos realizados *in vitro* muestran un aumento en la cantidad de ARNm de Cfl1 disponible para ser traducido inmediatamente después de la activación neuronal (FIGURA 22). Por otro lado, observamos en los experimentos realizados *in vivo* que, 30 minutos después de la reactivación de la memoria contextual de miedo se produce una inhibición de la actividad de Cfl1 en el hipocampo dorsal, junto con una disminución en la cantidad de su ARNm disponible para ser traducido en el neuropilo de la CA1 (FIGURA 11). Sería interesante explorar con mayor detalle la dinámica de activación del factor Cfl1 y la disponibilidad de su ARNm para ser traducido en diferentes condiciones, tanto *in vivo* como *in vitro*, en distintos puntos temporales a partir de la reactivación de la memoria o la activación neuronal, respectivamente.

6.8 Plasticidad en la densidad y morfología de espinas dendríticas en el proceso de reconsolidación de la memoria

A partir de numerosos estudios previos, actualmente se cree que el proceso de aprendizaje puede generar tanto cambios morfológicos en espinas existentes, como la formación de nuevas espinas, lo que permite modificar las conexiones sinápticas que subyacen a la codificación de la información. Gran cantidad de trabajos relacionan variaciones en la densidad de las espinas dendríticas con la retención de una memoria a largo término, pero pocos estudian parámetros morfométricos de estas estructuras neuronales para relacionarlos con su plasticidad funcional, y aún no se han reportado trabajos relacionan estos parámetros con la formación y mantenimiento de memorias asociativas [337, 540–542]. La división en categorías de las espinas en base a su morfología, aunque relativamente arbitraria como muchas clasificaciones de fenómenos naturales que se presentan dentro de un continuo de fenotipos, permite relacionar diferentes parámetros con su eficacia en la transmisión sináptica, además de su mantenimiento. Las espinas tipo *mushroom*, también llamadas maduras, son las que

mantienen más estable su estructura, pudiendo variar principalmente en su densidad. Su actividad está dominada por AMPA-R y el nivel de expresión de estos receptores en cada espina es relativamente proporcional al volumen de su cabeza. En cambio, espinas más inmaduras, como las de tipo *thin* o *stubby*, están caracterizadas por una dominancia de NMDA-R y una gran plasticidad en su morfología, ya que pueden crecer, expandirse, estabilizarse o inclusive retraerse. De esta manera, se cree que las espinas más inmaduras y plásticas forman parte de la codificación de nuevos aprendizajes, mientras que las espinas más maduras y grandes son incorporadas en redes neuronales más estables que sirven de sustrato para memorias de largo término [437, 543–545].

Resultados preliminares de esta Tesis sugieren que un impedimento en el proceso de reconsolidación de la memoria de miedo contextual se traduce en una disminución en la densidad y el diámetro de la cabeza de las espinas apicales de tipo *mushroom* de neuronas piramidales de la subárea CA1 del hipocampo dorsal, junto con una tendencia hacia disminuir su volumen. Este tipo de espinas presentan un mayor grado de compartimentalización y especialización en las sinapsis en las que están involucradas y, especialmente las apicales, reciben información relevante para este tipo de memorias desde áreas extra-hipocampales, además de comunicarse con la subárea CA3. Esta retracción de espinas maduras, aunque no se ve reflejada en variaciones dentro de la densidad total, está en línea con estudios previos realizados por la Dra. de la Fuente, en los que observa una disminución general en la densidad de espinas apicales ante un impedimento en la re-estabilización de la memoria [329]. Dentro de las espinas basales de neuronas piramidales de la subárea CA1 del hipocampo dorsal, conectadas con la subárea CA3 y con la misma CA1, también encontramos una tendencia a disminuir la densidad de espinas totales a partir del impedimento del proceso de reconsolidación, tendencia que deberá evaluarse con una mayor cantidad de individuos tratados, para así establecer si tal disminución es efectivamente significativa. Estos resultados también están en línea con trabajos previos [329].

Por otro lado, observamos aumento significativo en el grado de compartimentalización de las espinas basales de tipo *thin* del mismo tipo de neuronas, lo que indicaría que, dentro de la variabilidad de espinas inmaduras clasificadas dentro de esta categoría, la tendencia apunta hacia aumentar la compartimentalización,

acercándose en morfología a una espina más madura. Estos resultados pueden sugerir una tendencia que va en sentido opuesto al descrito para las espinas de tipo *mushroom* cuando se impide la reconsolidación de la memoria de miedo contextual, aunque también podría dar cuenta de un estado de mayor plasticidad entre los tipos de espina presentes en las neuronas piramidales, indicando un reemplazo de las mismas.

Debido a que los resultados preliminares presentados en esta Tesis no incluyen todos los grupos experimentales planificados, no contamos con información para poder comprender en detalle el efecto de los tratamientos en la densidad y las distintas variables morfométricas de las espinas dendríticas. Por ejemplo, información sobre los valores que tomaron estas variables en todos los animales cuya memoria no fue reactivada nos permitiría deducir el efecto de la reactivación de la memoria *per se* sobre la morfología de las espinas dendríticas, considerando que en estudios anteriores se observó un aumento en la densidad de espinas basales de la CA1 a partir de la re-exposición al contexto de entrenamiento [329]. Contar con información acerca de los valores que toman las variables morfométricas en esos mismos animales nos permitiría evaluar, a su vez, el efecto de la inhibición de NFκB sobre animales cuya memoria no fue reactivada, permitiendo considerar si este efecto es sinérgico o no con el producido por la reactivación (discutido en la [sección 5.2](#)). Además, resta evaluar el efecto de la inhibición de este factor a partir de la reactivación de la memoria que únicamente implique su evocación, sin desencadenar los procesos de labilización y reconsolidación de la misma. Considerando que, según nuestra hipótesis que sostiene que la plasticidad en las espinas dendríticas subyace a procesos que modifiquen a largo término la memoria original, hipotetizamos que este proceso no debería generar cambios observables 24 horas más tarde. Por último, sería de gran relevancia evaluar el efecto de la inhibición del factor de transcripción en animales *naïve*, debido a su rol esencial reportado en procesos de sinaptogénesis basal, ya que no es improbable un efecto de la inhibición de este factor en la densidad o morfología de espinas dendríticas en términos del recambio basal de las mismas, en contraste con el generado en procesos mnésicos.

Como he mencionado, nuestros resultados sugieren que el efecto de retracción de las espinas y disminución de su cabeza es generado por la inhibición de NFκB en el hipocampo dorsal, pero la evidencia de que éste depende de la reactivación de la memoria contextual es indirecta. Los animales cuya memoria no fue reactivada (grupo

NR-decoy) muestran valores comparables a los animales cuya memoria fue labilizada y luego se re-estabilizó (grupo Re-Exp-mdecoy). Esto sugiere que, a partir de la reactivación de la memoria, se producen cambios en las espinas dendríticas y, presumiblemente, sus conexiones, que necesitan del proceso de re-estabilización de esa traza mnésica para mantener la morfología y densidad constantes. Esta dinámica de retracción de las espinas dendríticas de neuronas piramidales de la CA1 del hipocampo dorsal podría ser el resultado de dos procesos diferentes.

Por un lado, podría deberse a una retracción inicial desencadenada a partir de la reactivación de la memoria y los mecanismos que la vuelven nuevamente lábil. Es posible suponer que, en esta etapa, las conexiones sinápticas pierden fuerza y que, en gran parte, eso puede deberse a una modificación estructural de las espinas dendríticas, además de -y en conjunto con- cambios funcionales en la eficacia sináptica, generando una retracción de las mismas. Entonces, esta dinámica de las espinas necesitaría de una posterior estabilización de la traza para poder volver a protruir y conectarse con la presinapsis de manera que la memoria se mantenga a lo largo del tiempo. Al inhibir este proceso, no sólo observamos un impedimento en el mantenimiento de esta memoria (**FIGURA 25**), sino también una disminución en las conexiones asociadas, reflejadas en una retracción de las espinas y un tamaño menor de su cabeza, donde se localiza la PSD y está determinada gran parte de la eficacia sináptica (**FIGURA 27FIGURA 31**).

Por otro lado, la evidencia de modificaciones sobre la morfología y densidad observada en animales cuya memoria no pudo re-estabilizarse puede ser consecuencia de un cambio a nivel funcional que, luego, generó tal retracción de las espinas dendríticas. Es decir, la pérdida de eficacia sináptica que se adjudica a la etapa de labilización de la memoria podría circunscribirse a cambios funcionales dentro de las espinas y no desencadenar modificaciones morfológicas si esta traza mnésica se vuelve nuevamente estable a través de su reconsolidación. En el marco de esta posible interpretación de los datos, los gastos energéticos asociados a la plasticidad morfológica evidenciada serían consecuencia de un impedimento en la re-estabilización de la traza, por lo que no sucederían en un evento de labilización y reconsolidación de la memoria que no incluya interferencias o bloqueos de este último proceso. Es importante destacar que los resultados observados en términos de comportamiento (**FIGURA 25**) y de plasticidad de espinas (**FIGURA 27FIGURA 31**) serían comparables bajo las dos hipótesis planteadas.

Una forma de comprobar la dinámica morfológica de las espinas dendríticas a partir de los procesos de labilización y reconsolidación de la memoria consiste en evaluar las mismas variables que las consideradas en el presente trabajo, en puntos temporales más cercanos a la re-exposición al contexto de entrenamiento, pudiendo obtener un panorama más amplio. Además, sería útil complementar estos resultados con evidencias sobre la plasticidad funcional presente en estos compartimentos. Podría evaluarse, por ejemplo, la dominancia de AMPA-R y NMDA-R en las espinas, el tamaño de su PSD, entre otros factores que aportan a la eficacia sináptica. Además, haciendo un análisis que incluya la localización de cada espina con respecto al soma, sería posible considerar las diferencias en dinámicas de calcio y plasticidad que han sido reportadas en trabajos que evalúan espinas pertenecientes a dendritas proximales y distales al soma neuronal [543, 546].

6.9 Conclusiones finales

El trabajo presentado en esta Tesis da cuenta del rol de la dinámica del citoesqueleto de actina y sus reguladores ADF/Cofilina y LIMK en diferentes procesos de la memoria contextual de miedo en el ratón *Mus musculus*. Además, al focalizarse en los procesos de labilización y reconsolidación, los resultados permiten conocer en detalle cómo se relaciona la regulación de la dinámica del citoesqueleto en procesos que implican la desestabilización y re-estabilización de la traza mnésica, a la vez que pudimos evaluar la plasticidad morfológica necesaria para este último proceso.

Con respecto a la reconsolidación de la memoria y siempre considerando que, aunque los procesos neuronales involucrados en LTP son considerados el sustrato neurobiológico de la formación y mantenimiento de la memoria a largo plazo, distan mucho de ser comparables en la misma escala espacio-temporal, resulta interesante evaluar la relación entre las dinámicas de los ARNm de Cfl1 y de Actb en ambas condiciones. En el experimento realizado *in vivo*, puede observarse una disminución en la disponibilidad del transcripto de Cfl1 en el neuropilo, mientras que la del ARNm de Actb aumenta en los somas neuronales (FIGURA 11). De forma complementaria, en el experimento realizado *in vitro*, la dinámica entre los transcriptos es opuesta, aumentando la disponibilidad de Cfl1 tanto en dendritas como en somas, mientras disminuye la de

Actb en somas neuronales (FIGURA 22FIGURA 23). Esta observación, junto con los resultados observados para la actividad del factor Cfl1 a partir de la reactivación de la memoria (FIGURA 9) y el efecto de la inhibición de LIMK tanto sobre su reconsolidación (FIGURA 14) como sobre la regulación de ARNm en neuronas hipocampales (FIGURA 22FIGURA 23), nos permiten hipotetizar sobre el rol de estos factores en este proceso mnésico (FIGURA 34). Los resultados avalan la posibilidad de que, a partir de la reactivación de la memoria, el nivel de activación de LIMK aumenta en el hipocampo dorsal y genera, a su vez, una disminución en la actividad de Cfl1 y en la cantidad de su ARNm disponible para la traducción, lo que favorece la estabilización de los filamentos de actina. En paralelo, la reactivación de la memoria produce un aumento en el ARNm de Actb disponible en la CA1 del hipocampo dorsal, lo que se podría traducir en un *pool* mayor de monómeros de actina. Si consideramos que la dinámica de actina no sólo se regula a través de proteínas de unión a la misma, sino también a partir del equilibrio dinámico entre sus componentes (G-actina y F-actina), un aumento en la actina monomérica favorecería el equilibrio hacia una mayor polimerización. De esta manera, 30 minutos después de la reactivación de la memoria, se produciría un aumento en la polimerización y en la estabilidad de los filamentos de actina. Este tipo de plasticidad que, al involucrar íntimamente al citoesqueleto, abarca cambios tanto funcionales como estructurales, sería necesaria para la re-estabilización de la traza mnésica. De esta manera, si estos cambios no sucediesen como consecuencia, por ejemplo, del bloqueo del proceso de reconsolidación de la memoria, la dinámica del citoesqueleto de actina produciría una retracción de las espinas dendríticas (FIGURA 27FIGURA 31) que, junto con cambios funcionales dentro de la misma, llevarían a una menor eficacia sináptica en las conexiones involucradas, dando cuenta de un impedimento en el mantenimiento de esa memoria a largo plazo (FIGURA 25).

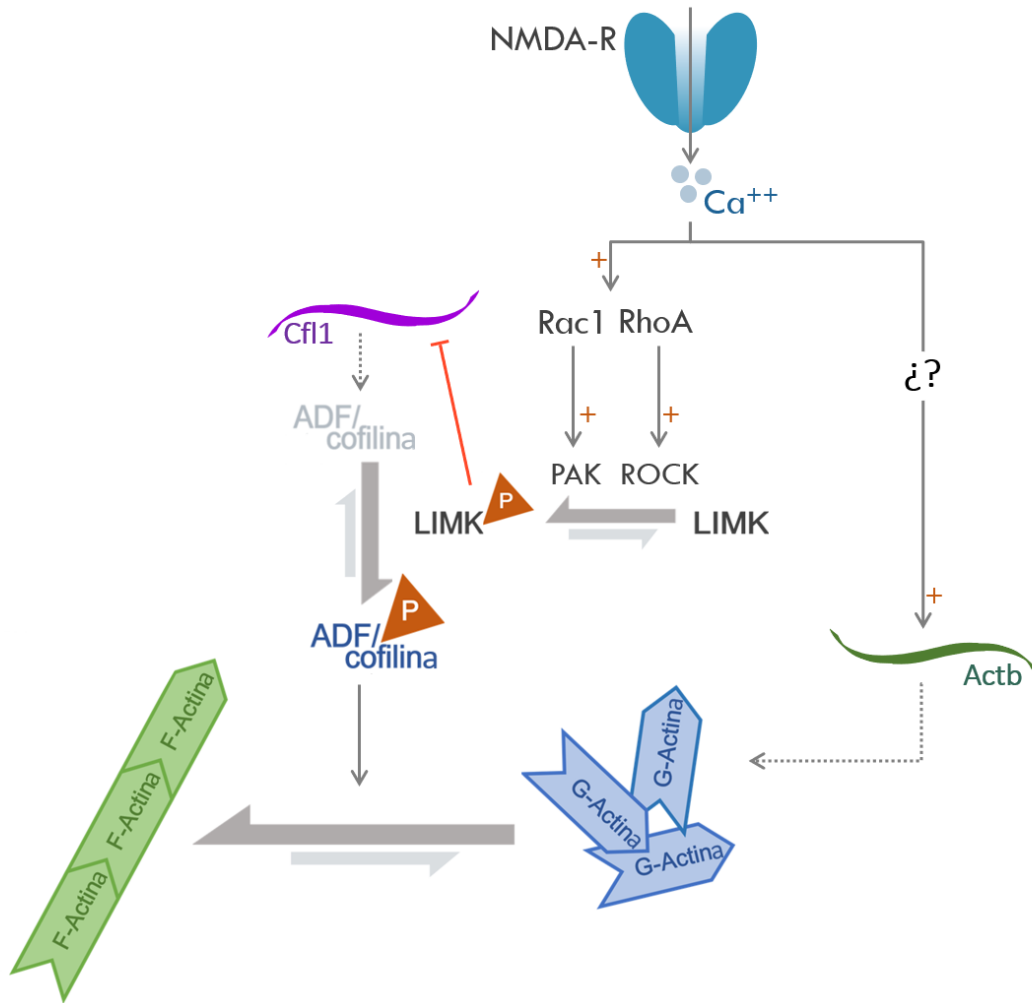


FIGURA 34. Esquema que resume la dinámica propuesta de los mecanismos de re-estabilización de una memoria de miedo contextual 30 minutos después de su reactivación. La regulación positiva de un factor sobre su molécula blanco está representada por una flecha acompañada de un signo positivo y el mecanismo opuesto, por una línea de inhibición en color rojo. El proceso de síntesis proteica aparece representado por una flecha con línea punteada. En color violeta y verde se pueden observar los ARNm de las proteínas Cfl1 y Actb, respectivamente. Diferentes moléculas involucradas en las vías de señalización que se activan ante el influjo de calcio en la espina fueron obviadas con el objetivo de simplificar el esquema, resaltando los factores relevantes para la hipótesis propuesta.

Creemos que los estudios realizados en el marco de la presente Tesis aportan a dilucidar mecanismos claves en la formación y actualización de memorias relevantes para los seres vivos. La importancia del estudio sobre la memoria no sólo radica en entender cómo puede ser mantenida por largos períodos de tiempo, sino en comprender cómo se puede modificar, sumar información o inhibir la expresión de una traza a partir de nueva información que nos provee el ambiente. Para ello, es esencial el estudio pormenorizado de la plasticidad que subyace a procesos que permiten la actualización de memorias relevantes.

Referencias

1. Kandel ER (2001) The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science* 294:1030–1038. <https://doi.org/10.1126/science.1067020>
2. Wasserman EA, Miller RR (1997) What's elementary about associative learning? *Annu Rev Psychol* 48:573–607. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.48.1.573>
3. Thorndike EL (1911) *Animal intelligence; experimental studies*. The Macmillan Company, New York,
4. Pavlov Ivan P (1927) *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex* Translated by GV Anrep. Oxford University Press LONDON
5. Warren HC (1921) *A history of the association psychology*. Charles Scribner's Sons, New York, NY
6. Gallistel CR, Craig AR, Shahan TA (2014) Temporal contingency. *Behav Processes* 101:89–96. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2013.08.012>
7. Papini MR, Bitterman ME (1990) The role of contingency in classical conditioning. *Psychol Rev* 97:396–403. <https://doi.org/10.1037/0033-295x.97.3.396>
8. Goddard MJ (1999) The role of us signal value in contingency, drug conditioning, and learned helplessness. *Psychonomic Bulletin & Review* 6:412–423. <https://doi.org/10.3758/BF03210829>
9. Fanselow MS (2010) From contextual fear to a dynamic view of memory systems. *Trends Cogn Sci (Regul Ed)* 14:7–15. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2009.10.008>
10. Rescorla RA, Wagner AR (1972) A theory of Pavlovian conditioning : Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. *Current research and theory* 64–99
11. Fanselow MS, Wassum KM (2015) The Origins and Organization of Vertebrate Pavlovian Conditioning. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8:a021717. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021717>
12. Rescorla RA (1988) Behavioral Studies of Pavlovian Conditioning. *Annual Review of Neuroscience* 11:329–352. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.11.030188.001553>
13. Nadel L, Willner J (1980) Context and conditioning: A place for space. *Psychobiology* 8:218–228. <https://doi.org/10.3758/BF03332853>
14. Maren S, Phan KL, Liberzon I (2013) The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nature Reviews Neuroscience* 14:417–428. <https://doi.org/10.1038/nrn3492>
15. Chaaya N, Battle AR, Johnson LR (2018) An update on contextual fear memory mechanisms: Transition between Amygdala and Hippocampus. *Neurosci Biobehav Rev* 92:43–54. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.05.013>
16. Sharp BM (2019) Basolateral amygdala, nicotinic cholinergic receptors, and nicotine: Pharmacological effects and addiction in animal models and humans. *Eur J Neurosci* 50:2247–2254. <https://doi.org/10.1111/ejn.13970>
17. Marek R, Sun Y, Sah P (2019) Neural circuits for a top-down control of fear and extinction. *Psychopharmacology (Berl)* 236:313–320. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5033-2>

18. Ressler RL, Maren S (2019) Synaptic encoding of fear memories in the amygdala. *Curr Opin Neurobiol* 54:54–59. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.08.012>
19. Kida S (2019) Reconsolidation/destabilization, extinction and forgetting of fear memory as therapeutic targets for PTSD. *Psychopharmacology (Berl)* 236:49–57. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5086-2>
20. Luchkina NV, Bolshakov VY (2019) Mechanisms of fear learning and extinction: synaptic plasticity-fear memory connection. *Psychopharmacology (Berl)* 236:163–182. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5104-4>
21. Sun Y, Gooch H, Sah P (2020) Fear conditioning and the basolateral amygdala. *F1000Res* 9. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21201.1>
22. Mobbs D, Adolphs R, Fenselow MS, et al (2019) Viewpoints: Approaches to defining and investigating fear. *Nat Neurosci* 22:1205–1216. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0456-6>
23. Ramón y Cajal S (1891) *Pequeñas contribuciones al estudio del sistema nervioso*. Barcelona: Imprenta de la Casa Provincial de Caridad
24. Konorski J (1948) *Conditioned reflexes and neuron organization*. CUP Archive
25. Hebb D (1949) *The Organization of Behavior*. New York. Wiley
26. Milner PM (1957) The cell assembly: Mark II. *Psychol Rev* 64:242–252. <https://doi.org/10.1037/h0042287>
27. Stent GS (1973) A physiological mechanism for Hebb's postulate of learning. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:997–1001. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.4.997>
28. Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31
29. Dudai Y (1989) *The neurobiology of memory: Concepts, findings, trends*. Oxford University Press, New York, NY, US
30. Lamprecht R, LeDoux J (2004) Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience* 5:45–54. <https://doi.org/10.1038/nrn1301>
31. Abraham WC, Jones OD, Glanzman DL (2019) Is plasticity of synapses the mechanism of long-term memory storage? *npj Science of Learning* 4:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41539-019-0048-y>
32. Dudai Y (2002) Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Current Opinion in Neurobiology* 12:211–216. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(02\)00305-7](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00305-7)
33. Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23:649–711. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.649>
34. Bliss TV, Gardner-Medwin AR (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Lond)* 232:357–374. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010274>
35. Glanzman DL (2010) Common mechanisms of synaptic plasticity in vertebrates and invertebrates. *Curr Biol* 20:R31–36. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.10.023>
36. Roberts AC, Glanzman DL (2003) Learning in Aplysia: looking at synaptic plasticity from both sides. *Trends Neurosci* 26:662–670. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.09.014>

37. Herring BE, Nicoll RA (2016) Long-Term Potentiation: From CaMKII to AMPA Receptor Trafficking. *Annual Review of Physiology* 78:351–365. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071753>
38. Hanley JG (2014) Actin-dependent mechanisms in AMPA receptor trafficking. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8:. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00381>
39. Bosch M, Hayashi Y (2012) Structural plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol* 22:383–388. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.09.002>
40. Krug M, Lössner B, Ott T (1984) Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res Bull* 13:39–42. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(84\)90005-4](https://doi.org/10.1016/0361-9230(84)90005-4)
41. Abraham WC, Logan B, Greenwood JM, Dragunow M (2002) Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the hippocampus. *J Neurosci* 22:9626–9634
42. Racine RJ, Milgram NW, Hafner S (1983) Long-term potentiation phenomena in the rat limbic forebrain. *Brain Res* 260:217–231. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90676-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90676-5)
43. Raymond CR, Redman SJ (2006) Spatial segregation of neuronal calcium signals encodes different forms of LTP in rat hippocampus. *J Physiol (Lond)* 570:97–111. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.098947>
44. Biever A, Donlin-Asp PG, Schuman EM (2019) Local translation in neuronal processes. *Current Opinion in Neurobiology* 57:141–148. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.02.008>
45. Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, et al (2006) Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 313:1141–1144. <https://doi.org/10.1126/science.1128657>
46. de la Fuente V, Federman N, Zalcmán G, et al (2015) NF- κ B transcription factor role in consolidation and reconsolidation of persistent memories. *Front Mol Neurosci* 8:50. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00050>
47. Mei F, Nagappan G, Ke Y, et al (2011) BDNF facilitates L-LTP maintenance in the absence of protein synthesis through PKM ζ . *PLoS ONE* 6:e21568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021568>
48. Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, et al (2000) Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20:3993–4001
49. Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S (2012) Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci* 13:169–182. <https://doi.org/10.1038/nrn3192>
50. Shema R, Sacktor TC, Dudai Y (2007) Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science* 317:951–953. <https://doi.org/10.1126/science.1144334>
51. Morin J-P, Guzmán-Ramos K, Bermudez-Rattoni F (2015) New Insights on Retrieval-Induced and Ongoing Memory Consolidation: Lessons from Arc. In: *Neural Plasticity*. <https://www.hindawi.com/journals/np/2015/184083/>. Accessed 11 Sep 2020
52. Alvarez-Castelao B, Schuman EM (2015) The Regulation of Synaptic Protein Turnover. *J Biol Chem* 290:28623–28630. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.657130>

53. Dudai Y (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55:51–86. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>
54. Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience* 6:119–130. <https://doi.org/10.1038/nrn1607>
55. Müller GE, Pilzecker A (1900) Experimentelle beiträge zur lehre vom gedächtniss. JA Barth
56. Romano A, Locatelli F, Freudenthal R, et al (2006) Lessons From a Crab: Molecular Mechanisms in Different Memory Phases of *Chasmagnathus*. *The Biological Bulletin* 210:280–288. <https://doi.org/10.2307/4134564>
57. Little CM, Chapman TW, Hillier NK (2019) Considerations for Insect Learning in Integrated Pest Management. *J Insect Sci* 19:. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iez064>
58. Tully T, Preat T, Boynton SC, Del Vecchio M (1994) Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79:35–47. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90398-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90398-0)
59. Sandi C, Rose SP (1994) Corticosterone enhances long-term retention in one-day-old chicks trained in a weak passive avoidance learning paradigm. *Brain Res* 647:106–112. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91404-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91404-4)
60. Alloway TM, Routtenberg A (1967) “Reminiscence” in the cold flour beetle (*Tenebrio molitor*). *Science* 158:1066–1067. <https://doi.org/10.1126/science.158.3804.1066>
61. McGaugh JL (1966) Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153:1351–1358. <https://doi.org/10.1126/science.153.3742.1351>
62. Gold PE, van Buskirk RB, McGaugh JL (1975) Effects of hormones on time-dependent memory storage processes. *Prog Brain Res* 42:210–211. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)63665-1](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)63665-1)
63. McReynolds JR, McIntyre CK (2012) Emotional modulation of the synapse. *Rev Neurosci* 23:449–461. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2012-0047>
64. Maldonado H (2008) *La memoria animal*, 2010th ed. Eudeba
65. Bernabeu R, Bevilacqua L, Ardenghi P, et al (1997) Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7041–7046
66. Quevedo J, Vianna MRM, Martins MR, et al (2004) Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behavioural Brain Research* 154:339–343. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.03.001>
67. Carew TJ, Sahley CL (1986) Invertebrate learning and memory: from behavior to molecules. *Annu Rev Neurosci* 9:435–487. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.09.030186.002251>
68. Kandel ER, Dudai Y, Mayford MR (2014) The Molecular and Systems Biology of Memory. *Cell* 157:163–186. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.001>
69. Kandel ER (2012) The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Molecular Brain* 5:14. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-5-14>
70. Jarome TJ, Helmstetter FJ (2014) Protein degradation and protein synthesis in long-term memory formation. *Front Mol Neurosci* 7:. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00061>

71. Giese KP, Mizuno K (2013) The roles of protein kinases in learning and memory. *Learning & Memory* 20:540–552. <https://doi.org/10.1101/lm.028449.112>
72. Lewis DJ (1979) Psychobiology of active and inactive memory. *Psychological Bulletin* 86:1054–1083. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.86.5.1054>
73. Mactutus CF, Riccio DC, Ferek JM (1979) Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. *Science* 204:1319–1320. <https://doi.org/10.1126/science.572083>
74. Terry L, Holliday JH (1972) Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace: A replication. *Psychon Sci* 29:137–138. <https://doi.org/10.3758/BF03342570>
75. Przybylski J, Sara SJ (1997) Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* 84:241–246. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(96\)00153-2](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(96)00153-2)
76. Przybylski J, Roulet P, Sara SJ (1999) Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J Neurosci* 19:6623–6628
77. Sara SJ (2000) Retrieval and Reconsolidation: Toward a Neurobiology of Remembering. *Learning & Memory* 7:73–84. <https://doi.org/10.1101/lm.7.2.73>
78. Schneider AM, Sherman W (1968) Amnesia: a function of the temporal relation of footshock to electroconvulsive shock. *Science* 159:219–221. <https://doi.org/10.1126/science.159.3811.219>
79. Kida S (2020) Function and mechanisms of memory destabilization and reconsolidation after retrieval. *Proc Jpn Acad, Ser B, Phys Biol Sci* 96:95–106. <https://doi.org/10.2183/pjab.96.008>
80. Dudai Y (2006) Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Current Opinion in Neurobiology* 16:174–178. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.03.010>
81. Nader K, Schafe GE, LeDoux JE (2000) The labile nature of consolidation theory. *Nature Reviews Neuroscience* 1:216–219. <https://doi.org/10.1038/35044580>
82. Haubrich J, Nader K (2018) Memory Reconsolidation. *Curr Top Behav Neurosci* 37:151–176. https://doi.org/10.1007/7854_2016_463
83. Pedreira ME, Pérez-Cuesta LM, Maldonado H (2004) Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction. *Learn Mem* 11:579–585. <https://doi.org/10.1101/lm.76904>
84. Robinson MJF, Ross EC, Franklin KBJ (2011) The effect of propranolol dose and novelty of the reactivation procedure on the reconsolidation of a morphine place preference. *Behavioural Brain Research* 216:281–284. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.08.009>
85. Forcato C, Argibay PF, Pedreira ME, Maldonado H (2009) Human reconsolidation does not always occur when a memory is retrieved: The relevance of the reminder structure. *Neurobiology of Learning and Memory* 91:50–57. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.011>
86. Osan R, Tort ABL, Amaral OB (2011) A Mismatch-Based Model for Memory Reconsolidation and Extinction in Attractor Networks. *PLOS ONE* 6:e23113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023113>
87. Sinclair AH, Barense MD (2019) Prediction Error and Memory Reactivation: How Incomplete Reminders Drive Reconsolidation. *Trends in Neurosciences* 42:727–739. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.08.007>

88. Fernández RS, Boccia MM, Pedreira ME (2016) The fate of memory: Reconsolidation and the case of Prediction Error. *Neurosci Biobehav Rev* 68:423–441. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.004>
89. Krawczyk MC, Fernández RS, Pedreira ME, Boccia MM (2017) Toward a better understanding on the role of prediction error on memory processes: From bench to clinic. *Neurobiol Learn Mem* 142:13–20. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.011>
90. Nader K, Hardt O (2009) A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience* 10:224–234. <https://doi.org/10.1038/nrn2590>
91. de la Fuente V, Freudenthal R, Romano A (2011) Reconsolidation or Extinction: Transcription Factor Switch in the Determination of Memory Course after Retrieval. *Journal of Neuroscience* 31:5562–5573. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6066-10.2011>
92. Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, et al (2004) Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24:4787–4795. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5491-03.2004>
93. Alberini CM (2005) Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends in Neurosciences* 28:51–56. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.11.001>
94. Delorenzi A, Maza FJ, Suárez LD, et al (2014) Memory beyond expression. *Journal of Physiology-Paris* 108:307–322. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.07.002>
95. Rodríguez-Ortiz CJ, Bermúdez-Rattoni F (2017) Determinants to trigger memory reconsolidation: The role of retrieval and updating information. *Neurobiology of Learning and Memory* 142:4–12. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.005>
96. Rescorla RA (2001) Experimental extinction. In: *Handbook of contemporary learning theories*. Lawrence Erlbaum Associates Publishers, Mahwah, NJ, US, pp 119–154
97. Rescorla RA (2004) Spontaneous recovery. *Learn Mem* 11:501–509. <https://doi.org/10.1101/lm.77504>
98. Furini C, Myskiw J, Izquierdo I (2014) The learning of fear extinction. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 47:670–683. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.10.016>
99. Myskiw J de C, Furini CRG, Benetti F, Izquierdo I (2014) Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty. *PNAS* 111:4572–4577. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400423111>
100. Myskiw J de C, Benetti F, Izquierdo I (2013) Behavioral tagging of extinction learning. *PNAS* 110:1071–1076. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220875110>
101. Bouton ME (2004) Context and behavioral processes in extinction. *Learn Mem* 11:485–494. <https://doi.org/10.1101/lm.78804>
102. Ji J, Maren S (2008) Differential roles for hippocampal areas CA1 and CA3 in the contextual encoding and retrieval of extinguished fear. *Learn Mem* 15:244–251. <https://doi.org/10.1101/lm.794808>
103. Quirk GJ (2002) Memory for Extinction of Conditioned Fear Is Long-lasting and Persists Following Spontaneous Recovery. *Learn Mem* 9:402–407. <https://doi.org/10.1101/lm.49602>
104. Rescorla RA (2002) Savings tests: separating differences in rate of learning from differences in initial levels. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 28:369–377

105. Hardt O, Nader K, Nadel L (2013) Decay happens: the role of active forgetting in memory. *Trends Cogn Sci (Regul Ed)* 17:111–120. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2013.01.001>
106. Berry JA, Davis RL (2014) Active forgetting of olfactory memories in *Drosophila*. *Prog Brain Res* 208:39–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63350-7.00002-4>
107. Frankland PW, Köhler S, Josselyn SA (2013) Hippocampal neurogenesis and forgetting. *Trends Neurosci* 36:497–503. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.05.002>
108. Richards BA, Frankland PW (2017) The Persistence and Transience of Memory. *Neuron* 94:1071–1084. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.037>
109. Bekinschtein P, Weisstaub NV, Gallo F, et al (2018) A retrieval-specific mechanism of adaptive forgetting in the mammalian brain. *Nat Commun* 9:. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07128-7>
110. Merlo E, Milton AL, Goozée ZY, et al (2014) Reconsolidation and extinction are dissociable and mutually exclusive processes: behavioral and molecular evidence. *J Neurosci* 34:2422–2431. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4001-13.2014>
111. Sevenster D, Beckers T, Kindt M (2014) Prediction error demarcates the transition from retrieval, to reconsolidation, to new learning. *Learn Mem* 21:580–584. <https://doi.org/10.1101/lm.035493.114>
112. Merlo E, Romano A (2008) Memory Extinction Entails the Inhibition of the Transcription Factor NF- κ B. *PLOS ONE* 3:e3687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003687>
113. Lattal KM, Radulovic J, Lukowiak K (2006) Extinction: [corrected] does it or doesn't it? The requirement of altered gene activity and new protein synthesis. *Biol Psychiatry* 60:344–351. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.05.038>
114. Myers KM, Davis M (2002) Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* 36:567–584. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)01064-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)01064-4)
115. Lin C-H, Yeh S-H, Lu H-Y, Gean P-W (2003) The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. *J Neurosci* 23:8310–8317
116. Sanders MJ, Wiltgen BJ, Fanselow MS (2003) The place of the hippocampus in fear conditioning. *European Journal of Pharmacology* 463:217–223. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01283-4](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01283-4)
117. Squire LR (1999) *Memory from mind to molecules*. Scientific American Library
118. Eichenbaum H (2011) *The Cognitive Neuroscience of Memory: An Introduction*. Oxford University Press
119. Baldi E, Bucherelli C (2015) Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 53:160–190. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.04.003>
120. Maren S (2001) Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* 24:897–931. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.897>
121. Fanselow MS, LeDoux JE (1999) Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron* 23:229–232. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80775-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80775-8)

122. Rosen JB (2004) The neurobiology of conditioned and unconditioned fear: a neurobehavioral system analysis of the amygdala. *Behav Cogn Neurosci Rev* 3:23–41. <https://doi.org/10.1177/1534582304265945>
123. Rudy JW, Huff NC, Matus-Amat P (2004) Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 28:675–685. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.004>
124. Herry C, Johansen JP (2014) Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. *Nature Neuroscience* 17:1644–1654. <https://doi.org/10.1038/nn.3869>
125. Phelps EA, LeDoux JE (2005) Contributions of the Amygdala to Emotion Processing: From Animal Models to Human Behavior. *Neuron* 48:175–187. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.025>
126. Kim JJ, Fanselow MS (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256:675–677. <https://doi.org/10.1126/science.1585183>
127. Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274–285. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.106.2.274>
128. Selden NRW, Everitt BJ, Jarrard LE, Robbins TW (1991) Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience* 42:335–350. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90379-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90379-3)
129. Fanselow MS (2000) Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav Brain Res* 110:73–81. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(99\)00186-2](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(99)00186-2)
130. Fanselow MS (1986) Associative vs topographical accounts of the immediate shock–freezing deficit in rats: Implications for the response selection rules governing species-specific defensive reactions. *Learning and Motivation* 17:16–39. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(86\)90018-4](https://doi.org/10.1016/0023-9690(86)90018-4)
131. Landeira-Fernandez J, DeCola JP, Kim JJ, Fanselow MS (2006) Immediate shock deficit in fear conditioning: effects of shock manipulations. *Behav Neurosci* 120:873–879. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.120.4.873>
132. Salles A, Krawczyk MDC, Blake M, et al (2017) Requirement of NF-kappa B Activation in Different Mice Brain Areas during Long-Term Memory Consolidation in Two Contextual One-Trial Tasks with Opposing Valences. *Front Mol Neurosci* 10:104. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00104>
133. Curzon P, Rustay NR, Browman KE (2009) Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. In: Buccafusco JJ (ed) *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, 2nd ed. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL)
134. LeDoux JE (2000) Emotion Circuits in the Brain. *Annual Review of Neuroscience* 23:155–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.155>
135. Boccia M, Freudenthal R, Blake M, et al (2007) Activation of hippocampal nuclear factor-kappa B by retrieval is required for memory reconsolidation. *J Neurosci* 27:13436–13445. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4430-07.2007>
136. Debiec J, LeDoux JE, Nader K (2002) Cellular and Systems Reconsolidation in the Hippocampus. *Neuron* 36:527–538. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01001-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01001-2)
137. Anagnostaras SG, Maren S, Fanselow MS (1999) Temporally Graded Retrograde Amnesia of Contextual Fear after Hippocampal Damage in Rats: Within-Subjects Examination. *J Neurosci* 19:1106–1114. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-03-01106.1999>

138. Anagnostaras SG, Gale GD, Fanselow MS (2001) Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 11:8–17. [https://doi.org/10.1002/1098-1063\(2001\)11:1<8::AID-HIPO1015>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2001)11:1<8::AID-HIPO1015>3.0.CO;2-7)
139. Izquierdo I, Furini CRG, Myskiw JC (2016) Fear Memory. *Physiol Rev* 96:695–750. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2015>
140. Rolls ET (2018) The storage and recall of memories in the hippocampo-cortical system. *Cell Tissue Res* 373:577–604. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2744-3>
141. Van Hoesen GW (1982) The parahippocampal gyrus: New observations regarding its cortical connections in the monkey. *Trends in Neurosciences* 5:345–350. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(82\)90201-6](https://doi.org/10.1016/0166-2236(82)90201-6)
142. Van Hoesen GW (1985) Neural systems of the non-human primate forebrain implicated in memory. *Ann N Y Acad Sci* 444:97–112. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1985.tb37582.x>
143. Maren S, Fanselow MS (1995) Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *J Neurosci* 15:7548–7564
144. Cammarota M (2004) Retrieval Does Not Induce Reconsolidation of Inhibitory Avoidance Memory. *Learning & Memory* 11:572–578. <https://doi.org/10.1101/lm.76804>
145. Baldi E, Bucherelli C (2014) Entorhinal cortex contribution to contextual fear conditioning extinction and reconsolidation in rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 110:64–71. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.02.004>
146. Dudai Y (1996) Consolidation: fragility on the road to the engram. *Neuron* 17:367–370. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80168-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80168-3)
147. Medina JH, Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I (2008) Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behavioural Brain Research* 192:61–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.02.006>
148. Almeida-Filho DG, Queiroz CM, Ribeiro S (2018) Memory corticalization triggered by REM sleep: mechanisms of cellular and systems consolidation. *Cell Mol Life Sci* 75:3715–3740. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2886-9>
149. Rosier M, Le Barillier L, Meunier D, et al (2018) Post-learning paradoxical sleep deprivation impairs reorganization of limbic and cortical networks associated with consolidation of remote contextual fear memory in mice. *Sleep* 41:. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsy188>
150. McClelland JL, McNaughton BL, O'Reilly RC (1995) Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychol Rev* 102:419–457. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.102.3.419>
151. Morris RGM, Moser EI, Riedel G, et al (2003) Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 358:773–786. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1264>
152. Squire LR, Alvarez P (1995) Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Current Opinion in Neurobiology* 5:169–177. [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(95\)80023-9](https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80023-9)
153. Frankland PW, O'Brien C, Ohno M, et al (2001) Alpha-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature* 411:309–313. <https://doi.org/10.1038/35077089>

154. Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, et al (2004) The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304:881–883. <https://doi.org/10.1126/science.1094804>
155. Goshen I, Brodsky M, Prakash R, et al (2011) Dynamics of Retrieval Strategies for Remote Memories. *Cell* 147:678–689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.033>
156. McCormick C, Barry DN, Jafarian A, et al (2020) vmPFC Drives Hippocampal Processing during Autobiographical Memory Recall Regardless of Remoteness. *Cereb Cortex*. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhaa172>
157. Moser MB, Moser EI (1998) Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8:608–619. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1998\)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7)
158. Swanson LW, Cowan WM (1975) Hippocampo-hypothalamic connections: origin in subicular cortex, not ammon's horn. *Science* 189:303–304. <https://doi.org/10.1126/science.49928>
159. Moser MB, Moser EI, Forrest E, et al (1995) Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:9697–9701. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9697>
160. Henke PG (1990) Hippocampal pathway to the amygdala and stress ulcer development. *Brain Res Bull* 25:691–695. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(90\)90044-z](https://doi.org/10.1016/0361-9230(90)90044-z)
161. David A, Pierre L (2006) Hippocampal Neuroanatomy. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, et al (eds) *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, pp 37–114
162. Manns JR, Eichenbaum H (2006) Evolution of declarative memory. *Hippocampus* 16:795–808. <https://doi.org/10.1002/hipo.20205>
163. Hunsaker MR, Fieldsted PM, Rosenberg JS, Kesner RP (2008) Dissociating the roles of dorsal and ventral CA1 for the temporal processing of spatial locations, visual objects, and odors. *Behav Neurosci* 122:643–650. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.122.3.643>
164. Hunsaker MR, Kesner RP (2008) Dissociations across the dorsal-ventral axis of CA3 and CA1 for encoding and retrieval of contextual and auditory-cued fear. *Neurobiol Learn Mem* 89:61–69. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.08.016>
165. Gullledge AT, Kampa BM, Stuart GJ (2005) Synaptic integration in dendritic trees. *Journal of Neurobiology* 64:75–90. <https://doi.org/10.1002/neu.20144>
166. Magee JC (2000) Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nat Rev Neurosci* 1:181–190. <https://doi.org/10.1038/35044552>
167. Gullledge AT, Carnevale NT, Stuart GJ (2012) Electrical advantages of dendritic spines. *PLoS ONE* 7:e36007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036007>
168. Svoboda K, Tank DW, Denk W (1996) Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts. *Science* 272:716–719. <https://doi.org/10.1126/science.272.5262.716>
169. Bloodgood BL, Sabatini BL (2005) Neuronal activity regulates diffusion across the neck of dendritic spines. *Science* 310:866–869. <https://doi.org/10.1126/science.1114816>
170. Yuste R (2013) Electrical Compartmentalization in Dendritic Spines. *Annu Rev Neurosci* 36:429–449. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150455>

171. Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, et al (2002) Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420:788–794. <https://doi.org/10.1038/nature01273>
172. Yang G, Pan F, Gan W-B (2009) Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature* 462:920–924. <https://doi.org/10.1038/nature08577>
173. Hayashi-Takagi A, Yagishita S, Nakamura M, et al (2015) Labelling and optical erasure of synaptic memory traces in the motor cortex. *Nature* 525:333–338. <https://doi.org/10.1038/nature15257>
174. Li W, Ma L, Yang G, Gan W-B (2017) REM sleep selectively prunes and maintains new synapses in development and learning. *Nature Neuroscience* 20:427–437. <https://doi.org/10.1038/nn.4479>
175. Zhou Q, Homma KJ, Poo M (2004) Shrinkage of Dendritic Spines Associated with Long-Term Depression of Hippocampal Synapses. *Neuron* 44:749–757. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.011>
176. Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GCR, Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429:761–766. <https://doi.org/10.1038/nature02617>
177. Makino H, Malinow R (2009) AMPA Receptor Incorporation into Synapses during LTP: The Role of Lateral Movement and Exocytosis. *Neuron* 64:381–390. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.035>
178. Bosch M, Castro J, Saneyoshi T, et al (2014) Structural and Molecular Remodeling of Dendritic Spine Substructures during Long-Term Potentiation. *Neuron* 82:444–459. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.021>
179. Meyer D, Bonhoeffer T, Scheuss V (2014) Balance and Stability of Synaptic Structures during Synaptic Plasticity. *Neuron* 82:430–443. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.031>
180. Shah MM, Hammond RS, Hoffman DA (2010) Dendritic ion channel trafficking and plasticity. *Trends in Neurosciences* 33:307–316. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.03.002>
181. Harvey CD, Yasuda R, Zhong H, Svoboda K (2008) The Spread of Ras Activity Triggered by Activation of a Single Dendritic Spine. *Science* 321:136–140. <https://doi.org/10.1126/science.1159675>
182. Lee S-JR, Escobedo-Lozoya Y, Szatmari EM, Yasuda R (2009) Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature* 458:299–304. <https://doi.org/10.1038/nature07842>
183. Murakoshi H, Wang H, Yasuda R (2011) Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature* 472:100–104. <https://doi.org/10.1038/nature09823>
184. Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, et al (2010) Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in Neurosciences* 33:121–129. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.01.001>
185. Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64:313–353. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.160008>
186. Chidambaram SB, Rathipriya AG, Bolla SR, et al (2019) Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 92:161–193. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.01.005>
187. Koch C, Zador A (1993) The function of dendritic spines: devices subserving biochemical rather than electrical compartmentalization. *J Neurosci* 13:413–422. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-02-00413.1993>

188. Tønnesen J, Katona G, Rózsa B, Nägerl UV (2014) Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nat Neurosci* 17:678–685. <https://doi.org/10.1038/nn.3682>
189. Grunditz A, Holbro N, Tian L, et al (2008) Spine neck plasticity controls postsynaptic calcium signals through electrical compartmentalization. *J Neurosci* 28:13457–13466. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2702-08.2008>
190. Matsuo N, Reijmers L, Mayford M (2008) Spine-Type–Specific Recruitment of Newly Synthesized AMPA Receptors with Learning. 319:4
191. Matsuzaki M, Ellis-Davies GCR, Nemoto T, et al (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience* 4:1086–1092. <https://doi.org/10.1038/nn736>
192. Nusser Z, Lujan R, Laube G, et al (1998) Cell Type and Pathway Dependence of Synaptic AMPA Receptor Number and Variability in the Hippocampus. *Neuron* 21:545–559. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80565-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80565-6)
193. El-Boustani S, Ip JPK, Breton-Provencher V, et al (2018) Locally coordinated synaptic plasticity of visual cortex neurons in vivo. *Science* 360:1349–1354. <https://doi.org/10.1126/science.aao0862>
194. Yuste R, Majewska A, Holthoff K (2000) From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3:653–659. <https://doi.org/10.1038/76609>
195. Korkotian E, Holcman D, Segal M (2004) Dynamic regulation of spine–dendrite coupling in cultured hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience* 20:2649–2663. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03691.x>
196. Noguchi J, Matsuzaki M, Ellis-Davies GCR, Kasai H (2005) Spine-Neck Geometry Determines NMDA Receptor-Dependent Ca²⁺ Signaling in Dendrites. *Neuron* 46:609–622. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.03.015>
197. Majewska A, Brown E, Ross J, Yuste R (2000) Mechanisms of calcium decay kinetics in hippocampal spines: role of spine calcium pumps and calcium diffusion through the spine neck in biochemical compartmentalization. *J Neurosci* 20:1722–1734
198. Takumi Y, Ramírez-León V, Laake P, et al (1999) Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nature Neuroscience* 2:618–624. <https://doi.org/10.1038/10172>
199. Borczyk M, Śliwińska MA, Caly A, et al (2019) Neuronal plasticity affects correlation between the size of dendritic spine and its postsynaptic density. *Sci Rep* 9:1693. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38412-7>
200. Arellano JI, Benavides-Piccione R, Defelipe J, Yuste R (2007) Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front Neurosci* 1:131–143. <https://doi.org/10.3389/neuro.01.1.1.010.2007>
201. Schikorski T, Stevens CF (1999) Quantitative fine-structural analysis of olfactory cortical synapses. *PNAS* 96:4107–4112. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4107>
202. Lee KFH, Soares C, Béique J-C (2012) Examining Form and Function of Dendritic Spines. In: *Neural Plasticity*. <https://www.hindawi.com/journals/np/2012/704103/>. Accessed 18 Sep 2020
203. Levenga J, Willemsen R (2012) Chapter 8 - Perturbation of dendritic protrusions in intellectual disability. In: Dierssen M, De La Torre R (eds) *Progress in Brain Research*. Elsevier, pp 153–168

204. Hering H, Sheng M (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci* 2:880–888. <https://doi.org/10.1038/35104061>
205. Bucher M, Fanutza T, Mikhaylova M (2020) Cytoskeletal makeup of the synapse: Shaft versus spine. *Cytoskeleton* 77:55–64. <https://doi.org/10.1002/cm.21583>
206. Bertling E, Hotulainen P (2017) New waves in dendritic spine actin cytoskeleton: From branches and bundles to rings, from actin binding proteins to post-translational modifications. *Molecular and Cellular Neuroscience* 84:77–84. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.05.002>
207. Borovac J, Bosch M, Okamoto K (2018) Regulation of actin dynamics during structural plasticity of dendritic spines: Signaling messengers and actin-binding proteins. *Molecular and Cellular Neuroscience* 91:122–130. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.07.001>
208. Zuo Y, Lin A, Chang P, Gan W-B (2005) Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron* 46:181–189. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.001>
209. De Roo M, Klauser P, Muller D (2008) LTP Promotes a Selective Long-Term Stabilization and Clustering of Dendritic Spines. *PLoS Biol* 6:. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060219>
210. Grutzendler J, Kasthuri N, Gan W-B (2002) Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature* 420:812–816. <https://doi.org/10.1038/nature01276>
211. Moser MB, Trommald M, Andersen P (1994) An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *PNAS* 91:12673–12675. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12673>
212. Abate G, Colazingari S, Accoto A, et al (2018) Dendritic spine density and EphrinB2 levels of hippocampal and anterior cingulate cortex neurons increase sequentially during formation of recent and remote fear memory in the mouse. *Behav Brain Res* 344:120–131. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.02.011>
213. Serita T, Fukushima H, Kida S (2017) Constitutive activation of CREB in mice enhances temporal association learning and increases hippocampal CA1 neuronal spine density and complexity. *Sci Rep* 7:42528. <https://doi.org/10.1038/srep42528>
214. Frank AC, Huang S, Zhou M, et al (2018) Hotspots of dendritic spine turnover facilitate clustered spine addition and learning and memory. *Nat Commun* 9:422. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02751-2>
215. Baumgärtel K, Green A, Hornberger D, et al (2018) PDE4D regulates Spine Plasticity and Memory in the Retrosplenial Cortex. *Sci Rep* 8:3895. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22193-0>
216. Yang Y, Liu D-Q, Huang W, et al (2016) Selective synaptic remodeling of amygdalocortical connections associated with fear memory. *Nat Neurosci* 19:1348–1355. <https://doi.org/10.1038/nn.4370>
217. Young EJ, Aceti M, Griggs EM, et al (2014) Selective, Retrieval-Independent Disruption of Methamphetamine-Associated Memory by Actin Depolymerization. *Biological Psychiatry* 75:96–104. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.07.036>
218. Vetere G, Restivo L, Cole CJ, et al (2011) Spine growth in the anterior cingulate cortex is necessary for the consolidation of contextual fear memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:8456–8460. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016275108>

219. Vetere G, Borreca A, Pignataro A, et al (2019) Coincident Pre- and Post-Synaptic Cortical Remodelling Disengages Episodic Memory from Its Original Context. *Mol Neurobiol* 56:8513–8523. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01652-3>
220. Basu S, Lamprecht R (2018) The Role of Actin Cytoskeleton in Dendritic Spines in the Maintenance of Long-Term Memory. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11:. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00143>
221. Phillips M, Pozzo-Miller L (2015) Dendritic spine dysgenesis in autism related disorders. *Neuroscience Letters* 601:30–40. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.011>
222. Fiala JC, Spacek J, Harris KM (2002) Dendritic Spine Pathology: Cause or Consequence of Neurological Disorders? *Brain Research Reviews* 39:29–54. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(02\)00158-3](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(02)00158-3)
223. Ebrahimi S, Okabe S (2014) Structural dynamics of dendritic spines: Molecular composition, geometry and functional regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838:2391–2398. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.06.002>
224. Kommaddi RP, Das D, Karunakaran S, et al (2018) A β mediates F-actin disassembly in dendritic spines leading to cognitive deficits in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 38:1085–1099. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2127-17.2017>
225. Cohen RS, Chung SK, Pfaff DW (1985) Immunocytochemical localization of actin in dendritic spines of the cerebral cortex using colloidal gold as a probe. *Cell Mol Neurobiol* 5:271–284. <https://doi.org/10.1007/BF00711012>
226. Matus A, Ackermann M, Pehling G, et al (1982) High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7590–7594. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.23.7590>
227. Fifková E, Delay RJ (1982) Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J Cell Biol* 95:345–350. <https://doi.org/10.1083/jcb.95.1.345>
228. Dent EW, Merriam EB, Hu X (2011) The dynamic cytoskeleton: backbone of dendritic spine plasticity. *Current Opinion in Neurobiology* 21:175–181. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.08.013>
229. Matus A (2000) Actin-Based Plasticity in Dendritic Spines. *Science* 290:754–758. <https://doi.org/10.1126/science.290.5492.754>
230. Cingolani LA, Goda Y (2008) Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci* 9:344–356. <https://doi.org/10.1038/nrn2373>
231. Sheng M, Hoogenraad CC (2007) The Postsynaptic Architecture of Excitatory Synapses: A More Quantitative View. *Annu Rev Biochem* 76:823–847. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060805.160029>
232. Fifková E (1985) Actin in the nervous system. *Brain Res* 356:187–215
233. Renner M, Specht CG, Triller A (2008) Molecular dynamics of postsynaptic receptors and scaffold proteins. *Current Opinion in Neurobiology* 18:532–540. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.09.009>
234. Schlager MA, Hoogenraad CC (2009) Basic mechanisms for recognition and transport of synaptic cargos. *Molecular Brain* 2:25. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-2-25>

-
235. Bramham CR (2008) Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Current Opinion in Neurobiology* 18:524–531. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.09.013>
236. Hotulainen P, Hoogenraad CC (2010) Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *The Journal of Cell Biology* 189:619–629. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003008>
237. Dominguez R, Holmes K (2011) Actin structure and function. *Annual review of biophysics* 40:. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155359>
238. Bugyi B, Carlier M-F (2010) Control of actin filament treadmilling in cell motility. *Annu Rev Biophys* 39:449–470. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-051309-103849>
239. Honkura N, Matsuzaki M, Noguchi J, et al (2008) The Subspine Organization of Actin Fibers Regulates the Structure and Plasticity of Dendritic Spines. *Neuron* 57:719–729. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.013>
240. Star EN, Kwiatkowski DJ, Murthy VN (2002) Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci* 5:239–246. <https://doi.org/10.1038/nn811>
241. Georges PC, Hadzimidichalis NM, Sweet ES, Firestein BL (2008) The Yin–Yang of Dendrite Morphology: Unity of Actin and Microtubules. *Mol Neurobiol* 38:270–284. <https://doi.org/10.1007/s12035-008-8046-8>
242. Coles CH, Bradke F (2015) Coordinating Neuronal Actin–Microtubule Dynamics. *Current Biology* 25:R677–R691. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.020>
243. Frost NA, Shroff H, Kong H, et al (2010) Single-Molecule Discrimination of Discrete Perisynaptic and Distributed Sites of Actin Filament Assembly within Dendritic Spines. *Neuron* 67:86–99. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.05.026>
244. Bosch M, Hayashi Y (2012) Structural plasticity of dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology* 22:383–388. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.09.002>
245. Rudy JW (2015) Actin dynamics and the evolution of the memory trace. *Brain Research* 1621:17–28. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.007>
246. Pollard TD (2016) What We Know and Do Not Know About Actin. In: Jockusch BM (ed) *The Actin Cytoskeleton*. Springer International Publishing, Cham, pp 331–347
247. Maciver SK, Hussey PJ (2002) The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biol* 3:reviews3007. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-5-reviews3007>
248. Moriyama K, Matsumoto S, Nishida E, et al (1990) Nucleotide sequence of mouse cofilin cDNA. *Nucleic Acids Res* 18:3053
249. Garvalov BK, Flynn KC, Neukirchen D, et al (2007) Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J Neurosci* 27:13117–13129. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3322-07.2007>
250. Kanellos G, Frame MC (2016) Cellular functions of the ADF/cofilin family at a glance. *J Cell Sci* 129:3211–3218. <https://doi.org/10.1242/jcs.187849>
251. Blanchoin L, Pollard TD (1999) Mechanism of interaction of Acanthamoeba actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments. *J Biol Chem* 274:15538–15546. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.22.15538>
252. Carlier M-F, Laurent V, Santolini J, et al (1997) Actin Depolymerizing Factor (ADF/Cofilin) Enhances the Rate of Filament Turnover: Implication in Actin-based Motility. *J Cell Biol* 136:1307–1322

253. Maciver SK, Weeds AG (1994) Actophorin preferentially binds monomeric ADP-Actin over ATP-bound actin: consequences for cell locomotion. *FEBS Letters* 347:251–256. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00552-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00552-4)
254. Suarez C, Roland J, Boujemaa-Paterski R, et al (2011) Cofilin tunes the nucleotide state of actin filaments and severs at bare and decorated segment boundaries. *Curr Biol* 21:862–868. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.064>
255. McCullough BR, Grintsevich EE, Chen CK, et al (2011) Cofilin-Linked Changes in Actin Filament Flexibility Promote Severing. *Biophys J* 101:151–159. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.05.049>
256. Prochniewicz E, Janson N, Thomas DD, De la Cruz EM (2005) Cofilin increases the torsional flexibility and dynamics of actin filaments. *J Mol Biol* 353:990–1000. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.09.021>
257. Galkin VE, Orlova A, Kudryashov DS, et al (2011) Remodeling of actin filaments by ADF/cofilin proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:20568–20572. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110109108>
258. De La Cruz EM (2005) Cofilin Binding to Muscle and Non-muscle Actin Filaments: Isoform-dependent Cooperative Interactions. *Journal of Molecular Biology* 346:557–564. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.11.065>
259. Hayden SM, Miller PS, Brauweiler A, Bamburg JR (1993) Analysis of the interactions of actin depolymerizing factor with G- and F-actin. *Biochemistry* 32:9994–10004. <https://doi.org/10.1021/bi00089a015>
260. Lappalainen P, Drubin DG (1997) Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature* 388:78–82. <https://doi.org/10.1038/40418>
261. Ydenberg CA, Johnston A, Weinstein J, et al (2015) Combinatorial genetic analysis of a network of actin disassembly-promoting factors. *Cytoskeleton* 72:349–361. <https://doi.org/10.1002/cm.21231>
262. De La Cruz EM (2009) How cofilin severs an actin filament. *Biophys Rev* 1:51–59. <https://doi.org/10.1007/s12551-009-0008-5>
263. Andrianantoandro E, Pollard TD (2006) Mechanism of Actin Filament Turnover by Severing and Nucleation at Different Concentrations of ADF/Cofilin. *Molecular Cell* 24:13–23. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.08.006>
264. Gurniak CB, Perlas E, Witke W (2005) The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration. *Dev Biol* 278:231–241. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.010>
265. Moon AL, Janmey PA, Louie KA, Drubin DG (1993) Cofilin is an essential component of the yeast cortical cytoskeleton. *J Cell Biol* 120:421–435. <https://doi.org/10.1083/jcb.120.2.421>
266. Bamburg JR, Wiggan OP (2002) ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol* 12:598–605
267. Frangiskakis JM, Ewart AK, Morris CA, et al (1996) LIM-kinase1 hemizyosity implicated in impaired visuospatial constructive cognition. *Cell* 86:59–69. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80077-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80077-x)
268. Noguchi J, Hayama T, Watanabe S, et al (2016) State-dependent diffusion of actin-depolymerizing factor/cofilin underlies the enlargement and shrinkage of dendritic spines. *Scientific Reports* 6:32897. <https://doi.org/10.1038/srep32897>

269. Nakahata Y, Yasuda R (2018) Plasticity of Spine Structure: Local Signaling, Translation and Cytoskeletal Reorganization. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 10:. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2018.00029>
270. Jędrzejewska-Szmek J, Blackwell KT (2019) From membrane receptors to protein synthesis and actin cytoskeleton: Mechanisms underlying long lasting forms of synaptic plasticity. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.01.006>
271. Fischer A (2004) Distinct Roles of Hippocampal De Novo Protein Synthesis and Actin Rearrangement in Extinction of Contextual Fear. *Journal of Neuroscience* 24:1962–1966. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5112-03.2004>
272. Lunardi P, Sachser RM, Sierra RO, et al (2018) Effects of Hippocampal LIMK Inhibition on Memory Acquisition, Consolidation, Retrieval, Reconsolidation, and Extinction. *Molecular Neurobiology* 55:958–967. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0361-x>
273. Wang Y, Dong Q, Xu X-F, et al (2013) Phosphorylation of Cofilin Regulates Extinction of Conditioned Aversive Memory via AMPAR Trafficking. *Journal of Neuroscience* 33:6423–6433. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5107-12.2013>
274. Rust MB, Gurniak CB, Renner M, et al (2010) Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *EMBO J* 29:1889–1902. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.72>
275. Sungur AÖ, Stemmler L, Wöhr M, Rust MB (2018) Impaired Object Recognition but Normal Social Behavior and Ultrasonic Communication in Cofilin1 Mutant Mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12:. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00025>
276. Scott RW, Olson MF (2007) LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J Mol Med* 85:555–568. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0165-6>
277. Wang W, Townes-Anderson E (2016) Lim kinase, a bi-functional effector in injury-induced structural plasticity of synapses. *Neural Regen Res* 11:1029–1032. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.187018>
278. Yang N, Higuchi O, Ohashi K, et al (1998) Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* 393:809–812. <https://doi.org/10.1038/31735>
279. Meng Y, Zhang Y, Tregoubov V, et al (2003) Regulation of Spine Morphology and Synaptic Function by LIMK and the Actin Cytoskeleton. *Reviews in the Neurosciences* 14:. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2003.14.3.233>
280. Todorovski Z, Asrar S, Liu J, et al (2015) LIMK1 Regulates Long-Term Memory and Synaptic Plasticity via the Transcriptional Factor CREB. *Molecular and Cellular Biology* 35:1316–1328. <https://doi.org/10.1128/MCB.01263-14>
281. Ikeda M, Hojo Y, Komatsuzaki Y, et al (2015) Hippocampal spine changes across the sleep-wake cycle: corticosterone and kinases. *J Endocrinol* 226:M13-27. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0078>
282. Wang W, Halasz E, Townes-Anderson E (2019) Actin Dynamics, Regulated by RhoA-LIMK-Cofilin Signaling, Mediates Rod Photoreceptor Axonal Retraction After Retinal Injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 60:2274–2285. <https://doi.org/10.1167/iops.18-26077>
283. Dan C, Kelly A, Bernard O, Minden A (2001) Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *J Biol Chem* 276:32115–32121. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100871200>

284. Maekawa M (1999) Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton Through Protein Kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285:895–898. <https://doi.org/10.1126/science.285.5429.895>
285. Toliaf KF, Duman JG, Um K (2011) Control of synapse development and plasticity by Rho GTPase regulatory proteins. *Prog Neurobiol* 94:133–148. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.04.011>
286. Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, et al (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393:805–809. <https://doi.org/10.1038/31729>
287. Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN (1999) Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* 1:253–259. <https://doi.org/10.1038/12963>
288. Chen LY, Rex CS, Casale MS, et al (2007) Changes in Synaptic Morphology Accompany Actin Signaling during LTP. *Journal of Neuroscience* 27:5363–5372. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0164-07.2007>
289. Briz V, Zhu G, Wang Y, et al (2015) Activity-Dependent Rapid Local RhoA Synthesis Is Required for Hippocampal Synaptic Plasticity. *Journal of Neuroscience* 35:2269–2282. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2302-14.2015>
290. Rex CS, Chen LY, Sharma A, et al (2009) Different Rho GTPase-dependent signaling pathways initiate sequential steps in the consolidation of long-term potentiation. *J Cell Biol* 186:85–97. <https://doi.org/10.1083/jcb.200901084>
291. O’Kane EM, Stone TW, Morris BJ (2003) Activation of Rho GTPases by synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurochem* 87:1309–1312. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02102.x>
292. Gharami K, Das S (2014) BDNF local translation in viable synaptosomes: implication in spine maturation. *Neurochem Int* 69:28–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.02.009>
293. Diana G, Valentini G, Travaglione S, et al (2007) Enhancement of learning and memory after activation of cerebral Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:636–641. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610059104>
294. Jiang L, Mao R, Zhou Q, et al (2016) Inhibition of Rac1 Activity in the Hippocampus Impairs the Forgetting of Contextual Fear Memory. *Mol Neurobiol* 53:1247–1253. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9093-6>
295. Gan P, Ding Z-Y, Gan C, et al (2016) Corticosterone regulates fear memory via Rac1 activity in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology* 71:86–93. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.05.011>
296. Martinez LA, Tejada-Simon MV (2018) Pharmacological Rescue of Hippocampal Fear Learning Deficits in Fragile X Syndrome. *Mol Neurobiol* 55:5951–5961. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0819-5>
297. Jiang L, Mao R, Tong J, et al (2016) Inhibition of Rac1 activity in the hippocampus impaired extinction of contextual fear. *Neuropharmacology* 109:216–222. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.06.017>
298. Morgan TE, Lockerbie RO, Minamide LS, et al (1993) Isolation and characterization of a regulated form of actin depolymerizing factor. *J Cell Biol* 122:623–633. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.3.623>
299. Niwa R, Nagata-Ohashi K, Takeichi M, et al (2002) Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* 108:233–246. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00638-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00638-9)

300. Soosairajah J, Maiti S, Wiggan O, et al (2005) Interplay between components of a novel LIM kinase–slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *The EMBO Journal* 24:473–486. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600543>
301. Shaw AE, Bamberg JR (2017) Peptide Regulation of Cofilin Activity in the CNS: A Novel Therapeutic Approach for Treatment of Multiple Neurological Disorders. *Pharmacol Ther* 175:17–27. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.031>
302. Rust MB (2015) ADF/cofilin: a crucial regulator of synapse physiology and behavior. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72:3521–3529. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1941-z>
303. Bamberg JR, Bernstein BW (2016) Actin dynamics and cofilin-actin rods in Alzheimer disease. *Cytoskeleton (Hoboken)* 73:477–497. <https://doi.org/10.1002/cm.21282>
304. Lei W, Omotade O, Myers K, Zheng J (2016) Actin cytoskeleton in dendritic spine development and plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 39:86–92. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.04.010>
305. Fedulov V, Rex CS, Simmons DA, et al (2007) Evidence that long-term potentiation occurs within individual hippocampal synapses during learning. *J Neurosci* 27:8031–8039. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2003-07.2007>
306. Zimmermann A-M, Jene T, Wolf M, et al (2015) Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder-like Phenotype in a Mouse Model with Impaired Actin Dynamics. *Biol Psychiatry* 78:95–106. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.03.011>
307. Barone E, Mosser S, Fraering PC (2014) Inactivation of brain Cofilin-1 by age, Alzheimer’s disease and γ -secretase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1842:2500–2509. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.004>
308. Kang DE, Woo JA (2019) Cofilin, a Master Node Regulating Cytoskeletal Pathogenesis in Alzheimer’s Disease. *J Alzheimers Dis* 72:S131–S144. <https://doi.org/10.3233/JAD-190585>
309. Han F, Zhuang T-T, Chen J-J, et al (2017) Novel derivative of Paeonol, Paeonolsilatic sodium, alleviates behavioral damage and hippocampal dendritic injury in Alzheimer’s disease concurrent with cofilin1/phosphorylated-cofilin1 and RAC1/CDC42 alterations in rats. *PLoS ONE* 12:e0185102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185102>
310. Meng Y, Zhang Y, Tregoubov V, et al (2002) Abnormal Spine Morphology and Enhanced LTP in LIMK-1 Knockout Mice. *Neuron* 35:121–133. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00758-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00758-4)
311. Crick F (1984) Neurobiology: Memory and molecular turnover. *Nature* 312:101–101. <https://doi.org/10.1038/312101a0>
312. Paxinos G, Franklin KBJ, Franklin KBJ (2001) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic, San Diego
313. Dutertre S, Becker C-M, Betz H (2012) Inhibitory Glycine Receptors: An Update. *J Biol Chem* 287:40216–40223. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.408229>
314. Yu R, Hurdiss E, Greiner T, et al (2014) Agonist and Antagonist Binding in Human Glycine Receptors. *Biochemistry* 53:6041–6051. <https://doi.org/10.1021/bi500815f>
315. Betz H, Laube B (2006) Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem* 97:1600–1610. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03908.x>

316. Johnston GAR (2013) Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists. *Br J Pharmacol* 169:328–336. <https://doi.org/10.1111/bph.12127>
317. Olsen RW (2018) GABAA receptor: Positive and negative allosteric modulators. *Neuropharmacology* 136:10–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.01.036>
318. George K, Sadiq NM (2020) GABA Inhibitors. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)
319. Fozzard HA, Lipkind GM (2010) The tetrodotoxin binding site is within the outer vestibule of the sodium channel. *Mar Drugs* 8:219–234. <https://doi.org/10.3390/md8020219>
320. Narahashi T (2008) Tetrodotoxin: a brief history. *Proc Jpn Acad, Ser B, Phys Biol Sci* 84:147–154. <https://doi.org/10.2183/pjab.84.147>
321. Geffeney SL, Ruben C (2006) The Structural Basis and Functional Consequences of Interactions Between Tetrodotoxin and Voltage-Gated Sodium Channels. *Marine Drugs* 4:143–156. <https://doi.org/10.3390/md403143>
322. Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, et al (2009) Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol Dis* 34:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.006>
323. Zhang C, Deng Y, Dai H, et al (2017) Effects of dimethyl sulfoxide on the morphology and viability of primary cultured neurons and astrocytes. *Brain Res Bull* 128:34–39. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.11.004>
324. Johnson JW, Ascher P (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325:529–531. <https://doi.org/10.1038/325529a0>
325. Behnisch T, YuanXiang P, Bethge P, et al (2011) Nuclear Translocation of Jacob in Hippocampal Neurons after Stimuli Inducing Long-Term Potentiation but Not Long-Term Depression. *PLoS One* 6:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017276>
326. McBain CJ, Mayer ML (1994) N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev* 74:723–760. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.3.723>
327. Boccia M, Freudenthal R, Blake M, et al (2007) Activation of Hippocampal Nuclear Factor- B by Retrieval Is Required for Memory Reconsolidation. *Journal of Neuroscience* 27:13436–13445. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4430-07.2007>
328. Freudenthal R, Boccia MM, Acosta GB, et al (2005) NF-kappaB transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice. *Eur J Neurosci* 21:2845–2852. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04126.x>
329. de la Fuente V (2012) Mecanismos celulares y moleculares involucrados en las distintas fases de la memoria de condicionamiento de miedo en ratones. Universidad de Buenos Aires
330. Fanselow MS (1980) Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov J Biol Sci* 15:177–182
331. Blanchard RJ, Blanchard DC (1969) Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J Comp Physiol Psychol* 68:129–135. <https://doi.org/10.1037/h0027676>
332. Glowinski J, Iversen LL (1966) Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H]norepinephrine, [3H]dopamine and [3H]dopa in various regions of the brain. *J Neurochem* 13:655–669. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1966.tb09873.x>

333. Salles A, Boccia M, Blake M, et al (2015) Hippocampal dynamics of synaptic NF-kappa B during inhibitory avoidance long-term memory consolidation in mice. *Neuroscience* 291:70–80. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.063>
334. Aakalu G, Smith WB, Nguyen N, et al (2001) Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron* 30:489–502
335. Player AN, Shen L-P, Kenny D, et al (2016) Single-copy Gene Detection Using Branched DNA (bdNA) In Situ Hybridization: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. <https://doi.org/10.1177/002215540104900507>
336. Tom Dieck S, Müller A, Nehring A, et al (2012) Metabolic labeling with noncanonical amino acids and visualization by chemoselective fluorescent tagging. *Curr Protoc Cell Biol Chapter 7:Unit7.11*. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0711s56>
337. Dumitriu D, Rodriguez A, Morrison JH (2011) High-throughput, detailed, cell-specific neuroanatomy of dendritic spines using microinjection and confocal microscopy. *Nature Protocols* 6:1391–1411. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.389>
338. Harris KM, Jensen FE, Tsao B (1992) Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci* 12:2685–2705
339. Bourne JN, Harris KM (2011) Coordination of size and number of excitatory and inhibitory synapses results in a balanced structural plasticity along mature hippocampal CA1 dendrites during LTP. *Hippocampus* 21:354–373. <https://doi.org/10.1002/hipo.20768>
340. Peters A, Kaiserman-Abramof IR (1969) The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. *Z Zellforsch* 100:487–506. <https://doi.org/10.1007/BF00344370>
341. Koh IYY, Lindquist WB, Zito K, et al (2002) An image analysis algorithm for dendritic spines. *Neural Comput* 14:1283–1310. <https://doi.org/10.1162/089976602753712945>
342. Nader K (2015) Reconsolidation and the Dynamic Nature of Memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a021782. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021782>
343. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ (2005) GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological Genomics* 21:389–395. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00025.2005>
344. Piszczatowski RT, Rafferty BJ, Rozado A, et al (2014) The glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) is regulated by myeloid zinc finger 1 (MZF-1) and is induced by calcitriol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 451:137–141. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.082>
345. Agnew BJ, Minamide LS, Bamberg JR (1995) Reactivation of Phosphorylated Actin Depolymerizing Factor and Identification of the Regulatory Site. *J Biol Chem* 270:17582–17587. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.29.17582>
346. Moriyama K, Iida K, Yahara I (1996) Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells* 1:73–86. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.05005.x>
347. Evans GJO (2015) The Synaptosome as a Model System for Studying Synaptic Physiology. *Cold Spring Harb Protoc* 2015:pdb.top074450. <https://doi.org/10.1101/pdb.top074450>
348. Tovote P, Fadok JP, Lüthi A (2015) Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci* 16:317–331. <https://doi.org/10.1038/nrn3945>

349. Lee M-H, Kundu JK, Chae J-I, Shim J-H (2019) Targeting ROCK/LIMK/cofilin signaling pathway in cancer. *Arch Pharm Res* 42:481–491. <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01153-w>
350. Manetti F (2012) LIM kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators: LIM KINASES ARE ATTRACTIVE TARGETS. *Medicinal Research Reviews* 32:968–998. <https://doi.org/10.1002/med.20230>
351. Park J-B, Agnihotri S, Golbourn B, et al (2014) Transcriptional profiling of GBM invasion genes identifies effective inhibitors of the LIM kinase-Cofilin pathway. *Oncotarget* 5:. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2412>
352. Sparrow N, Manetti ME, Bott M, et al (2012) The actin-severing protein cofilin is downstream of neuregulin signaling and is essential for Schwann cell myelination. *J Neurosci* 32:5284–5297. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6207-11.2012>
353. Secko D (2003) Protein phosphorylation: a global regulator of cellular activity. *Sci Creative Quarterly* 3:
354. Sacco F, Perfetto L, Castagnoli L, Cesareni G (2012) The human phosphatase interactome: An intricate family portrait. *FEBS Lett* 586:2732–2739. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.008>
355. Garcia-Garcia T, Poncet S, Derouiche A, et al (2016) Role of Protein Phosphorylation in the Regulation of Cell Cycle and DNA-Related Processes in Bacteria. *Front Microbiol* 7:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00184>
356. Li X, Wilmanns M, Thornton J, Köhn M (2013) Elucidating human phosphatase-substrate networks. *Sci Signal* 6:rs10. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003203>
357. Rangaraju V, Tom Dieck S, Schuman EM (2017) Local translation in neuronal compartments: how local is local? *EMBO Rep* 18:693–711. <https://doi.org/10.15252/embr.201744045>
358. Singh G, Pratt G, Yeo GW, Moore MJ (2015) The Clothes Make the mRNA: Past and Present Trends in mRNP Fashion. *Annu Rev Biochem* 84:325–354. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-080111-092106>
359. Martin KC, Zukin RS (2006) RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *J Neurosci* 26:7131–7134. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1801-06.2006>
360. Maizels Y, Oberman F, Miloslavski R, et al (2015) Localization of cofilin mRNA to the leading edge of migrating cells promotes directed cell migration. *Journal of Cell Science* 128:1922–1933. <https://doi.org/10.1242/jcs.163972>
361. Matsuzaki F, Matsumoto S, Yahara I, et al (1988) Cloning and characterization of porcine brain cofilin cDNA. Cofilin contains the nuclear transport signal sequence. *J Biol Chem* 263:11564–11568
362. Lee S-K, Hollenbeck PJ (2003) Organization and translation of mRNA in sympathetic axons. *Journal of Cell Science* 116:4467–4478. <https://doi.org/10.1242/jcs.00745>
363. Willis D (2005) Differential Transport and Local Translation of Cytoskeletal, Injury-Response, and Neurodegeneration Protein mRNAs in Axons. *Journal of Neuroscience* 25:778–791. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4235-04.2005>
364. Feuge J, Scharkowski F, Michaelsen-Preusse K, Korte M (2019) FMRP Modulates Activity-Dependent Spine Plasticity by Binding Cofilin1 mRNA and Regulating Localization and Local Translation. *Cerebral Cortex* 29:5204–5216. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz059>

365. Tiruchinapalli DM, Oleynikov Y, Kelič S, et al (2003) Activity-Dependent Trafficking and Dynamic Localization of Zipcode Binding Protein 1 and β -Actin mRNA in Dendrites and Spines of Hippocampal Neurons. *J Neurosci* 23:3251–3261. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-08-03251.2003>
366. Cajigas IJ, Tushev G, Will TJ, et al (2012) The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging. *Neuron* 74:453–466. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.036>
367. Sarthy PV, Fu M, Huang J (1989) Subcellular localization of an intermediate filament protein and its mRNA in glial cells. *Mol Cell Biol* 9:4556–4559
368. da Cunha A, Aloyo VJ, Vitković L (1991) Developmental regulation of GAP-43, glutamine synthetase and β -actin mRNA in rat cortical astrocytes. *Developmental Brain Research* 64:212–215. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(91\)90228-B](https://doi.org/10.1016/0165-3806(91)90228-B)
369. Medrano S, Steward O Differential mRNA localization in astroglial cells in culture. 16
370. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al (2008) *Neuroscience*, 4th ed. Sinauer Associates
371. Duan X, Zhang H-L, Wu L-L, et al (2018) Involvement of LIMK1/2 in actin assembly during mouse embryo development. *Cell Cycle* 17:1381–1389. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1482138>
372. Ross-Macdonald P, de Silva H, Guo Q, et al (2008) Identification of a nonkinase target mediating cytotoxicity of novel kinase inhibitors. *Molecular Cancer Therapeutics* 7:3490–3498. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0826>
373. Petrilli A, Copik A, Posadas M, et al (2014) LIM domain kinases as potential therapeutic targets for neurofibromatosis type 2. *Oncogene* 33:3571–3582. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.320>
374. Radford KD, Park TY, Jaiswal S, et al (2018) Enhanced fear memories and brain glucose metabolism (18F-FDG-PET) following sub-anesthetic intravenous ketamine infusion in Sprague-Dawley rats. *Transl Psychiatry* 8:263. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0310-8>
375. Clifton NE, Thomas KL, Hall J (2018) The effect of ketamine on the consolidation and extinction of contextual fear memory. *J Psychopharmacol (Oxford)* 32:156–162. <https://doi.org/10.1177/0269881117748903>
376. Morena M, Berardi A, Peloso A, et al (2017) Effects of ketamine, dexmedetomidine and propofol anesthesia on emotional memory consolidation in rats: Consequences for the development of post-traumatic stress disorder. *Behav Brain Res* 329:215–220. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.048>
377. Moosavi M, Yadollahi Kholes G, Rastegar K, Zarifkar A (2012) The effect of sub-anesthetic and anesthetic ketamine on water maze memory acquisition, consolidation and retrieval. *Eur J Pharmacol* 677:107–110. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.12.021>
378. Huang L, Hayes S, Yang G (2017) Long-lasting behavioral effects in neonatal mice with multiple exposures to ketamine-xylazine anesthesia. *Neurotoxicol Teratol* 60:75–81. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2016.09.003>
379. Yao N, Skiteva O, Zhang X, et al (2018) Ketamine and its metabolite (2R,6R)-hydroxynorketamine induce lasting alterations in glutamatergic synaptic plasticity in the mesolimbic circuit. *Mol Psychiatry* 23:2066–2077. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.239>
380. Fortress AM, Smith IM, Pang KCH (2018) Ketamine facilitates extinction of avoidance behavior and enhances synaptic plasticity in a rat model of anxiety vulnerability: Implications for the

- pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Neuropharmacology* 137:372–381. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.05.009>
381. KBJ PGF (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press 200:65–69
382. Almeida-Corrêa S, Amaral OB (2014) Memory labilization in reconsolidation and extinction – Evidence for a common plasticity system? *Journal of Physiology-Paris* 108:292–306. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.08.006>
383. Tonegawa S, Morrissey MD, Kitamura T (2018) The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nat Rev Neurosci* 19:485–498. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0031-2>
384. Hardt O, Nadel L (2018) Systems consolidation revisited, but not revised: The promise and limits of optogenetics in the study of memory. *Neuroscience Letters* 680:54–59. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.062>
385. Squire LR (1987) *Memory and brain*. Oxford University Press, New York, NY, US
386. Davis HP, Squire LR (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 96:518–559
387. McGaugh JL (2000) Memory--a Century of Consolidation. *Science* 287:248–251. <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248>
388. Hou Y-Y, Lu B, Li M, et al (2009) Involvement of Actin Rearrangements within the Amygdala and the Dorsal Hippocampus in Aversive Memories of Drug Withdrawal in Acute Morphine-Dependent Rats. *Journal of Neuroscience* 29:12244–12254. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1970-09.2009>
389. Mantzur L, Joels G, Lamprecht R (2009) Actin polymerization in lateral amygdala is essential for fear memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory* 91:85–88. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.001>
390. Motanis H, Maroun M (2012) Differential involvement of protein synthesis and actin rearrangement in the reacquisition of contextual fear conditioning. *Hippocampus* 22:494–500. <https://doi.org/10.1002/hipo.20915>
391. Nelson BS, Witty CF, Williamson EA, Daniel JM (2012) A role for hippocampal actin rearrangement in object placement memory in female rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 98:284–290. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.09.006>
392. Bi A-L, Wang Y, Li B-Q, et al (2010) Region-specific involvement of actin rearrangement-related synaptic structure alterations in conditioned taste aversion memory. *Learning & Memory* 17:420–427. <https://doi.org/10.1101/lm.1772310>
393. Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, et al (2011) Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144:810–823. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.018>
394. Meng Y, Zhang Y, Tregoubov V, et al (2002) Abnormal Spine Morphology and Enhanced LTP in LIMK-1 Knockout Mice. *Neuron* 35:121–133. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00758-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00758-4)
395. Dash PK, Orsi SA, Moody M, Moore AN (2004) A role for hippocampal Rho-ROCK pathway in long-term spatial memory. *Biochem Biophys Res Commun* 322:893–898. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.004>
396. Stafford JM, Lattal KM (2009) Direct comparisons of the size and persistence of anisomycin-induced consolidation and reconsolidation deficits. *Learn Mem* 16:494–503. <https://doi.org/10.1101/lm.1452209>

397. Lattal KM, Wood MA (2013) Epigenetics and persistent memory: implications for reconsolidation and silent extinction beyond the zero. *Nat Neurosci* 16:124–129. <https://doi.org/10.1038/nn.3302>
398. Serwer L, Hashizume R, Ozawa T, James CD (2010) Systemic and Local Drug Delivery for Treating Diseases of the Central Nervous System in Rodent Models. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/1992>
399. Trannoy S, Redt-Clouet C, Dura J-M, Preat T (2011) Parallel Processing of Appetitive Short- and Long-Term Memories In *Drosophila*. *Current Biology* 21:1647–1653. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.08.032>
400. Cascella M, Al Khalili Y (2020) Short Term Memory Impairment. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)
401. Cammarota M, Bevilaqua LRM, Rossato JI, et al (2005) Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. *Neurobiology of Learning and Memory* 84:25–32. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.03.002>
402. Kukushkin NV, Carew TJ (2017) Memory Takes Time. *Neuron* 95:259–279. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.029>
403. Pedreira ME, Maldonado H (2003) Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* 38:863–869. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00352-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00352-0)
404. Vianna MRM, Szapiro G, McGaugh JL, et al (2001) Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *PNAS* 98:12251–12254. <https://doi.org/10.1073/pnas.211433298>
405. Todd TP, Vurbic D, Bouton ME (2014) Behavioral and neurobiological mechanisms of extinction in Pavlovian and instrumental learning. *Neurobiol Learn Mem* 108:52–64. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.08.012>
406. Felsenberg J, Jacob PF, Walker T, et al (2018) Integration of Parallel Opposing Memories Underlies Memory Extinction. *Cell* 175:709–722.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.021>
407. Cammarota M, Bevilaqua LRM, Vianna MRM, et al (2007) The extinction of conditioned fear: structural and molecular basis and therapeutic use. *Brazilian Journal of Psychiatry* 29:80–85. <https://doi.org/10.1590/S1516-44462006005000022>
408. Vianna MR, Igaz LM, Coitinho AS, et al (2003) Memory extinction requires gene expression in rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 79:199–203
409. Santini E, Ge H, Ren K, et al (2004) Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 24:5704–5710. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0786-04.2004>
410. Orsini CA, Kim JH, Knapska E, Maren S (2011) Hippocampal and Prefrontal Projections to the Basal Amygdala Mediate Contextual Regulation of Fear after Extinction. *Journal of Neuroscience* 31:17269–17277. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4095-11.2011>
411. Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, et al (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418:530–534. <https://doi.org/10.1038/nature00839>
412. Milad MR, Quirk GJ (2002) Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 420:70–74. <https://doi.org/10.1038/nature01138>

413. Akirav I, Raizel H, Maroun M (2006) Enhancement of conditioned fear extinction by infusion of the GABA(A) agonist muscimol into the rat prefrontal cortex and amygdala. *Eur J Neurosci* 23:758–764. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04603.x>
414. Akirav I, Khatsrinov V, Vouimba R-M, et al (2006) Extinction of conditioned taste aversion depends on functional protein synthesis but not on NMDA receptor activation in the ventromedial prefrontal cortex. *Learn Mem* 13:254–258. <https://doi.org/10.1101/lm.191706>
415. Morgan MA, Romanski LM, LeDoux JE (1993) Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett* 163:109–113. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90241-c](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90241-c)
416. Quirk GJ, Russo GK, Barron JL, Lebron K (2000) The Role of Ventromedial Prefrontal Cortex in the Recovery of Extinguished Fear. *J Neurosci* 20:6225–6231. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-16-06225.2000>
417. Bahar A, Samuel A, Hazvi S, Dudai Y (2003) The amygdalar circuit that acquires taste aversion memory differs from the circuit that extinguishes it. *Eur J Neurosci* 17:1527–1530. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02551.x>
418. Maroun M, Kavushansky A, Holmes A, et al (2012) Enhanced extinction of aversive memories by high-frequency stimulation of the rat infralimbic cortex. *PLoS ONE* 7:e35853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035853>
419. Spector I, Shochet NR, Kashman Y, Growseiss A (1983) Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* 219:493–495. <https://doi.org/10.1126/science.6681676>
420. Coué M, Brenner SL, Spector I, Korn ED (1987) Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Letters* 213:316–318. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)81513-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)81513-2)
421. Spector I, Shochet NR, Blasberger D, Kashman Y (1989) Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* 13:127–144. <https://doi.org/10.1002/cm.970130302>
422. Fujiwara I, Zweifel ME, Courtemanche N, Pollard TD (2018) Latrunculin A Accelerates Actin Filament Depolymerization in Addition to Sequestering Actin Monomers. *Current Biology* 28:3183-3192.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.082>
423. de la Fuente V, Medina C, Falasco G, et al (2019) The lateral neocortex is critical for contextual fear memory reconsolidation. *Sci Rep* 9:12157. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48340-9>
424. Bubb MR, Spector I, Beyer BB, Fosen KM (2000) Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. *J Biol Chem* 275:5163–5170. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.5163>
425. Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313:1093–1097. <https://doi.org/10.1126/science.1128134>
426. Bosch M, Castro J, Saneyoshi T, et al (2014) Structural and Molecular Remodeling of Dendritic Spine Substructures during Long-Term Potentiation. *Neuron* 82:444–459. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.021>
427. Zhang L, Li Y-H, Meng K, Han T-Z (2010) Increased expression of phospho-cofilin in CA1 and subiculum areas after theta-burst stimulation of Schaffer collateral-commissural fibers in rat hippocampal slices. *Chin J Physiol* 53:328–336

428. Fukazawa Y, Saitoh Y, Ozawa F, et al (2003) Hippocampal LTP Is Accompanied by Enhanced F-Actin Content within the Dendritic Spine that Is Essential for Late LTP Maintenance In Vivo. *Neuron* 38:447–460. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00206-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00206-X)
429. Okamoto K, Bosch M, Hayashi Y (2009) The roles of CaMKII and F-actin in the structural plasticity of dendritic spines: a potential molecular identity of a synaptic tag? *Physiology (Bethesda)* 24:357–366. <https://doi.org/10.1152/physiol.00029.2009>
430. Lu W, Man H, Ju W, et al (2001) Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 29:243–254. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00194-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00194-5)
431. Calabrese B, Wilson MS, Halpain S (2006) Development and Regulation of Dendritic Spine Synapses. *Physiology* 21:38–47. <https://doi.org/10.1152/physiol.00042.2005>
432. Holtmaat AJGD, Trachtenberg JT, Willbrecht L, et al (2005) Transient and Persistent Dendritic Spines in the Neocortex In Vivo. *Neuron* 45:279–291. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.003>
433. Dayan E, Cohen LG (2011) Neuroplasticity Subservient Motor Skill Learning. *Neuron* 72:443–454. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.10.008>
434. Sala C, Segal M (2014) Dendritic Spines: The Locus of Structural and Functional Plasticity. *Physiological Reviews* 94:141–188. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2013>
435. Segal M (2017) Dendritic spines: Morphological building blocks of memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 138:3–9. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.06.007>
436. Jones EG, Powell TP (1969) Morphological variations in the dendritic spines of the neocortex. *J Cell Sci* 5:509–529
437. Bourne J, Harris KM (2007) Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol* 17:381–386. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.04.009>
438. Skoff RP, Hamburger V (1974) Fine structure of dendritic and axonal growth cones in embryonic chick spinal cord. *Journal of Comparative Neurology* 153:107–147. <https://doi.org/10.1002/cne.901530202>
439. Mattila PK, Lappalainen P (2008) Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:446–454. <https://doi.org/10.1038/nrm2406>
440. Yuste R, Bonhoeffer T (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 24:1071–1089. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.1071>
441. Okada T, Yamada N, Tsuzuki K, et al (2003) Long-term potentiation in the hippocampal CA1 area and dentate gyrus plays different roles in spatial learning. *Eur J Neurosci* 17:341–349. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02458.x>
442. Redman S (1996) The hippocampus, long-term potentiation and memory. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:961–964. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1996.tb01149.x>
443. Volianskis A, France G, Jensen MS, et al (2015) Long-term potentiation and the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res* 1621:5–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.01.016>
444. Megías M, Emri Z, Freund TF, Gulyás AI (2001) Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* 102:527–540. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00496-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00496-6)

445. Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571–591. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90424-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90424-7)
446. Hammond C The adult hippocampal network. 17
447. Wouterlood FG, Saldana E, Witter MP (1990) Projection from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 296:179–203. <https://doi.org/10.1002/cne.902960202>
448. Spruston / Kath - Neural modeling. <http://dendrites.esam.northwestern.edu/>. Accessed 4 Sep 2020
449. Moser MB (1999) Making more synapses: a way to store information? *CMLS, Cell Mol Life Sci* 55:593–600. <https://doi.org/10.1007/s000180050317>
450. Bailey CH, Kandel ER (1993) Structural Changes Accompanying Memory Storage. *Annu Rev Physiol* 55:397–426. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.55.030193.002145>
451. Knafo S, Libersat F, Barkai E (2005) Olfactory learning-induced morphological modifications in single dendritic spines of young rats. *European Journal of Neuroscience* 21:2217–2226. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04041.x>
452. González-Tapia D, Martínez-Torres NI, Hernández-González M, et al (2016) Plastic changes to dendritic spines on layer V pyramidal neurons are involved in the rectifying role of the prefrontal cortex during the fast period of motor learning. *Behavioural Brain Research* 298:261–267. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.11.013>
453. Leuner B, Falduo J, Shors TJ (2003) Associative Memory Formation Increases the Observation of Dendritic Spines in the Hippocampus. *J Neurosci* 23:659–665. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-02-00659.2003>
454. O'Malley A, O'Connell C, Murphy KJ, Regan CM (2000) Transient spine density increases in the mid-molecular layer of hippocampal dentate gyrus accompany consolidation of a spatial learning task in the rodent. *Neuroscience* 99:229–232. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00182-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00182-2)
455. Pignataro A, Middei S, Borreca A, Ammassari-Teule M (2013) Indistinguishable pattern of amygdala and hippocampus rewiring following tone or contextual fear conditioning in C57BL/6 mice. *Front Behav Neurosci* 7:156. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00156>
456. Rusakov DA, Davies HA, Harrison E, et al (1997) Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neuroscience* 80:69–77. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00125-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00125-5)
457. de la Fuente V, Federman N, Fustiñana MS, et al (2014) Calcineurin phosphatase as a negative regulator of fear memory in hippocampus: control on nuclear factor- κ B signaling in consolidation and reconsolidation. *Hippocampus* 24:1549–1561. <https://doi.org/10.1002/hipo.22334>
458. Salles A, Romano A, Freudenthal R (2014) Synaptic NF- κ B pathway in neuronal plasticity and memory. *J Physiol Paris* 108:256–262. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.05.002>
459. Merlo E, Freudenthal R, Maldonado H, Romano A (2005) Activation of the transcription factor NF- κ B by retrieval is required for long-term memory reconsolidation. *Learn Mem* 12:23–29. <https://doi.org/10.1101/lm.82705>
460. Lubin FD, Sweatt JD (2007) The I κ B kinase regulates chromatin structure during reconsolidation of conditioned fear memories. *Neuron* 55:942–957. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.039>

461. Si J, Yang J, Xue L, et al (2012) Activation of NF- κ B in basolateral amygdala is required for memory reconsolidation in auditory fear conditioning. *PLoS ONE* 7:e43973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043973>
462. Yang J, Yu J, Jia X, et al (2011) Inhibition of nuclear factor- κ B impairs reconsolidation of morphine reward memory in rats. *Behav Brain Res* 216:592–596. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.08.047>
463. Boersma MCH, Dresselhaus EC, De Biase LM, et al (2011) A requirement for nuclear factor-kappaB in developmental and plasticity-associated synaptogenesis. *J Neurosci* 31:5414–5425. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2456-10.2011>
464. Li J, Gu X, Ma Y, et al (2010) Nna1 Mediates Purkinje Cell Dendritic Development via Lysyl Oxidase Propeptide and NF- κ B Signaling. *Neuron* 68:45–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.013>
465. Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, et al (2003) NF- κ B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci* 6:1072–1078. <https://doi.org/10.1038/nn1110>
466. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (2015) NF-KappaB in Long-Term Memory and Structural Plasticity in the Adult Mammalian Brain. *Front Mol Neurosci* 8:. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00069>
467. Imielski Y, Schwamborn JC, Lüningschrör P, et al (2012) Regrowing the Adult Brain: NF- κ B Controls Functional Circuit Formation and Tissue Homeostasis in the Dentate Gyrus. *PLOS ONE* 7:e30838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030838>
468. O’Sullivan NC, Croydon L, McGettigan PA, et al (2010) Hippocampal region-specific regulation of NF-kappaB may contribute to learning-associated synaptic reorganisation. *Brain Res Bull* 81:385–390. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.11.001>
469. Gutierrez H, Hale VA, Dolcet X, Davies A (2005) NF-kappaB signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. *Development* 132:1713–1726. <https://doi.org/10.1242/dev.01702>
470. Mémet S (2006) NF- κ B functions in the nervous system: From development to disease. *Biochemical Pharmacology* 72:1180–1195. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.09.003>
471. Simon CM, Hepburn I, Chen W, De Schutter E (2014) The role of dendritic spine morphology in the compartmentalization and delivery of surface receptors. *J Comput Neurosci* 36:483–497. <https://doi.org/10.1007/s10827-013-0482-4>
472. Medvedev NI, Popov VI, Rodriguez Arellano JJ, et al (2010) The N-methyl-D-aspartate receptor antagonist CPP alters synapse and spine structure and impairs long-term potentiation and long-term depression induced morphological plasticity in dentate gyrus of the awake rat. *Neuroscience* 165:1170–1181. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.047>
473. Lushnikova I, Skibo G, Muller D, Nikonenko I (2009) Synaptic potentiation induces increased glial coverage of excitatory synapses in CA1 hippocampus. *Hippocampus* 19:753–762. <https://doi.org/10.1002/hipo.20551>
474. Kobayashi C, Aoki C, Kojima N, et al (2007) Drebrin a content correlates with spine head size in the adult mouse cerebral cortex. *J Comp Neurol* 503:618–626. <https://doi.org/10.1002/cne.21408>
475. Araya R, Vogels TP, Yuste R (2014) Activity-dependent dendritic spine neck changes are correlated with synaptic strength. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E2895–E2904. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321869111>
476. Perkel DH, Perkel DJ (1985) Dendritic spines: role of active membrane in modulating synaptic efficacy. *Brain Res* 325:331–335. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90334-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90334-8)

477. Graham BP, Saudargiene A, Cobb S (2014) Spine head calcium as a measure of summed postsynaptic activity for driving synaptic plasticity. *Neural Comput* 26:2194–2222. https://doi.org/10.1162/NECO_a_00640
478. Takasaki K, Sabatini BL (2014) Super-resolution 2-photon microscopy reveals that the morphology of each dendritic spine correlates with diffusive but not synaptic properties. *Front Neuroanat* 8:29. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00029>
479. Wickens J (1988) Electrically coupled but chemically isolated synapses: dendritic spines and calcium in a rule for synaptic modification. *Prog Neurobiol* 31:507–528. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(88\)90013-5](https://doi.org/10.1016/0301-0082(88)90013-5)
480. Rak R, Haklai R, Elad-Tzfadia G, et al (2014) Novel LIMK2 inhibitor blocks Panc-1 tumor growth in a mouse xenograft model. *Oncoscience* 1:. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.7>
481. Wolf M, Zimmermann A-M, Görlich A, et al (2015) ADF/Cofilin Controls Synaptic Actin Dynamics and Regulates Synaptic Vesicle Mobilization and Exocytosis. *Cereb Cortex* 25:2863–2875. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu081>
482. Carlier M-F, Ressad F, Pantaloni D (1999) Control of Actin Dynamics in Cell Motility: ROLE OF ADF/COFILIN. *J Biol Chem* 274:33827–33830. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.48.33827>
483. Bobkov AA, Muhlrud A, Pavlov DA, et al (2006) Cooperative Effects of Cofilin (ADF) on Actin Structure Suggest Allosteric Mechanism of Cofilin Function. *Journal of Molecular Biology* 356:325–334. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.072>
484. McGough A, Pope B, Weeds A (2001) The ADF/Cofilin Family: Accelerators of Actin Reorganization. In: dos Remedios CG, Thomas DD (eds) *Molecular Interactions of Actin: Actin Structure and Actin-Binding Proteins*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 135–154
485. Wang W, Eddy R, Condeelis J (2007) The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nature Reviews Cancer* 7:429–440. <https://doi.org/10.1038/nrc2148>
486. Van Troys M, Huyck L, Leyman S, et al (2008) Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur J Cell Biol* 87:649–667. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2008.04.001>
487. Pavlov D, Muhlrud A, Cooper J, et al (2007) ACTIN FILAMENT SEVERING BY COFILIN. *J Mol Biol* 365:1350–1358. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.102>
488. Orlova A, Shvetsov A, Galkin VE, et al (2004) Actin-destabilizing factors disrupt filaments by means of a time reversal of polymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:17664–17668. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407525102>
489. Kudryashov DS, Galkin VE, Orlova A, et al (2006) Cofilin Cross-bridges Adjacent Actin Protomers and Replaces part of the Longitudinal F-actin Interface. *Journal of Molecular Biology* 358:785–797. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.02.029>
490. Yeoh S, Pope B, Mannherz HG, Weeds A (2002) Determining the differences in actin binding by human ADF and cofilin. *J Mol Biol* 315:911–925. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5280>
491. Nadkarni AV, Briehner WM (2014) Aip1 Destabilizes Cofilin-Saturated Actin Filaments by Severing and Accelerating Monomer Dissociation from Ends. *Current Biology* 24:2749–2757. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.048>
492. Gu J, Firestein BL, Zheng JQ (2008) Microtubules in Dendritic Spine Development. *Journal of Neuroscience* 28:12120–12124. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2509-08.2008>

493. Hu X, Viesselmann C, Nam S, et al (2008) Activity-Dependent Dynamic Microtubule Invasion of Dendritic Spines. *Journal of Neuroscience* 28:13094–13105. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3074-08.2008>
494. Mitsuyama F, Niimi G, Kato K, et al (2008) Redistribution of microtubules in dendrites of hippocampal CA1 neurons after tetanic stimulation during long-term potentiation. *Ital J Anat Embryol* 113:17–27
495. Merriam EB, Millette M, Lombard DC, et al (2013) Synaptic Regulation of Microtubule Dynamics in Dendritic Spines by Calcium, F-Actin, and Drebrin. *Journal of Neuroscience* 33:16471–16482. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0661-13.2013>
496. Kilinc D (2018) The Emerging Role of Mechanics in Synapse Formation and Plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12:. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00483>
497. Esteves da Silva M, Adrian M, Schätzle P, et al (2015) Positioning of AMPA Receptor-Containing Endosomes Regulates Synapse Architecture. *Cell Reports* 13:933–943. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.062>
498. Kapitein LC, Yau KW, Gouveia SM, et al (2011) NMDA Receptor Activation Suppresses Microtubule Growth and Spine Entry. *J Neurosci* 31:8194–8209. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6215-10.2011>
499. Gorovoy M, Niu J, Bernard O, et al (2005) LIM Kinase 1 Coordinates Microtubule Stability and Actin Polymerization in Human Endothelial Cells. *J Biol Chem* 280:26533–26542. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502921200>
500. Po’uha ST, Shum MSY, Goebel A, et al (2010) LIM-kinase 2, a regulator of actin dynamics, is involved in mitotic spindle integrity and sensitivity to microtubule-destabilizing drugs. *Oncogene* 29:597–607. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.367>
501. Mardilovich K, Baugh M, Crighton D, et al (2015) LIM kinase inhibitors disrupt mitotic microtubule organization and impair tumor cell proliferation. *Oncotarget* 6:38469–38486
502. Ray S, Fanti JA, Macedo DP, Larsen M (2014) LIM kinase regulation of cytoskeletal dynamics is required for salivary gland branching morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell* 25:2393–2407. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-02-0705>
503. Prunier C, Josserand V, Vollaire J, et al (2016) LIM Kinase Inhibitor Pyr1 Reduces the Growth and Metastatic Load of Breast Cancers. *Cancer Res* 76:3541–3552. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1864>
504. Prudent R, Vassal-Stermann E, Nguyen C-H, et al (2012) Pharmacological Inhibition of LIM Kinase Stabilizes Microtubules and Inhibits Neoplastic Growth. *Cancer Res* 72:4429–4439. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3342>
505. Oku Y, Tareyanagi C, Takaya S, et al (2014) Multimodal effects of small molecule ROCK and LIMK inhibitors on mitosis, and their implication as anti-leukemia agents. *PLoS ONE* 9:e92402. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092402>
506. Bhardwaj A, Srivastava SK, Singh S, et al (2014) CXCL12/CXCR4 signaling counteracts docetaxel-induced microtubule stabilization via p21-activated kinase 4-dependent activation of LIM domain kinase 1. *Oncotarget* 5:11490–11500
507. Heng Y-W, Lim H-H, Mina T, et al (2012) TPPP acts downstream of RhoA-ROCK-LIMK2 to regulate astral microtubule organization and spindle orientation. *J Cell Sci* 125:1579–1590. <https://doi.org/10.1242/jcs.096818>

508. Bamburg JR, Wiggan OP (2002) ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol* 12:598–605
509. Bozon B, Davis S, Laroche S (2003) A requirement for the immediate early gene *zif268* in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron* 40:695–701. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00674-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00674-3)
510. Kelly Á, Laroche S, Davis S (2003) Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase in Hippocampal Circuitry Is Required for Consolidation and Reconsolidation of Recognition Memory. *The Journal of Neuroscience* 23:5354–5360. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-12-05354.2003>
511. Kida S, Josselyn SA, Peña de Ortiz S, et al (2002) CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci* 5:348–355. <https://doi.org/10.1038/nn819>
512. Koh MT, Bernstein IL (2003) Inhibition of protein kinase A activity during conditioned taste aversion retrieval: interference with extinction or reconsolidation of a memory? *Neuroreport* 14:405–407. <https://doi.org/10.1097/00001756-200303030-00021>
513. Nader K, Schafe GE, LeDoux JE (2000) The labile nature of consolidation theory: Reply — reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience* 1:216–219. <https://doi.org/10.1038/35044580>
514. Lee JLC, Everitt BJ, Thomas KL (2004) Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304:839–843. <https://doi.org/10.1126/science.1095760>
515. Nyberg L, McIntosh AR, Cabeza R, et al (1996) General and specific brain regions involved in encoding and retrieval of events: what, where, and when. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11280–11285
516. Salinska E, Bourne RC, Rose SPR (2004) Reminder effects: the molecular cascade following a reminder in young chicks does not recapitulate that following training on a passive avoidance task. *Eur J Neurosci* 19:3042–3047. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03407.x>
517. Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM (2001) The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci* 4:813–818. <https://doi.org/10.1038/90520>
518. Tronel S, Sara SJ (2002) Mapping of olfactory memory circuits: region-specific *c-fos* activation after odor-reward associative learning or after its retrieval. *Learn Mem* 9:105–111. <https://doi.org/10.1101/lm.47802>
519. Pagani MR, Merlo E (2019) Kinase and Phosphatase Engagement Is Dissociated Between Memory Formation and Extinction. *Front Mol Neurosci* 12:38. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00038>
520. Lin C-H, Yeh S-H, Leu T-H, et al (2003) Identification of calcineurin as a key signal in the extinction of fear memory. *J Neurosci* 23:1574–1579
521. Baumgärtel K, Genoux D, Welzl H, et al (2008) Control of the establishment of aversive memory by calcineurin and *Zif268*. *Nat Neurosci* 11:572–578. <https://doi.org/10.1038/nn.2113>
522. Mansuy IM (2003) Calcineurin in memory and bidirectional plasticity. *Biochem Biophys Res Commun* 311:1195–1208. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.10.046>
523. Shaw JA, Matlovich N, Rushlow W, et al (2012) Role of calcineurin in inhibiting disadvantageous associations. *Neuroscience* 203:144–152. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.010>

524. Wen Z, Han L, Bamberg JR, et al (2007) BMP gradients steer nerve growth cones by a balancing act of LIM kinase and Slingshot phosphatase on ADF/cofilin. *J Cell Biol* 178:107–119. <https://doi.org/10.1083/jcb.200703055>
525. Madineni A, Alhadidi Q, Shah ZA (2016) Cofilin Inhibition Restores Neuronal Cell Death in Oxygen-Glucose Deprivation Model of Ischemia. *Mol Neurobiol* 53:867–878. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9056-3>
526. Wang Y, Shibasaki F, Mizuno K (2005) Calcium Signal-induced Cofilin Dephosphorylation Is Mediated by Slingshot via Calcineurin. *Journal of Biological Chemistry* 280:12683–12689. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411494200>
527. Lattal KM, Abel T (2004) Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4667–4672. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306546101>
528. Amaral OB, Osan R, Roesler R, Tort ABL (2008) A synaptic reinforcement-based model for transient amnesia following disruptions of memory consolidation and reconsolidation. *Hippocampus* 18:584–601. <https://doi.org/10.1002/hipo.20420>
529. Almeida-Corrêa S, Moulin TC, Carneiro CFD, et al (2015) Calcineurin inhibition blocks within-, but not between-session fear extinction in mice. *Learn Mem* 22:159–169. <https://doi.org/10.1101/lm.037770.114>
530. Rivera-Olvera A, Nelson-Mora J, Gonsebatt ME, Escobar ML (2018) Extinction of aversive taste memory homeostatically prevents the maintenance of in vivo insular cortex LTP: Calcineurin participation. *Neurobiol Learn Mem* 154:54–61. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.04.005>
531. Herman IM (1993) Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol* 5:48–55. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(05\)80007-9](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(05)80007-9)
532. Shestakova EA, Singer RH, Condeelis J (2001) The physiological significance of β -actin mRNA localization in determining cell polarity and directional motility. *PNAS* 98:7045–7050. <https://doi.org/10.1073/pnas.121146098>
533. Kislauskis EH, Zhu X, Singer RH (1994) Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J Cell Biol* 127:441–451. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.2.441>
534. Lavoie B, Basyuk E, Bordonné R, Bertrand E (2004) Polarité cellulaire et localisation intracellulaire des ARNm de l'actine. *Med Sci (Paris)* 20:539–543. <https://doi.org/10.1051/medsci/2004205539>
535. Yoon YJ, Wu B, Buxbaum AR, et al (2016) Glutamate-induced RNA localization and translation in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:E6877–E6886. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614267113>
536. Klein ME, Younts TJ, Castillo PE, Jordan BA (2013) RNA-binding protein Sam68 controls synapse number and local β -actin mRNA metabolism in dendrites. *PNAS* 110:3125–3130. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209811110>
537. Eom T, Antar LN, Singer RH, Bassell GJ (2003) Localization of a beta-actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses. *J Neurosci* 23:10433–10444
538. Buxbaum AR, Wu B, Singer RH (2014) Single β -Actin mRNA Detection in Neurons Reveals a Mechanism for Regulating Its Translatability. 343:5

-
539. Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31–39. <https://doi.org/10.1038/361031a0>
540. Bokota G, Magnowska M, Kuśmierczyk T, et al (2016) Computational Approach to Dendritic Spine Taxonomy and Shape Transition Analysis. *Front Comput Neurosci* 10:. <https://doi.org/10.3389/fncom.2016.00140>
541. Urban P, Rezaei V, Bokota G, et al (2019) Dendritic Spines Taxonomy: The Functional and Structural Classification • Time-Dependent Probabilistic Model of Neuronal Activation. *Journal of Computational Biology* 26:322–335. <https://doi.org/10.1089/cmb.2018.0155>
542. Motley SE, Grossman YS, Janssen WGM, et al (2018) Selective Loss of Thin Spines in Area 7a of the Primate Intraparietal Sulcus Predicts Age-Related Working Memory Impairment. *J Neurosci* 38:10467–10478. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1234-18.2018>
543. van der Zee EA (2015) Synapses, spines and kinases in mammalian learning and memory, and the impact of aging. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 50:77–85. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.06.012>
544. Dumitriu D, Hao J, Hara Y, et al (2010) Selective changes in thin spine density and morphology in monkey prefrontal cortex correlate with aging-related cognitive impairment. *J Neurosci* 30:7507–7515. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6410-09.2010>
545. Berry KP, Nedivi E (2017) Spine Dynamics: Are They All the Same? *Neuron* 96:43–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.008>
546. Holthoff K, Tsay D, Yuste R (2002) Calcium Dynamics of Spines Depend on Their Dendritic Location. *Neuron* 33:425–437. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00576-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00576-7)