



Universidad
Nacional
de Córdoba



MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS ASOCIADOS A LA RESISTENCIA DE UNA MEMORIA DE MIEDO AL PROCESO DE LABILIZACIÓN/RECONSOLIDACIÓN: REVERSIÓN FARMACOLÓGICA

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Pablo Javier Espejo

Licenciado en Química Farmacéutica

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Instituto de Farmacología Experimental Córdoba (IFEC-CONICET)

Departamento de Farmacología

Córdoba, Argentina

2017

COMISION DE TESIS

Director:

Dr. Víctor Alejandro Molina

Comisión evaluadora:

Dra. Teresa Nieves Scimonelli

Dra. Laura Vivas

Dr. Mario Guido

Evaluador Externo:

Dr. Arturo Romano

El presente trabajo de tesis ha sido realizado íntegramente en el Instituto de Farmacología Experimental Córdoba (IFEC-CONICET), Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

Durante su ejecución, el autor fue becado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Para la realización de este trabajo, se contó con el apoyo financiero de subsidios otorgados por: CONICET, la Secretaría de Ciencia y Tecnología (SECyT-UNC), del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCyT) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT).

Agradecimientos

A mis viejos, Vero y Cacho, por el amor y el esfuerzo, por darnos la oportunidad de estudiar y por el acompañamiento constante durante todos estos años. A mi hermano Lucas, por todos los años de convivencia, amistad (peleas) y amor. Gracias por apuntalarme en los momentos de dificultad y de duda. A toda mi familia, en especial a Anita Paula (una de mis alumnas preferidas) y a Tincho (el ocupa) por lo compartido en Córdoba.

A Inés, la Pequeña. Gracias por el amor, sus ojitos de niña pícara y la locura compartida. Gracias por la hermosa noche en la fiesta de la FCQ y por TODO lo que vino después (y lo que vendrá). A Monono (Shifu) por los ronroneos tranquilizantes y las marcadas de territorio.

Al Dr. Molina, por la posibilidad de trabajar en su grupo. Gracias por las enseñanzas y sobre todo por la paciencia. A Irene por darme la posibilidad de hablar con Víctor y por todos estos años de apoyo y enseñanza. A Vanesa, por toda la ayuda en los experimentos, análisis de resultados y por empujarme en los momentos de flaqueza. Gracias a ambas por su ayuda en la escritura y corrección de los papers. A Marcelo, por su enseñanza en los principios de mis prácticas en el laboratorio. A Gastón, por el asesoramiento bibliográfico y por las charlas diversas. A Silvia B, por sus enseñanzas en mis comienzos. A Crhistian, por sus aportes en esta última etapa.

Al Departamento de Farmacología y el IFEC, por darme la posibilidad de trabajar en dichas instituciones. A CONICET por el apoyo económico.

A la comisión evaluadora (Dra. Laura Vivas, Dra. Techí Scimonelli y Dr. Mario Guido) por todas sus sugerencias, correcciones y el seguimiento a lo largo de estos años. Al Dr. Arturo Romano por aceptar ser evaluador externo y por las enseñanzas en congresos y en su curso.

A Charito, mi madre científica, por impulsarme a transitar este camino y aconsejarme en los momentos complicados. Por los trabajos hechos en conjunto y por las cervezas en Chile.

A Noe, por acogerme en el laboratorio, por enseñarme (qué hacer y qué no hacer), por la ayuda experimental y por el apoyo emocional. Gracias por tu amistad y por los delirios constantes. A Rodri por las charlas y los momentos compartidos. A Fabri, por todas las charlas de ciencia, vida, cosas, por las músicas compartidas y por esa cabeza gigante de la cual aprendí mucho. A Naty (petisa), por estar siempre, por aconsejarme y tranquilizarme, por las risas y los ojos cerrados. A Degio, también por estar siempre, por su oreja incansable, por las andanzas nocturnas. A Pato, por las peleas y por caer en mis chistes, por todas las charlas. A Eve, por la sopa paraguaya, la camiseta y el delirio de los kiwis. A Pedroni, por el préstamo de instalaciones, por los viernes de terraza, por las hermosas imágenes y por usar el tiempo que no tenés en ayudar a los demás. A Mary Jo, por todo el tramiterío, por hacerme aprender un

poquito de inglés y por las risas. A todos ustedes, gracias por la diversión cotidiana, los viajes, las comidas, los mates y otras bebidas.

A Iva M, Mara, Ale E, Colorada, Marixa, Beta, Euge, Caro M, Coti P, Coti GK, Sol R, Lau G y Marian B. La (“primera generación”). Gracias porque en algún momento cada una de ustedes me ha ayudado, escuchado o aconsejado. Gracias por las risas y las juntadas.

A la “segunda generación”, Romi, Maky, Vicky, Leo (Compadre), Martín, Emi, Andre O, Dai, Andre G, Luz, Guada y Paulis (Avalos y Albretch). Gracias por lo compartido (viajes, fiestas, cervezas), y por hacerme sentir tan joven como ustedes.

A los profes del Laboratorio. Gabriel, Susana, Claudia B, Mariela, Claudia H, Miriam, Analía. A la tía Fla, por las charlas, los consejos y los mates (y las cervezas en Mardel).

A la gente de Química Teórica y Computacional, por todos estos años de compartir el edificio y algún que otro asado en el patio.

A Lore y Este, por las incontables disecciones y observaciones de cánulas, por toda su asistencia técnica y la buena predisposición. A los bioteristas, Nico, Yani, Javi y Walter, por todas las sacadas de ratas a último momento y por las charlas de pasillo. A Gladys, por los chocolates del 25. A Silvita D, por facilitarnos toda la burocracia. A Carlos Mas y Cecilia Sampedro por las imágenes tomadas en el microscopio

A Leo F, por su amistad en Mackenna y nuestros inicios juntos (en la facu y en Córdoba), por todo lo compartido. A Leo L y Chanita, por la hermosa carrera compartida y por la hermosa amistad que tenemos. A “los chicos de la facu” (Ari, Pao, Fabi, Carlita, Caro R, Diego, Gise, Magui, Mer, Verito, Yami, Leo R, Seba, Silvio, Guille, Ori, Chelo) por las clases compartidas, fiestas, asados, viajes, etc. A Iva L, More, Lau R, Pablo, Sil. Por lo compartido en la facu y fuera de ella.

A mis amigos de la música, los del coro de la FCQ (Jorgito S), a mis amigos de Coral Resonancia (Hugo de la Vega), a los Alfareros de la Sangre (Juan Arabel) a las Resolana. A todos, gracias por permitirme compartir con ustedes una de las cosas más importantes en mi vida, LA MUSICA. A Edu y Pipo, por las cenas con algo de ensayo.

A toda la comunidad de la FCQ, autoridades, docentes, estudiantes, no docentes y egresados. Gracias por los 12 años compartidos (hasta el momento) en esta hermosa institución que siento como una casa. A los chicos de la 15 (La 15 de Junio), por contagiarme su amor por la facu y por una universidad más justa e inclusiva (y obviamente por las fiestas).

A todas aquellas personas que de una forma u otra me han ayudado y han compartido esta parte del camino conmigo.

Antes de dibujar una figura, tuve conciencia de la luz
Antes de caminar sobre la tierra, tuve presencia en mi lugar
Antes de recorrer una distancia, tuve un recuerdo que llorar
Antes de florecer porque estoy vivo, tuve la lluvia del amor
Antes de silenciar una palabra, tuve que dar el corazón
Antes de ser un pájaro en el nido, tuve en el sueño que volar
Antes de ver llegar a los olvidos, tuve que darme a recordar
Antes de celebrar una victoria, tuve la gloria de luchar
Antes de renacer en los fracasos, tuve el amparo de crecer
Antes de descubrir que soy un hombre, tuve la paz de una canción
Por eso es que delante del abismo, cuando no se ser héroe ni payaso
No me sirven las penas del ocaso, y otra vez me dispongo a comenzar.

Hamlet Lima Quintana

ABREVIATURAS

ABa: Amígdala basal
ABL: Amígdala Basolateral ó Complejo Basolateral de la Amígdala
ACe: Amígdala central
ACTH: Adenocorticotrofina
ALa: Amígdala lateral
AMPA: Acido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AP: Anteroposterior
ATV: Area tegmento ventral
AVP: Hormona hipotalámica arginina-vasopresina (AVP)
BDNF: Factor neurotrófico derivado de cerebro
BIC: Bicuculina
C/EBP β : "*CCAAT/enhancer-binding protein beta*"
CaMK: Calcio-calmodulin quinasa
CeL: Amígdala central lateral
CeM: Amígdala central medial
CI: Células intercalares
CMC: Condicionamiento de miedo contextual
CmPf: Corteza media prefrontal
Cond: Condicionamiento
CREB: "*cAMP-responsive element binding protein*"
CRF: Factor liberador de corticotrofina
DCS: D-cicloserina
DLP: Depresión a largo plazo
DO: Densidad óptica
DTT: Ditiotreitól
DV: Dorsoventral
E: Estrés
EC: Estímulo condicionado
ECL: Quimioluminiscencia aumentada
EHHA: Eje hipotalámico-hipófiso-adrenal
EI: Estímulo incondicionado
ERK: Quinasa regulada extracelularmente
FT: Factor de transcripción
GABA: Acido γ -amino butírico
GRs: Receptores glucocorticoides
HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico
i.p.: Intra peritoneal
IL: Infralímbica

L: Lateral

LC: "*Locus Coeruleus*"

MAPK: Proteinkinasa activada por mitógeno

MCP: Memoria de corto plazo

MCP-PE: Memoria de corto plazo post evocación

MDZ: Midazolam

MLP-PE: Memoria de largo plazo post evocación

MLP: Memoria de largo plazo

MRs: Receptores mineralocorticoides

NA: Noradrenalina

NE: No estrés

NF κ B: Factor neural $\kappa\beta$

NMDA: N-metil D-aspartato

NPP: Neurona principal de proyección

NR: No reactivado

NR1: subunidad NR1 del receptor NMDA

NR2 (A, B, C y D): Subunidades NR2 del receptor NMDA

PAGE: Poliacrilamida

PKA: Proteinkinasa A

PKC: Proteinkinasa C

PL: Prelímbica

PLP: Potenciación a largo plazo

PPEs: Potenciales postínapticos excitatorios

PROP: Propranolol

PVDF: Polivinilideno

R: Reactivado

React: Reactivación

SDS: Dodecil sulfato de Sodio

SUP: Sistema ubiquitina proteosoma

Ub: Ubiquitina

VGCCs: Canales de calcio dependientes de voltaje

α MSH: Hormona α -melanocito estimulante

INDICE

<u>RESUMEN</u>	1
<u>ABSTRACT</u>	4
<u>INTRODUCCION</u>	7
<u>Aprendizaje y memoria</u>	9
<u>Sistemas de memoria</u>	10
<u>Memoria emocional de miedo</u>	12
<u>Condicionamiento de miedo contextual</u>	16
<u>Fases de procesamiento de la memoria</u>	17
Consolidación de la memoria	17
Reconsolidación de la memoria.....	19
<u>Rol funcional del proceso de labilización/reconsolidación</u>	25
<u>Condiciones limitantes a la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación</u>	27
<u>Estrés</u>	28
<u>Respuesta de estrés</u>	30
<u>Influencia del estrés sobre la memoria</u>	31
<u>Relevancia clínica</u>	34
<u>HIPOTESIS Y OBJETIVOS</u>	36
<u>METODOS</u>	41
<u>Animales</u>	42
<u>Estrés por inmovilización</u>	42
<u>Condicionamiento de miedo contextual (CMC)</u>	43
<u>Cirugía estereotáxica</u>	44
<u>Infusión intracraneal y procedimiento histológico</u>	44
<u>Drogas y administración</u>	45
<u>Disección de ABL y extracción de proteínas totales</u>	46
<u>Western Blot</u>	46

<u>Análisis estadístico</u>	48
<u>PROCEDIMIENTOS Y RESULTADOS</u>	49
<u>Capítulo 1: Caracterización de la memoria resistente al proceso de labilización/reconsolidación inducida por estrés previo al condicionamiento. Evidencia conductual y molecular</u>	50
INTRODUCCION.....	51
Objetivo específico 1.1. Evaluar el efecto interferente de MDZ sobre el proceso de reconsolidación en memorias resistentes. Revalidación del modelo.	52
Objetivo específico 1.2. Evaluación de la expresión de la subunidad NR2B en ABL luego de la evocación de memorias en animales con y sin estrés previo.	54
Objetivo específico 1.3. Evaluar la expresión de proteínas poliubiquitinadas en ABL luego de la evocación de memorias en animales con y sin estrés previo.	56
Objetivo específico 1.4. Evaluar de la expresión de Zif-268 en ABL luego de la evocación de memorias en animales con y sin estrés previo.	57
DISCUSION.....	59
<u>Capítulo 2: Efecto de la modulación GABAérgica en ABL sobre la resistencia de la memoria de miedo al proceso de labilización/reconsolidación</u>	66
INTRODUCCION.....	67
Objetivo específico 2.1. Evaluar el efecto interferente de MDZ sobre el proceso de reconsolidación en memorias resistentes. Revalidación del modelo.	68
Objetivo específico 2.2. Estudiar el efecto de la administración intra-ABL de MDZ previo al estrés sobre la resistencia al efecto interferente de MDZ.....	69
Objetivo específico 2.3. Evaluar la influencia de la administración intra-ABL de MDZ previo al estrés sobre la resistencia al efecto interferente de PROP	72
Objetivo específico 2.4. Evaluar la influencia de la administración intra-ABL de BIC previo al condicionamiento sobre la resistencia al efecto interferente de MDZ.....	74
DISCUSION.....	76
<u>Capítulo 3: Reversión farmacológica de la resistencia de la memoria al proceso de labilización/reconsolidación</u>	80
INTRODUCCION.....	81
Objetivo específico 3.1. Estudiar el efecto de la administración sistémica de DCS sobre la resistencia de la memoria al efecto interferente de MDZ	82
Objetivo específico 3.2. Estudiar el efecto de la administración intra-ABL de DCS sobre la resistencia de la memoria al efecto interferente de MDZ.	83

Objetivo específico 3.3. Evaluar el efecto de la administración sistémica de DCS sobre la expresión de Zif 268 en ABL.	86
Objetivo específico 3.4. Estudiar el efecto de la administración sistémica de DCS sobre la resistencia inducida por BIC intra-ABL al efecto interferente de MDZ.	87
DISCUSION.....	89
<u>DISCUSION GENERAL</u>	94
<u>REFERENCIAS</u>	104
<u>PRODUCCION CIENTIFICA</u>	115

RESUMEN

Una memoria consolidada, es decir almacenada y estable, puede ingresar a un nuevo estado de labilidad luego de su evocación, siendo necesario un nuevo proceso de reestabilización denominado reconsolidación. Este proceso puede ser interferido por la administración de agentes farmacológicos como inhibidores de la síntesis proteica ó incluso Midazolam (MDZ), una benzodiazepina de corta acción que potencia la transmisión GABAérgica mediada por el receptor GABA-A, cuando son administrados luego de la evocación. Sin embargo, existen factores o parámetros que limitan la ocurrencia de este proceso de labilización/reconsolidación, tales como la edad de la memoria, la fuerza del aprendizaje, la duración del recordatorio, entre otros.

Nuestro laboratorio ha reportado previamente que la exposición al estrés 24 hs antes de un aprendizaje de miedo contextual promueve la formación de memorias resistentes al efecto interferente de Midazolam (MDZ) sobre la reconsolidación. A su vez, esta resistencia puede ser revertida por la administración de D-cicloserina, un potenciador de la transmisión glutamatérgica mediada por el receptor NMDA, antes de la evocación. Esta evidencia sugiere que las secuelas emocionales del estrés al momento de la formación de la memoria limitan la posterior ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación. Asimismo, la ocurrencia del proceso antes mencionado puede ser favorecida por la activación de receptores NMDA previo a la evocación. A partir de este razonamiento, el presente proyecto tuvo como objetivo estudiar los mecanismos neurobiológicos implicados en la resistencia inducida por estrés a la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación en una memoria de miedo.

En primer lugar se reprodujo el modelo de estrés previamente reportado. Luego, se observó que la evocación de la memoria en animales controles induce un aumento en la expresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA, de proteínas poliubiquitinadas y de Zif-268 en amígdala basolateral (ABL), estructura críticamente implicada en el procesamiento de la memoria de miedo. Por el contrario estos fenómenos no fueron observados luego de la evocación en animales estresados previo al condicionamiento. Esto sugiere que esta resistencia coincide con una falta de ocurrencia de eventos asociados al proceso de labilización/reconsolidación.

En segundo lugar, se demostró que la administración intra-ABL de MDZ previo al estrés previene la inducción de resistencia al efecto interferente de MDZ y Propranolol (PROP), otro agente ampliamente utilizado en la interferencia de la reconsolidación. Por el contrario, la administración de Bicuculina (BIC), un antagonista del receptor GABA-A, antes del condicionamiento mimetiza el efecto del estrés en la generación de memorias resistentes a ser interferidas luego de la evocación. Esta evidencia sugiere que el efecto del estrés sobre la modulación GABAérgica en ABL representa un factor crítico en la formación de memorias resistentes.

Finalmente, se observó que tanto la administración sistémica como intra-BLA de DCS previo a la reactivación revierte la resistencia inducida por estrés al efecto interferente de MDZ. Además, se demostró que la administración sistémica de DCS en animales estresados revierte la falta de aumento en la expresión de Zif-268 en ABL. Asimismo, la administración de DCS previo a la evocación es capaz de revertir la resistencia inducida por la administración intra-ABL de BIC antes del condicionamiento.

En conclusión, un estado emocional negativo al momento del aprendizaje favorece la formación de memorias resistentes a la ocurrencia de mecanismos neurobiológicos que subyacen al proceso de labilización/reconsolidación. Además, la labilización de memorias resistentes, con la consecuente ocurrencia de los mecanismos que subyacen al proceso de labilización/reconsolidación, puede ser promovida por la activación de receptores NMDA previo a la evocación.

ABSTRACT

It is well known that a consolidated memory (i.e. stored and stable) can enter into a new labile phase upon recall. In order to persist, the memory has to be restabilized by a process named reconsolidation. This process can be interfered by several drugs such as protein synthesis inhibitors or even midazolam (MDZ), a short acting benzodiazepine that enhances the GABAergic transmission mediated by GABA-A receptor, when applied shortly after recall. However, diverse factors such as memory age, strength of learning or the duration of reminder session (among others) can limit the occurrence of the labilization/reconsolidation process.

Previous evidence from our laboratory have reported that stress 24 h prior to a contextual fearconditioning protocol promotes the generation of resistant memories to the interfering effect of MDZ on memory reconsolidation. Moreover, this resistance can be reverted by the administration of D-cycloserine, an enhancer of the glutamatergic transmission mediated by NMDA receptor, before memory recall. This evidence suggests that the emotional sequelae of stress at the moment of memory encoding limit the future occurrence of labilization/reconsolidation process. Furthermore, memory destabilization can be promoted by the activation of NMDA receptors during of memory recall. In line with this evidence, the present thesis evaluated the neurobiological mechanisms implicated in the stress-induced resistance to the occurrence of the labilization/reconsolidation process.

First, the previously reported stress-induced resistance has been reproduced. After that, it was observed that memory recall in control animals induces an increase in the expression of NR2B (a NMDA receptor subunit), in polyubiquitinated proteins and in Zif-268 protein in the basolateral amygdala complex (BLA). Moreover, this structure is critically involved in fear memory processing. Conversely, these molecular events have not been observed after recall in previously stressed animals. This suggests that the observed resistance matches with a lack of occurrence of events presumably involved in the labilization/reconsolidation process.

Second, it has been demonstrated that intra-BLA administration of MDZ before stress prevents the induction of fear memory resistance to the interfering affect of both MDZ and propranolol, another agent that interferes memory reconsolidation. Conversely, intra-BLA administration of the GABA-A antagonist bicuculline before memory formation mimics the stress effect on the

induction of resistant memories. This evidence suggests that the modulation of GABAergic transmission within the BLA represents a critical factor in the induction of resistant memories.

Finally, it has been observed that both systemic and intra-BLA administration of DCS before memory recall reverts the stress-induced resistance to the interfering effect of MDZ. Additionally, it has been demonstrated that systemic administration of DCS in stressed animals reverts the lack of increase in Zif-268 expression within the BLA. In the same line of evidence, systemic DCS before memory recall reverts the resistance induced by intra-BLA BIC administration before fear conditioning.

Collectively, this evidence supports the notion that a negative emotional state at the moment of fear learning facilitates the induction of memories resistant to the engagement of labilization/reconsolidation process. Moreover, destabilization of these resistant memories, as well as the molecular mechanisms that underlie the labilization/reconsolidation process, can be promoted by the activation of NMDA receptors at the moment of memory recall.

INTRODUCCION

Si nos situáramos imaginariamente en algún momento de la historia del planeta Tierra en la cual hayan existido formas de vida apreciaríamos que las especies existentes están adaptadas al entorno en el que viven. Si continuáramos este viaje hasta el presente, observaríamos que la descendencia de estas especies primitivas ha experimentado cambios en su material genético (producto del azar ó de la influencia del mismo entorno en el que viven), los cuales pueden haber favorecido o perjudicado su adaptación al entorno. Como consecuencia de esto, aquellas especies mejor adaptadas han evolucionado y persisten en el presente mientras que las menos favorecidas se han extinguido (Darwin, 1859).

Estas adaptaciones pueden ser específicas de algún grupo de especies, como por ejemplo, una anatomía adecuada para nadar ó para alcanzar las hojas de los árboles más altos, o pueden ser características más generales y compartidas por un grupo más amplio de especies, como la obtención de energía y alimento a partir de la luz solar y dióxido de carbono, la capacidad de obtener energía a partir de azúcares o de percibir y procesar estímulos como la luz, el sonido y estímulos olfativos. Además, aquellas adaptaciones favorables son mantenidas en el tiempo.

Los animales, desde los moluscos hasta los seres humanos, comparten no solo la capacidad de recibir y codificar diferentes tipos de estímulos (externos e internos) sino también de almacenar esa información en circuitos neuronales. Este tipo de adaptación, que más adelante definiremos como aprendizaje y memoria, favorece de manera significativa la supervivencia de las especies ya que a partir de las experiencias pasadas permite predecir y responder apropiadamente a situaciones del presente.

Una característica que también suele presentar este fenómeno de almacenamiento de información es la capacidad de que dicha información pueda actualizarse en experiencias sucesivas. Esto también implica una ventaja evolutiva dado que permite la incorporación de información relevante a la ya existente. Sin embargo, de la misma manera que la memoria puede representar una ventaja para la supervivencia y la vida cotidiana, la formación y persistencia de memorias con contenido negativo pueden afectar el normal desempeño del individuo en su entorno y la sociedad.

Asimismo, la memoria no solo ha sido importante para la existencia humana en términos de la supervivencia, sino también que ha significado un medio fundamental para la transmisión del conocimiento a través de las generaciones. De hecho, a lo largo de la historia, el ser humano ha desarrollado diferentes formatos de almacenamiento de información, como la palabra escrita, la pintura y la música entre otros. Respecto a esta idea, Erik Kandel (premio nobel de fisiología o medicina en el año 2000) escribe en su libro “En busca de la memoria: nacimiento de una nueva ciencia de la mente” (2007): “...*La evolución cultural, modo de adaptación que no es biológico, obra en paralelo con la evolución biológica como medio de transmisión del conocimiento del pasado y como comportamiento adaptativo a lo largo de las generaciones. Desde la antigüedad hasta nuestros días, todas las hazañas humanas fueron producto de una memoria compartida que se acumuló durante siglos, fuera mediante registros escritos o a través de una tradición oral conservada con esmero...*”. Además, el desarrollo de nuevas tecnologías como las computadoras y el uso de Internet han permitido aumentar considerablemente la capacidad de almacenamiento de información así como el acceso a la misma. Estos formatos de memoria externos son indicativos de los esfuerzos de la humanidad por expandir la memoria más allá de los límites de los sistemas biológicos. Por todo esto, a los fines de mejorar nuestra comprensión sobre cómo la memoria puede influir de manera positiva o negativa en la vida de los individuos, resulta necesario profundizar nuestro conocimiento sobre los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la formación de memorias, así como aquellos que participan en la ocurrencia (o la falta) de cambios dinámicos de la misma.

Aprendizaje y memoria

El aprendizaje se define como la adquisición de información (tanto interna como externa) producto de una experiencia (Kandel, 2001), mientras que la memoria es la capacidad de almacenar esta información en representaciones internas codificadas espacio-temporalmente en circuitos neuronales (Eichenbaum, 2003; Kandel, 2001). Esta información recibida y almacenada puede o no tomar control del comportamiento (Delorenzi y col., 2014). Además, es importante destacar que existen respuestas innatas (como por ejemplo la respuesta de miedo de un animal ante la presencia de un predador natural) las cuales están codificadas en la carga genética y son independientes de la experiencia. En 1894, Santiago Ramón y Cajal propuso que

la memoria se almacena gracias a un aumento en la conectividad entre las células nerviosas (Eichenbaum, 2003; Kandel, 2001), estos cambios en la eficacia de las conexiones se denomina plasticidad sináptica. Si bien esta hipótesis fue rechazada durante muchos años, trabajos posteriores demostraron que el aprendizaje se produce gracias al aumento de la fuerza en conexiones preexistentes de un número discreto de neuronas, es decir, en un circuito determinado (Kandel, 2001).

En apoyo a esta noción, ha sido ampliamente reportado que estructuras involucradas en diferentes tipos de memoria (como el hipocampo dorsal, diferentes zonas de la corteza o la amígdala) pueden experimentar un fenómeno de transmisión sináptica particular que se mantiene en el tiempo aún cuando ha finalizado el estímulo que la desencadena. Inicialmente se propuso, de manera similar a las ideas de Ramón y Cajal, que los cambios en la plasticidad sináptica producidos por la activación de las neuronas serían la base del almacenamiento de la información (Konorski, 1948). Posteriormente, Donald Hebb (1949) estableció que si dos neuronas se encuentran lo suficientemente cerca y una es capaz de excitar a la otra sostenidamente, se producen cambios en la conectividad entre ambas células de manera que esta se ve fortalecida. Finalmente, Bliss y Lomo (1973) observaron que la estimulación de alta frecuencia en una rebanada de hipocampo produce un marcado incremento en los potenciales excitatorios postsinápticos (PPEs) en una determinada población de neuronas, además, observó que este aumento en la excitabilidad se mantiene durante horas, lo cual supone la ocurrencia de eventos moleculares que sostienen este fenómeno. Por lo tanto, se definió a este proceso como potenciación a largo plazo (PLP). Numerosas evidencias posteriores demostraron la existencia de mecanismos comunes entre la generación de la PLP y los procesos de memoria (Bliss y Collingridge, 1993; McGaugh, 2000; Rogan y *col.*, 1997). En consecuencia, la PLP adquirió una gran aceptación como modelo celular experimental de los mecanismos que subyacen a los procesos de aprendizaje y memoria (Bear, 1996; Eichenbaum, 2003; Takeuchi y *col.*, 2014).

Sistemas de memoria

La noción de los sistemas de memorias proviene de observaciones experimentales y casos clínicos en los cuales se observa que la lesión de una región específica del cerebro puede afectar algunas funciones y tipos de memoria sin alterar otras funciones cognitivas.

Actualmente se acepta que los diferentes tipos de memoria están codificados por circuitos que involucran áreas específicas de la corteza en conexión recíproca con diversas áreas subcorticales (Thompson y Kim, 1996).

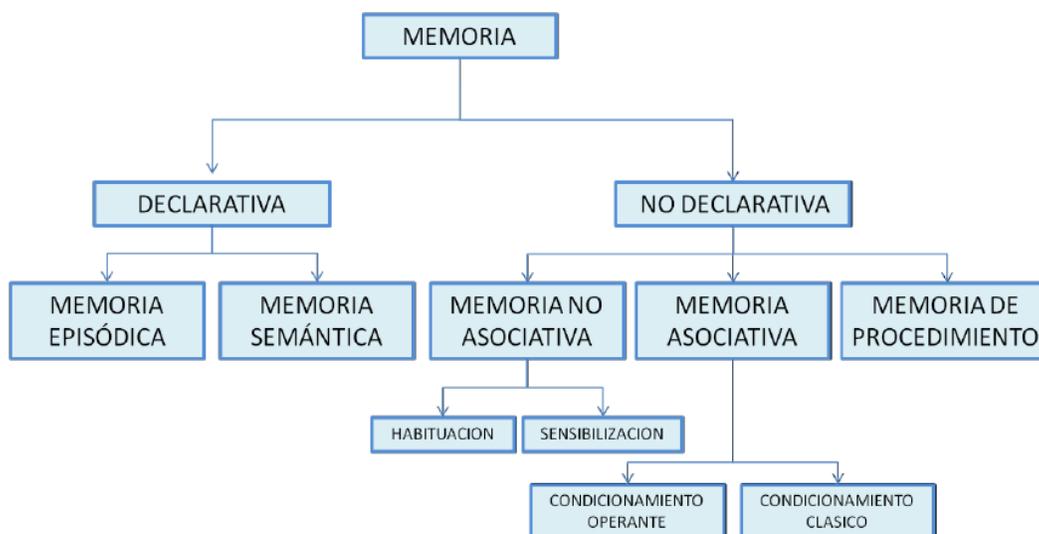


Figura 1. Clasificación de los tipos de memoria. Adaptado de Thompson and Kim, 1996.

La primera gran división entre los tipos de memoria consiste en separar aquellas que requieren una actividad consciente (memoria explícita o declarativa) y las que se expresan independientemente de un procesamiento consciente (memoria implícita o no declarativa). La **memoria declarativa** se divide a su vez en memoria episódica y semántica. La **memoria episódica o autobiográfica** recolecta información relativa a hechos personales como el primer día de clases o la etapa de escritura de la tesis doctoral. La **memoria semántica** almacena conocimientos abstractos y generales como la fórmula química del agua o la fecha de la declaración de la independencia argentina. Este tipo de memoria es procesada principalmente por el hipocampo, la corteza perirrinal y entorrinal entre otras (Squire y Zola-Morgan, 1991; Thompson y Kim, 1996) (Figura 1).

La **memoria implícita** se expresa a partir de la ejecución de una tarea y se divide en procedimental, no asociativa y asociativa. La **memoria de procedimiento** es aquella por la cual aprendemos a manipular herramientas o tocar un instrumento, estas actividades se perfeccionan con la práctica y se ejecutan sin necesidad de un registro consciente del movimiento de las manos o del cuerpo. La habituación y la sensibilización son formas de **memoria no asociativas**, la primera se define como una disminución en la respuesta ante la

presentación repetida de un estímulo, mientras la segunda implica un aumento en la respuesta. Además, la sensibilización suele manifestarse hacia otros estímulos de naturaleza diferente al que lo causó.

La **memoria asociativa** implica el establecimiento de una relación entre estímulos que son presentados con una contingencia espacial y temporal adecuada. Un ejemplo clásico de esta memoria es la respuesta de salivación estudiada por Iván Pavlov en perros que aprenden a asociar un estímulo auditivo con la llegada de alimento (Pavlov y Anrep, 1927). De esto deriva la definición de aprendizaje o condicionamiento pavloviano. También se puede producir la asociación entre una acción del individuo y un evento consecuente a esa acción, esto se conoce como condicionamiento operante (Skinner, 1975). Un claro ejemplo de esto es un animal entrenado para realizar una tarea motora a cambio de alimento como recompensa (Figura 1). En relación a estos tipos de aprendizajes asociativos, las estructuras involucradas comprenden a aquellas que controlan actividades motoras como el cuerpo estriado o el cerebelo, y de estructuras que procesan la información de relevancia emocional como la amígdala ó el núcleo accumbens.

Memoria emocional de miedo

Existe un consenso general en que los eventos de relevancia emocional (positivos o negativos) tienden a formar memorias robustas y persistentes en comparación con eventos con una carga emocional baja o nula (Roosendaal *y col.*, 2009). Definimos como respuestas emocionales a aquellas que se producen ante la exposición a estímulos de relevancia para la supervivencia del individuo, pudiendo ser estos estímulos favorables (alimento, comportamiento sexual) o amenazantes (presencia de un depredador, sequía) para la supervivencia. Particularmente, la respuesta emocional de miedo es inducida por situaciones que pueden representar una amenaza para la vida del individuo. Esta respuesta emocional posee un evidente carácter adaptativo ya que permite detectar y responder al peligro (LeDoux, 2000). La **memoria emocional** de miedo almacena esta información relacionada a los lugares o situaciones donde se ha desencadenado una respuesta de miedo, lo cual permite también la anticipación ante futuras situaciones de similares características. Si bien existe un constante debate en relación a si los animales (no humanos) poseen emociones, se ha demostrado que los circuitos que se activan ante la

presencia de estímulos amenazantes en una rata (olor a gato o shock eléctrico) o en una gacela (la presencia de un leopardo en la sabana) son muy similares a los que participan en la respuesta emocional de miedo en humanos (Janak y Tye, 2015) (Figura 2A). Más aún, se ha observado en monos que la lesión de estructuras que participan en el procesamiento del miedo conduce a una disminución de respuestas de tipo emocional, como el miedo a objetos novedosos. A su vez, se observa una disminución en la respuesta defensiva y una facilidad en la domesticación de estos animales normalmente agresivos (Weiskrantz, 1956). Resultados similares fueron observados en ratas, donde la lesión de ciertas estructuras impide el aprendizaje de la asociación entre una clave auditiva y un shock eléctrico (Blanchard y Blanchard, 1972). Asimismo, la disminución de la respuesta a estímulos emocionales también fue observada en el emblemático caso del paciente HM, al cual se le extirpó parte del lóbulo temporal para el tratamiento de su epilepsia refractaria (retomaremos este caso más adelante para describir un aspecto del procesamiento de la memoria). Todo este conjunto de evidencia nos permite establecer una correlación entre la respuesta a estímulos amenazantes observada en animales y la respuesta emocional de miedo observada en humanos.

Las estructuras cerebrales que participan en el procesamiento del miedo están comprendidas dentro del denominado sistema límbico, un conjunto de estructuras subcorticales conservadas a lo largo de la evolución y que procesan diferentes tipos de estímulos de relevancia emocional. A continuación detallaremos el rol de las principales estructuras que participan en la respuesta de miedo y en la formación de la memoria de miedo contextual, paradigma experimental que utilizaremos para abordar los objetivos de esta tesis.

- **Amígdala**

El nombre de esta estructura deriva del latín *amygdalus* por su forma similar a la de una almendra. La amígdala está ubicada en el lóbulo temporal medial y consta de un conjunto de núcleos interconectados (Figura 2). Si bien existen diferentes teorías sobre su origen y organización, actualmente se acepta que se divide anatómica y funcionalmente en el núcleo central, el cual deriva del sistema olfatorio, y el núcleo basolateral, formado a su vez por los

núcleos lateral, basal y accesorio basal. El complejo basolateral de la amígdala o amígdala basolateral (ABL) deriva de la neocorteza (LeDoux, 2007).

En cuanto a su conectividad, ABL recibe numerosos aferencias provenientes del tálamo y la corteza, a través de las cuales recibe información sensorial de diversos tipos, más específicamente, la información somatosensorial (visual, olfativa, auditiva, sabor e incluso el dolor) llega a la región lateral (ALa), mientras que la representación contextual proveniente del hipocampo es recibida por la región basal (ABa). Estas aferencias son en su mayoría de carácter excitatorio, cuya transmisión está mediada por el glutamato; a su vez estas activan a las neuronas glutamatérgicas que conforman la ABL, denominadas neuronas principales de proyección (NPP). Es importante remarcar que existen vías de transmisión rápidas, que principalmente provienen del tálamo sensorial, las cuales participan en la respuesta inmediata e inconsciente, mientras que aquellas vías que tienen un relevo en corteza, envían información más integrada y participan en el procesamiento consciente de la situación (Janak y Tye, 2015; LeDoux, 2007; LeDoux, 2000) (Figura 2B).

La información recibida por ABL es integrada y transmitida a la amígdala central (ACe), la cual está encargada de orquestar la expresión de la respuesta de miedo. De esta manera, sus proyecciones al hipotálamo, sustancia gris periacuedal y cuerpo estriado entre otras, regulan la respuesta de miedo favoreciendo la liberación de hormonas, el aumento del estado de alerta, la respuesta de congelamiento (“*freezing*”) o incluso la respuesta de escape (Izquierdo y col., 2016) (Figura 2B).

La comunicación entre ABL y ACe se produce principalmente a través de un grupo de interneuronas denominadas células intercalares (CI). Estas neuronas son de carácter inhibitorio y controlan los disparos de ACe, cuyas eferencias también son inhibitorias. Por lo tanto, la activación de ABL aumenta la transmisión inhibitoria de las CI sobre ACe. En consecuencia, ACe disminuye su transmisión inhibitoria sobre las estructuras que median la respuesta de miedo facilitando la expresión de la misma (LeDoux, 2007). No obstante, otros trabajos han establecido una división más detallada de la amígdala central, estableciendo que el principal sitio de salida de la información es la porción medial (CeM), la cual está sujeta a un control

inhibitorio por parte de la porción lateral (CeL). Sin embargo, esta subdivisión también contempla que la expresión de la respuesta de miedo se daría por una disminución del efecto inhibitorio sobre los componentes endócrinos, autonómicos y motores de la respuesta de miedo (Ciocchi y *col.*, 2010; Izquierdo y *col.*, 2016).

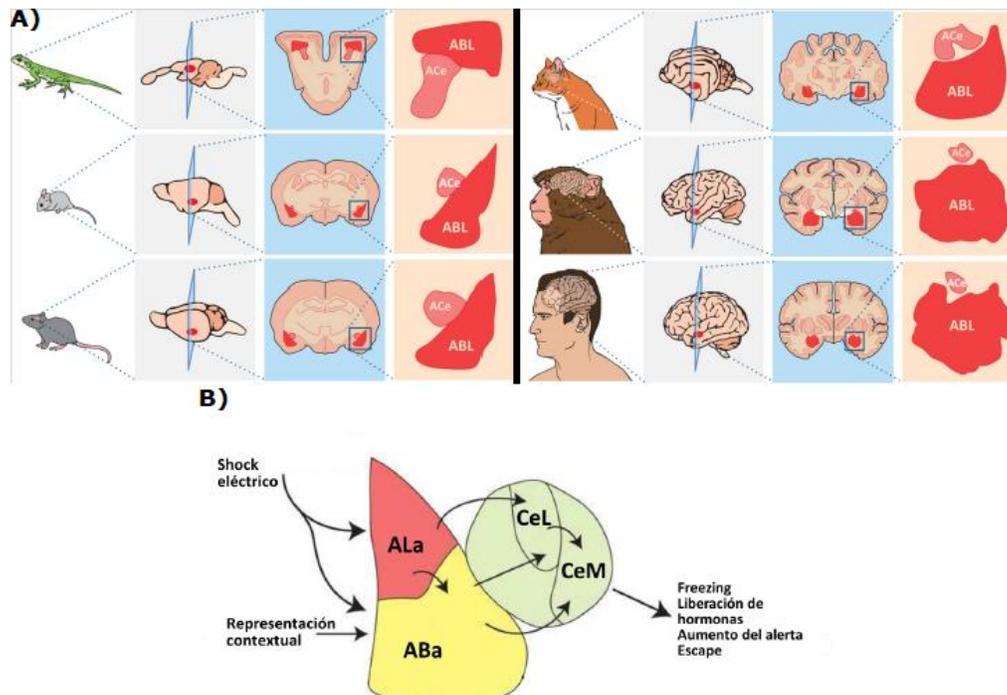


Figura 2. Anatomía y funcionalidad de amígdala. A). Localización anatómica de la amígdala en el cerebro de diferentes especies animales. Se observa la conservación de esta estructura que participa en el procesamiento de la información emocional a lo largo de la escala evolutiva. Adaptado de Janak y Tay, 2015. B) Organización anatómica del complejo amigdalino y procesamiento de la memoria de miedo contextual por parte de los diferentes subnúcleos. La información ingresa por el complejo basolateral, es integrada y enviada al complejo central. Este último envía la información a las estructuras que participan en la ejecución de la respuesta de miedo. Adaptado de Orsin y Maren (2012).

Finalmente, es importante remarcar que la ABL está sujeta a un fuerte control inhibitorio. Las NPP poseen conexiones con interneuronas locales de naturaleza GABAérgicas (por lo tanto inhibitorias), estas a su vez hacen sinapsis con las NPP, esto produce una retroalimentación inhibitoria la cual controla la respuesta de ABL ante estímulos poco relevantes (ver Figura 5A). Además, esta misma retroalimentación es la que media la habituación a estímulos que se presentan de manera repetida. Sin embargo, cuando alguno de estos estímulos (como por ejemplo un sonido o contexto) es asociado con información relevante (presencia de un depredador, shock eléctrico o un vehículo fuera de control) este control inhibitorio es superado facilitando el disparo de las NPP. En consecuencia, esto permite la asociación entre los

estímulos, el desencadenamiento de la respuesta de miedo apropiada e incluso el posible almacenamiento de la experiencia como una memoria a largo plazo (Bolshakov, 2009; LeDoux, 2007).

- **Hipocampo y Corteza Media Prefrontal**

La formación de una representación contextual es necesaria para que se establezca una asociación entre el contexto y el estímulo aversivo (Maren y *col.*, 2013). El hipocampo, principalmente en su región dorsal, cumple un rol fundamental en el procesamiento de esta información contextual, ya que a través de sus células de lugar (place cells) es capaz de codificar la representación espacial e integrarla con otra información sensorial (luminosidad, color de las paredes, textura del piso, etc) e incluso con la percepción temporal (Izquierdo y *col.*, 2016; Maren y *col.*, 2013).

Esta información es transmitida, como se expuso anteriormente, a la región basal del complejo amigdalino (Izquierdo y *col.*, 2016), permitiendo la integración de la representación contextual con la información de relevancia emocional. A su vez, el hipocampo dorsal recibe información proveniente de la amígdala, aunque no de manera directa sino a través de una vía indirecta que tiene como sitio de relevo a la corteza entorrinal (De Olmos y *col.*, 2004). Esta conexión bidireccional entre ambas estructuras indicaría una transmisión de información continua y recíproca durante la experiencia, lo cual determina una continua evaluación de la carga emocional de la situación en curso.

Otra estructura que conforma el circuito del miedo es la corteza media prefrontal (CmPf), la cual se divide en la porción prelímbica (PL) e infralímbica (IL). Brevemente, se ha observado que PL participa en la expresión de la memoria de miedo, mientras que IL participa en la adquisición de la memoria de extinción (Sierra-Mercado y *col.*, 2011), proceso que será explicado en una próxima sección.

Condicionamiento de miedo contextual

El condicionamiento de miedo contextual (CMC) es uno de los paradigmas experimentales más utilizados en el estudio de la memoria, el mismo consiste en generar una asociación entre un

contexto que inicialmente no representa amenaza alguna, con un shock eléctrico. Esta asociación con el shock (**estímulo incondicionado, EI**) le otorga carácter predictivo al contexto (en este caso **estímulo condicionado, EC**). Como resultado, la posterior exposición del animal al contexto de aprendizaje desencadena (incluso sin la presentación del shock) una respuesta condicionada de miedo producto de la memoria generada luego del aprendizaje. Como se expuso previamente, este tipo de memoria emocional es codificada por circuitos que comprenden, entre otras estructuras, al hipocampo dorsal, a ABL y la corteza prefrontal entre otras (Izquierdo y *col.*, 2016; LeDoux, 2000; Maren y Fanselow, 1995; Sanders y *col.*, 2003).

Fases de procesamiento de la memoria

Consolidación de la memoria

El proceso de almacenamiento de la memoria puede explicarse como la transición de una memoria de corto plazo (**MCP**), la cual se forma poco después del aprendizaje y que puede durar algunos minutos y una memoria de largo plazo (**MLP**) que puede durar desde días o meses hasta toda la vida del individuo (Hebb, 1949). El proceso que permite esta transición de MCP a MLP es denominado **consolidación de la memoria** (McGaugh, 2000) (Figura 3). La teoría de la consolidación proviene de un trabajo realizado en 1900 por Müller y Pilzecker (Dewar y *col.*, 2007) en el cual se demuestra que la memorización de una lista de sílabas que puede ser interferida si se presenta información adicional poco tiempo después de transcurrido el aprendizaje. Sin embargo, cuando la información adicional se presenta con un retardo temporal la modificación de la memoria no es observada. Esta evidencia fue reproducida años después en diferentes modelos animales donde se observa el fenómeno de interferencia retrógrada en animales utilizando diferentes tratamientos farmacológicos o incluso con shock electroconvulsivo aplicados poco tiempo después del aprendizaje (Duncan, 1949; McGaugh, 2000). Una noción similar fue propuesta por Donald Hebb (1949) postulando que el paso de MCP a MLP se produce por una estabilización de los circuitos que procesan esa información. En resumen, la teoría de la consolidación postula que a partir del aprendizaje se produce una memoria lábil que es susceptible a ser modificada, y que experimenta un proceso de estabilización el cual una vez finalizado conduce a una memoria estable e inmune a ser modificada, es decir, a una memoria consolidada.

Mecanismos moleculares del proceso de consolidación

Como se expuso previamente, los cambios en la plasticidad sináptica han sido propuestos como los responsables del almacenamiento de la memoria. Por lo tanto, se propone que el proceso de consolidación estaría dado por eventos moleculares similares a los observados durante la PLP. La liberación de glutamato durante el aprendizaje activa receptores glutamatérgicos, principalmente de tipo AMPA y NMDA. La activación de los últimos produce un significativo ingreso de Ca^{2+} , además del calcio aportado por los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs). Esto produce una activación de la Calcio-calmodulin quinasa (CaMK), así como de otras cascadas de segundos mensajeros, como proteinquinasa A (PKA) y protein quinasa C (PKC) con la consecuente activación de proteinquinas activadas por mitógenos (MAPK). Estas proteínas a su vez favorecen la activación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF κ B) y CREB (“*cAMP-responsive element binding protein*”), los cuales favorecen la expresión de diferentes proteínas como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), genes de expresión temprana como c-fos y Zif-268, así como otras proteínas necesarias para la estabilización funcional y estructural de los circuitos (Dudai, 2002; Kandel, 2001; Pape y Pare, 2010; Rodrigues *y col.*, 2004). Se ha demostrado que la administración de antagonistas de los receptores NMDA, la inhibición de las proteinquinas, la regulación negativa de los factores de transcripción o la administración de inhibidores de la síntesis proteica luego del aprendizaje interfieren el proceso de consolidación de la memoria (Abel y Lattal, 2001; Johansen *y col.*, 2011; McGaugh, 2000). Esto apoya la idea de que el proceso de consolidación está mediado por la ocurrencia de los eventos moleculares antes mencionados, que son necesarios para la estabilización de la MCP producida luego del aprendizaje (LeDoux, 2007).

Es importante destacar que el fenómeno antes descrito es concebido como consolidación sináptica, la cual se acepta que tiene una duración de varias horas. La consolidación sistémica hace referencia a un proceso mucho más lento que implica la migración de la información almacenada desde los circuitos que participaron en dicho almacenamiento hacia otras regiones del cerebro. Esta teoría deriva de la observación de pacientes con lesiones cerebrales o con intervenciones quirúrgicas. Tal es el caso del paciente HM, un paciente epiléptico al cual se le

extrajo parte del lóbulo temporal medial. Como consecuencia de la operación, el paciente experimentaba problemas para almacenar memorias nuevas (amnesia anterógrada) o para recordar memorias recientes (amnesia retrógrada), sin embargo, se observaba un deterioro menor en las memorias relativas a su infancia o a hechos ocurridos con mucha anterioridad a la lesión (Squire, 2009). Esto supone que la información se almacena inicialmente en ciertas estructuras, como por ejemplo en el hipocampo, pero con el paso del tiempo esta información es transferida a otros circuitos y estructuras como por ejemplo la neocorteza (Debiec y col., 2002). Finalmente, es importante remarcar que la **teoría de la consolidación** propone un modelo de **memoria estática**, es decir, una vez que la memoria ha sido consolidada permanece para siempre estable e inmune a ser manipulada.

Reconsolidación de la memoria

Otra de las implicancias de la teoría de la consolidación, es que concibe a la expresión de la memoria (por ejemplo cuando se hace un test para evaluar la expresión de la memoria) como una lectura “pasiva” de la información almacenada. Operativamente, la evocación de la memoria se produce mediante la exposición a claves asociadas a la experiencia inicial. Esto produce una activación de los circuitos que almacenan la información y se considera, por lo tanto, que se produce una reactivación de los circuitos. Si esa activación es adecuada, la memoria puede expresarse mediante un cambio en el comportamiento. Por lo tanto, desde esta perspectiva, resulta difícil pensar que la reactivación de los circuitos, lo cual podría desencadenar nuevos mecanismos de plasticidad, no establezca la posibilidad de que la memoria pueda experimentar cambios. En este sentido, hacemos uso de las palabras de Yadin Dudai (2002) respecto a los posibles efectos de la evocación de la memoria: *“la evocación no es una mera lectura pasiva de la información, sino que también es una experiencia; por lo tanto, una vez evocada la memoria es poco probable que permanezca exactamente igual”*.

Trabajos de la década del 60 reportaron un fenómeno denominado **“amnesia dependiente de claves”** (Misanin y col., 1968; Schneider y Sherman, 1968), en estos trabajos se observó que una memoria consolidada puede volver a ser modificada si se aplica electroshock convulsivo luego de la evocación de la misma. Trabajos posteriores aportaron evidencias de que, de manera similar a lo observado luego del aprendizaje, la memoria podía ser modificada si se

presentaba información novedosa luego de su evocación (Gordon, 1977). Este conjunto de evidencias condujo a una reconsideración de las propiedades dinámicas de la memoria, en efecto, se propuso que la memoria puede existir en dos estados, activo o inactivo dependiendo del uso o del reposo de la información almacenada (Figura 3). Además, se propuso que la memoria puede experimentar cambios durante la fase activa (Lewis, 1979).

Aunque esta nueva concepción de las propiedades de la memoria no tuvo mucha repercusión, en el año 2000 recobró interés a partir de un trabajo en el que se demuestra que la traza de la memoria es nuevamente vulnerable al efecto de un inhibidor de la síntesis de proteínas cuando es aplicado inmediatamente después de la evocación de la memoria (Nader y *col.*, 2000). Esta evidencia, sumada a otros trabajos que conducían a similares conclusiones (Przybylski y *col.*, 1999; Sara, 2000), revitalizó la idea de que la evocación de la memoria puede inducir un nuevo estado de labilidad, el cual requiere de un proceso de reestabilización, denominado **reconsolidación** (Figura 3); no obstante, en la presente tesis nos referimos a este proceso como **labilización/reconsolidación** por razones que serán abordadas posteriormente. A partir de esto, este fenómeno fue reportado utilizando diferentes especies, modelos experimentales y tipos de memoria, así como con diferentes tratamientos como la administración de antagonistas de receptores, presentación de información novedosa, inactivación de proteinquinasas entre otros (Nader y Hardt, 2009). Incluso, trabajos de nuestro laboratorio demostraron la interferencia de la reconsolidación de una memoria de miedo contextual mediante la administración de Midazolam (MDZ), un agente farmacológico que potencia la transmisión GABAérgica, luego de la evocación de dicha memoria (Bustos y *col.*, 2006; 2009).

La teoría de la reconsolidación, si bien no es totalmente excluyente con la teoría de la consolidación, se opone a esta última en el hecho de que concibe a **la memoria como un proceso dinámico** y que permite la modificación de la misma a partir de las experiencias sucesivas; esto le confiere a este proceso un evidente valor adaptativo, a su vez que abre una puerta a un nuevo campo de interrogantes y expectativas respecto al rol funcional de la reconsolidación, a los mecanismos subyacentes, así como al posible uso de la reconsolidación como una estrategia terapéutica para el tratamiento de memorias traumáticas.

Mecanismos moleculares subyacentes al proceso de labilización/reconsolidación

Antes de establecer los mecanismos moleculares involucrados en este proceso, es necesario primero dividirlo en dos etapas consecuentes, la fase de labilización (desestabilización) y la fase de reconsolidación (reestabilización).

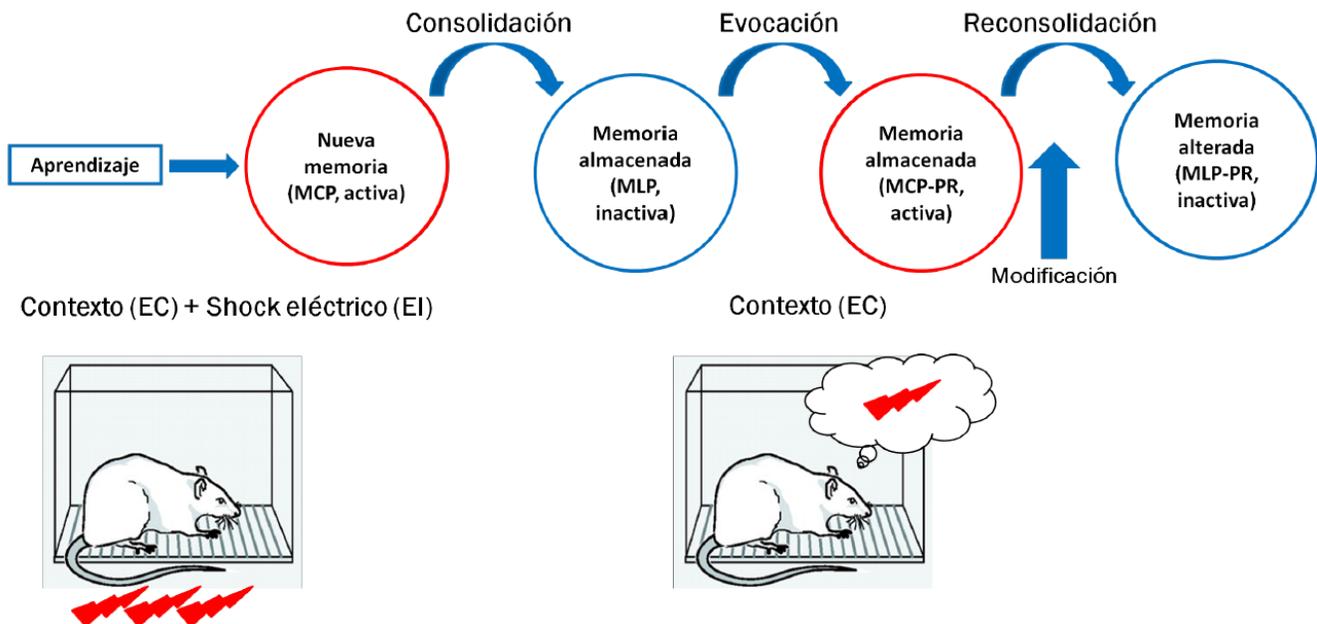


Figura 3. Fases de procesamiento de la memoria. Durante el aprendizaje se establece una relación de contingencia entre el contexto (estímulo condicionado, EC) y el shock eléctrico (estímulo incondicionado, EI). Esa información almacenada como memoria de corto plazo (MCP) es estabilizada mediante el proceso de consolidación y es almacenada como una memoria de largo plazo (MLP). Durante la evocación, esa MLP puede entrar en un nuevo estado de labilidad, transformándose en una memoria de corto plazo post evocación (MCP-PE); en este punto, la memoria puede incorporar información novedosa. Finalmente, esta información en estado lábil se almacena como memoria de largo plazo post evocación (MLP-PE) a través del proceso de reconsolidación. Este proceso puede ser interferido conduciendo a un déficit en la retención de la memoria. Adaptado de Knapska y col.(2007).

Labilización

Ha sido reportado que diversos tratamientos previos a la sesión de reexposición pueden prevenir la interferencia de la memoria. Más específicamente, el antagonismo de receptores NMDA que contienen la subunidad NR2B (Ben Mamou y col., 2006; Milton y col., 2013), el bloqueo de VGCCs, el antagonismo de receptores cannabinoides CB1(Suzuki y col., 2004), la inhibición de la degradación proteica (Lee, 2008) y el bloqueo del tráfico de receptores AMPA (Hong y col., 2013) previenen el efecto de agentes interferentes como los inhibidores de síntesis de proteínas. Por lo tanto, se argumenta que los eventos antes mencionados participan en la desestabilización de la memoria (Finnie y Nader, 2012; Flavell y col., 2013). A

continuación se profundizará brevemente en algunos de los eventos antes mencionados, dado que fueron motivo de evaluación de la presente tesis (.

- Receptores NMDA

El receptor glutamatérgico NMDA consiste de un tetrámero conformado por dos copias de la subunidad NR1 (ó GluN1) y dos copias de la subunidad NR2 (ó GluN2). La subunidad NR1 es obligatoria para la funcionalidad del receptor y contiene en su estructura al sitio de unión a glicina, co-agonista obligatorio para la activación del receptor; además, este sitio también puede ser activado por d-cicloserina (DCS) (Kim y *col.*, 2005). La subunidad NR2 se divide a su vez en cuatro subgrupos (NR2A, NR2B, NR2C y NR2D), las cuales contienen el sitio de unión de glutamato y además confieren características al receptor como su permeabilidad al calcio o la cinética de apertura (Groc y *col.*, 2009; Loftis y Janowsky, 2003). La subunidad NR2B ha sido particularmente asociada al proceso de labilización; desde un enfoque farmacológico se ha observado que la administración de ifenprofil (antagonista selectivo de la subunidad NR2B) en ABL previo a la reactivación de la memoria previene el efecto interferente del inhibidor de la síntesis de proteína anisomicina (Ben Mamou y *col.*, 2006; Milton y *col.*, 2013), Además, se ha observado que memorias resistentes al efecto interferente de anisomicina exhiben una menor expresión de la subunidad NR2B en ABL (Wang y *col.*, 2009). A su vez la activación de receptores que contienen esta subunidad promueve la degradación de proteínas y la depotenciación de las sinápsis (Hardingham y *col.*, 2002), eventos que también han sido sugeridos como factores críticos en la desestabilización de la memoria. Por lo tanto, la actividad de los receptores NMDA que contienen la subunidad NR2B sería uno de los primeros eventos que disparan el proceso de labilización (Figura 4).

- Poliubiquitinación de proteínas-degradación de proteínas

El sistema ubiquitina proteosoma (SUP) es uno de los principales mecanismos de degradación proteica en todas las células. Brevemente, las proteínas destinadas a degradación son “etiquetadas” mediante la unión covalente de unidades de ubiquitina (Ub). La adición de una cadena de 4 o más residuos de Ub implica la mayor señalización hacia la degradación, particularmente si los residuos de Ub están unidos unos a otros en la posición Lisina-48 (Lys-

48). Finalmente, estas proteínas poliubiquitinadas son degradadas por el proteosoma, una macromolécula con actividad proteolítica, generando fragmentos peptídicos a partir de las proteínas iniciales (Fioravante y Byrne, 2011; Lip y *col.*, 2017). Se ha observado que la administración de inhibidores de la actividad del proteosoma previene el efecto interferente de diferentes agentes farmacológicos (Lee y *col.*, 2008; Sol Fustinana y *col.*, 2014). A su vez, el mismo tratamiento es capaz de impedir la actualización de la memoria (Lee, 2010), mecanismo mediado por la desestabilización/reestabilización de la memoria. Además, se ha observado que la evocación de una memoria induce un aumento en la poliubiquitinación de proteínas tanto en el ABL como en hipocampo (Jarome y *col.*, 2011; Lee y *col.*, 2008), así como de la actividad proteolítica del proteosoma (Jarome y *col.*, 2016). Este conjunto de evidencia indicaría que este fenómeno también participaría críticamente en la fase de desestabilización de la memoria (Finnie y Nader, 2012; Flavell y *col.*, 2013; Hegde, 2017; Jarome y Helmstetter, 2013) (Figura 4).

En resumen, existe un gran conjunto de evidencia que apoya la idea de que la labilización de la memoria condice con una desestabilización funcional y estructural, dada por la degradación de proteínas y por la depotenciación de la sinapsis (Bonin y De Koninck, 2015).

Reestabilización

El hecho de que la inhibición de la síntesis de proteínas interfiera con el proceso de reconsolidación, indica que este evento es necesario para la reestabilización de la memoria que ha sido desestabilizada previamente. En cuanto a los mecanismos moleculares que subyacen esta fase del proceso, se ha observado que el bloqueo de los receptores NMDA luego de la reactivación interfiere con la reestabilización de la memoria (Lee y *col.*, 2006). Asimismo, ha sido reportado la participación de factores de transcripción como CREB (Hall y *col.*, 2001b; Kida y *col.*, 2002) y de NFκB (Merlo y *col.*, 2005). En relación a éste último, la regulación negativa de NFκB interfiere con la reconsolidación (de la Fuente y *col.*, 2011). Además, la inhibición de la actividad de proteinquinasas como PKA (Tronson y *col.*, 2006) o ERK (Duvarci y *col.*, 2005) interfiere con la reestabilización. A continuación se detallará la

participación Zif-268 en el proceso de reconsolidación, dado que esta proteína fue objeto de estudio en la presente tesis.

- Zif-268

Zif-268 (también conocido como Egr-1) es un factor de transcripción (FT) perteneciente al grupo de genes de expresión temprana; en este sentido, es un indicador de actividad celular como los factores de transcripción de las familias de cFos o cJun. Respecto a su rol como FT, posee un dominio de unión al ADN del tipo “dedo de zinc”. A partir de la interacción con el ADN regula la expresión de genes que participan en la plasticidad sináptica y en la degradación de proteínas (James *y col.*, 2005; Veyrac *y col.*, 2014). Numerosos trabajos han demostrado la participación de Zif-268 en la reconsolidación de la memoria, tanto en memorias de miedo auditivas como contextuales, y en estructuras como el ABL e hipocampo (Besnard *y col.*, 2013; Diaz-Mataix *y col.*, 2013; Hall *y col.*, 2001a; Machado *y col.*, 2015). Particularmente, Johnatan Lee (2004) propone un modelo de doble disociación en memoria de miedo contextual, ya que demuestra la participación específica de BDNF hipocampal en el proceso de consolidación pero no en el de reconsolidación, mientras que Zif-268 hipocampal participa en la reconsolidación pero no en la consolidación (Lee *y col.*, 2004; Lee y Hynds, 2013). Además, se ha demostrado un aumento en la expresión de Zif-268 en ABL luego de la reactivación de memorias tanto auditivas (Diaz-Mataix *y col.*, 2013; Maddox *y col.*, 2011) como contextuales (Hall *y col.*, 2001a). Este conjunto de evidencia destaca no solo la participación de Zif-268 en el proceso de reconsolidación, sino también el posible uso de este FT como un marcador específico de este proceso (Figura 4). Es importante destacar que, si bien el término “reconsolidación” sugiere que este proceso es una recapitulación fiel de la consolidación y que se ha observado que ambos procesos comparten ciertos mecanismos, existen características distintivas de cada uno de ellos, como el requerimiento diferencial de moléculas antes mencionado (Lee *y col.*, 2004). Otro ejemplo de diferenciación es el requerimiento de C/EBP β en hipocampo para la consolidación pero no para la reconsolidación de una memoria de evitación inhibitoria. Por el contrario, la actividad de este FT en amígdala no es necesaria para la consolidación pero si para la reconsolidación de la misma memoria (Tronel *y col.*, 2005). En este caso la diferencia no solo se encuentra en las moléculas, sino también, en las estructuras

que participan en cada fase de procesamiento de la memoria. Estas y otras evidencias apoyan la idea de que el proceso de reconsolidación no es una recapitulación exacta del proceso de consolidación (Alberini, 2005).

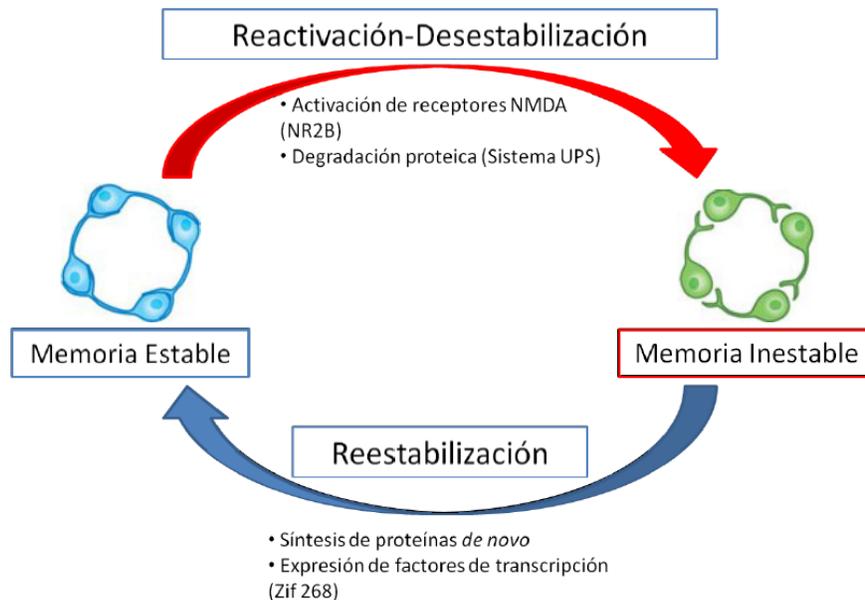


Figura 4. Proceso de labilización/reconsolidación de la memoria. La evocación de la memoria puede desencadenar el proceso de labilización, proceso mediado por la activación de receptores NMDA que contienen la subunidad NR2B y la degradación proteica entre otros fenómenos. Esto conduce a un “desarmado de las conexiones sinápticas”. La memoria en estado lábil es reestabilizada por el proceso de reconsolidación, el cual es dependiente de la síntesis de proteínas y de factores de transcripción. Esto conduce a un fortalecimiento de las sinápsis y a la reestabilización de la conectividad de los circuitos involucrados. Adaptado de Rudy, (2008).

Finalmente es necesario destacar que, así como la fase de desestabilización se caracteriza por una depotenciación y un “desarmado” de la sinapsis, la fase de reconsolidación implica la síntesis de nuevas proteínas y la ocurrencia de mecanismos de potenciación sináptica que favorecen la reestabilización estructural y funcional de los circuitos (Bonin y De Koninck, 2015) (Figura 4).

Rol funcional del proceso de labilización/reconsolidación

Existen dos hipótesis preponderantes referidas al rol funcional de este proceso, las cuales no son mutuamente excluyentes; por el contrario, estas pueden ser complementarias. Por un lado, se propone que la desestabilización y reestabilización de la memoria puede conducir a un fortalecimiento de la misma. Numerosos trabajos han demostrado el fortalecimiento de una memoria luego de una breve reexposición que conduce al proceso de labilización/reconsolidación; este fortalecimiento puede evidenciarse por una mejora en la

performance (Fukushima y *col.*, 2014; Lee, 2008), una mayor persistencia (Frenkel y *col.*, 2005) y una menor susceptibilidad a la interferencia (Inda y *col.*, 2011). Además, se propone que una vez que la memoria ha llegado a una asíntota de expresión, el fortalecimiento ya se encuentra en un techo. Este fortalecimiento permitiría responder mejor ante situaciones similares que puedan presentarse en el futuro.

La segunda hipótesis sugiere que la desestabilización/reestabilización permite la actualización. Se ha observado que la información novedosa durante la reexposición puede incorporarse a la memoria original (Lee, 2009); esta idea es consistente con el hecho de que la situación de evocación suele ser diferente a la del aprendizaje original, por lo cual puede resultar útil incorporar la información novedosa disponible a los fines de mantener la relevancia de la memoria y mejorar su capacidad predictiva (Haubrich y Nader, 2016; Lee, 2008; 2010). Finalmente, en un intento por unir ambas hipótesis, se postula que el proceso de labilización/reconsolidación puede permitir simultáneamente el fortalecimiento y la actualización (De Oliveira Alvares y *col.*, 2013; Forcato y *col.*, 2014; Forcato y *col.*, 2010).

Es lógico pensar que si este proceso tiene como objetivo la modificación del contenido de la memoria, la presencia de información novedosa favorecería la ocurrencia del mismo. Bajo este razonamiento, la información novedosa puede producir una discrepancia entre la expectativa basada en la información almacenada y lo que realmente ocurre en la experiencia en curso (Lee, 2009; Wang y Morris, 2010). Respecto a esta discrepancia, se asume que ante la reexposición a las claves del aprendizaje el individuo espera que se repita la experiencia original. No obstante, si la experiencia en curso difiere de la original se establece un error de predicción (Pedreira y *col.*, 2004). El cumplimiento de este error de predicción facilita la ocurrencia de los mecanismos que permiten la desestabilización de la memoria con el objeto que esta pueda ser actualizada, o incluso interferida. Se argumenta que la detección de alteraciones temporales, así como el procesamiento atencional son fundamentales en la detección de estas discrepancias (Exton-McGuinness y *col.*, 2015). Se ha reportado que la inactivación farmacológica del área tegmento ventral (VTA), uno de los principales núcleos de neuronas dopaminérgicas previene la desestabilización y la posterior interferencia de una memoria apetitiva (Reichelt y *col.*, 2013). Esta y otras evidencias demuestran la participación

de la transmisión dopaminérgica de ATV en la detección del error de predicción y en la consecuente desestabilización de la memoria (Flavell y *col.*, 2013).

Condiciones limitantes a la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación

Si bien el proceso de labilización ha sido demostrado en numerosos modelos animales y en diferentes tipos de memoria tanto apetitivas como aversivas, existen condiciones bajo las cuales este proceso aparentemente no ocurre o su ocurrencia se encuentra limitada (Alberini, 2005; Nader y Hardt, 2009; Tronson y Taylor, 2007). A continuación se detallarán algunos de los parámetros que condicionan la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación (Haubrich y Nader, 2016):

Fuerza del entrenamiento: Ha sido reportado que memorias formadas a partir de un entrenamiento fuerte son menos susceptibles a la interferencia luego de su evocación (Eisenberg y *col.*, 2003; Suzuki y *col.*, 2004; Wang y *col.*, 2009; Winters y *col.*, 2009).

Edad de la memoria: Aquellas memorias remotas, es decir que se han formado hace mucho tiempo presentan una vulnerabilidad menor a ser interferidas luego de su evocación (Baratti y *col.*, 2008; Bustos y *col.*, 2009; Eisenberg y Dudai, 2004; Frankland y *col.*, 2006; Haubrich y *col.*, 2015; Milekic y Alberini, 2002; Suzuki y *col.*, 2004)

Tiempo de reactivación: Se ha observado que un tiempo de reactivación muy corto no permite la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación (Alfei y *col.*, 2015; Bustos y *col.*, 2009; Lagasse y *col.*, 2009). Por el contrario, reactivaciones muy prolongadas conducen al proceso de extinción (Alfei y *col.*, 2015), el cual se define como un nuevo aprendizaje opuesto a la memoria original (el contexto o la señal auditiva no predicen la llegada del shock eléctrico). Esto produce una disminución de la respuesta original, aunque no afecta el almacenamiento de la memoria original. Por el contrario, la memoria original puede aparecer tiempo después por la exposición al contexto o la clave auditiva (recuperación espontánea), por la presentación del estímulo incondicionado (reinstalación) o por la presentación del estímulo condicionado en otro contexto, en caso de claves discretas como un tono auditivo (Eisenberg y *col.*, 2003; Mamiya y *col.*, 2009; Pedreira y Maldonado, 2003; Perez-Cuesta y Maldonado, 2009).

Información novedosa: Como se expresó anteriormente, la disponibilidad de información novedosa puede favorecer la ocurrencia del proceso de labilización. Por el contrario, si la situación de evocación es muy similar a la del aprendizaje original, disminuye la probabilidad de que ocurra el proceso de labilización/reconsolidación (Diaz-Mataix y *col.*, 2013; Forcato y *col.*, 2009; Pedreira y *col.*, 2004). Se ha reportado que las memorias formadas por sesiones repetidas de aprendizaje o evocadas repetidamente van incorporando la información disponible. Si dicha información no cambia en las reactivaciones sucesivas, ya no se establece el error de predicción y por lo tanto la memoria ya no es desestabilizada (Rodriguez-Ortiz y *col.*, 2005). Nuevamente, estas evidencias apoyan la idea de que la violación de la expectativa (cumplimiento del error de predicción) favorece la desestabilización de la memoria (Sevenster y *col.*, 2012; 2013; 2014)

Si bien estos factores podrían impedir la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación, es necesario enfatizar el hecho de que estas limitaciones no son absolutas. Es decir, que es posible que una memoria que no sea desestabilizada bajo ciertos parámetros, pueda serlo bajo otros parámetros de evocación más efectivos. Por ejemplo, las memorias fuertes pueden ser labilizadas bajo un protocolo de evocación más largo (Frankland y *col.*, 2006; Suzuki y *col.*, 2004). Asimismo, se ha demostrado que un cambio en la textura del piso favorece la desestabilización de una memoria de reconocimiento de objeto. Sin embargo, esto no ocurre cuando no se introduce este cambio en el contexto (Winters y *col.*, 2009). Es decir, que estos factores interaccionan unos con otros de manera que los parámetros necesarios para la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación pueden variar en función de las características de cada memoria en particular (edad, fuerza de entrenamiento, disponibilidad de información novedosa, etc).

Estrés

Hoy en día estamos acostumbrados a escuchar o leer cotidianamente el término “estrés” y concebirlo como una especie de situación que amenaza el bienestar de las personas y su relación con el resto de la sociedad. De hecho, el término estrés tiene sus orígenes posiblemente en el latín o en el francés antiguo (*stresse*), que significa presión o tensión. No obstante, desde la perspectiva de la neurociencia, es necesario establecer una definición más relacionada a las

posibles causas del estrés, los factores que intervienen y las consecuencias que este fenómeno puede tener en los individuos.

Las primeras definiciones de estrés hacen referencia a estímulos o situaciones que pueden alterar la homeostasis. El término homeostasis fue acuñado por Canon (1935), haciendo referencia a los mecanismos que tienden a mantener los sistemas biológicos equilibrados dentro de ciertos parámetros (presión sanguínea, temperatura, nivel de glucosa en sangre, etc), y cuando estos mecanismos fallan pueden aparecer las enfermedades. Poco tiempo después, Selye (1936) describió al síndrome de adaptación generalizado como la manifestación fisiológica y conductual en respuesta a estímulos nocivos, caracterizada por el aumento del estado de alarma, hipertrofia adrenal y erosión de la pared estomacal. Observó además que esta respuesta era la misma aún aplicando diferentes estímulos. A partir de esto se comenzó a diferenciar entre el agente causante del estrés, denominado estresor, y las consecuencias de la exposición ó respuesta de estrés (Selye, 1936).

No obstante, esta concepción del estrés como un “estímulo que altera la homeostasis” resulta excesivamente amplia, al punto de considerar como estrés a cualquier cambio en algún parámetro fisiológico; por ejemplo, en este momento estoy sentado escribiendo estas líneas, si me levanto apresuradamente de la silla se produce una disminución en la presión arterial debido al cambio de posición corporal, la cual es rápidamente restablecida por el sistema nervioso autónomo. Sin embargo, lejos está este cambio de ser considerado estrés. Por tal razón, este concepto fue cuestionado, siendo necesario encontrar una definición más precisa (Levine y Ursin, 1991; McEwen y Wingfield, 2003; Romero y *col.*, 2009).

En el año 1952, Richard Lazarus estableció la necesidad de considerar los aspectos cognitivos del individuo frente a un estímulo estresor como un factor de variabilidad en la respuesta a dicho estímulo (Lazarus y *col.*, 1952). Otro concepto que se incorporó fue el de alostasis (Sterling y Eyer, 1988) que implica lograr un nuevo equilibrio luego de un cambio (literalmente alostasis es “estabilidad a través del cambio”). Sin embargo este mecanismo de reajuste del equilibrio puede fallar ante estímulos intensos o duraderos. Se considera por lo tanto que la situación posee una carga alostática; esto implica una mayor tensión aplicada sobre el sistema,

y en consecuencia, un mayor desgaste (McEwen y Wingfield, 2003). A la concepción de los factores cognitivos propuesta por Lazarus se sumaron las de Levine y Ursin (1991), estableciendo que el estrés debe ser considerado como un proceso que incluye el estímulo, la percepción del estímulo así como la respuesta comportamental y fisiológica.

La evolución y revisión de estos conceptos a través de los años derivó en la concepción del estrés como una percepción de la pérdida de predictibilidad y de controlabilidad ante una situación determinada (Koolhaas y *col.*, 2011). En este sentido, la impredecibilidad se manifiesta mediante la ausencia de una respuesta anticipatoria, mientras que la falta de control se evidencia por un retardo en el restablecimiento del equilibrio.

Respuesta de estrés

En relación a los mediadores que participan en la respuesta de estrés, se pueden nombrar a las catecolaminas circulantes liberadas por el sistema nervioso autónomo y las hormonas del eje hipotalámico-hipófiso-adrenal (EHHA) (Baumann y Turpin, 2010). La actividad simpática durante una situación de estrés produce una liberación de adrenalina y noradrenalina desde la médula adrenal. A su vez la activación del EHHA produce la liberación de factor liberador de corticotrofina (CRF), adenocorticotrofina (ACTH) y corticosteroides. A nivel central también se produce liberación de noradrenalina (NA) por actividad del *locus coeruleus* (LC) y de serotonina por actividad de los núcleos de rafe; otros mediadores que participan en la respuesta de estrés son la hormona hipotalámica arginina-vasopresina (AVP), la hormona α -melanocito estimulante (α MSH) y la β -endorfina. En general, estos mediadores inducen un aumento en el estado de alerta, un redireccionamiento del consumo de energía hacia los procesos más necesarios en ese momento y participan en la ejecución de la respuesta de lucha o huida.

La activación del LC induce un aumento en la liberación de monoaminas a nivel central, principalmente NA, la cual se dispersa a diversas áreas del cerebro, incluidas aquellas que participan en el procesamiento de la memoria como el hipocampo y la amígdala (Fanselow y Gale, 2003; Maren, 2001), ejerciendo sus efectos a través de sus receptores β -adrenérgicos (McGaugh, 2000; McGaugh y Roozendaal, 2002). Asimismo, el bloqueo de estos receptores en

la amígdala ejerce un efecto deletéreo sobre la formación de la memoria (Roozendaal y *col.*, 2009).

En relación a los corticoides, estos ejercen su efecto a través de receptores de tipo mineralocorticoides (MRs) y glucocorticoides (GRs). Estos receptores, si bien están distribuidos en diversas partes del cerebro, pueden encontrarse en estructuras como el hipocampo y el septum lateral. Los glucocorticoides actúan a través de los MRs y GRs regulando directamente la transcripción génica, no obstante, se pueden observar efectos no genómicos mediados por receptores de membrana, pudiendo de esta manera regular la liberación de glutamato y de GABA, y en consecuencia alterar el balance excitación/inhibición, a partir de la síntesis local de endocannabinoides (Hill y McEwen, 2009).

Si bien el aumento en la liberación de corticoides es comúnmente utilizado como un indicador de respuesta al estrés, es necesario remarcar que algunos estímulos de naturaleza apetitiva también pueden inducir liberación de corticoides. Por ejemplo, tanto la derrota como la victoria social inducen niveles comparables de corticosterona en ratas. Más aún, la conducta sexual genera también niveles comparables de corticosterona (Bonilla-Jaime y *col.*, 2006; Bronson y Desjardins, 1982; Koolhaas y *col.*, 2011). Por lo tanto, un aumento en la liberación de corticoides no siempre es indicativo de una situación estresante.

Finalmente, es necesario considerar que la respuesta de estrés tiene un valor adaptativo, ya que prepara al individuo para responder mejor ante determinados estímulos amenazantes. No obstante, niveles altos y sostenidos de estrés también pueden generar un perjuicio en la vida de los individuos. Es decir que, en tanto se perciba una mayor falta de control y predicción, y más sostenida en el tiempo sea esta percepción, más severas serán las consecuencias de la exposición al estímulo amenazante.

Influencia del estrés sobre la memoria

Dado que el estrés puede impactar en el funcionamiento de las estructuras que participan en el procesamiento de la memoria de miedo, resulta obvio pensar que las diferentes fases de la memoria pueden estar afectadas por la exposición a eventos estresantes. Existe numerosas evidencias de que el estrés puede afectar los procesos de memoria (Martijena y Molina, 2012;

Meir Drexler y Wolf, 2016; Roozendaal y *col.*, 2009). Particularmente, estudios de nuestro laboratorio han demostrado que, mientras que un protocolo de CMC débil es incapaz de generar por si solo una memoria observable en un test de retención posterior, una sesión de estrés 24 horas antes de este condicionamiento promueve la formación de una memoria que se expresa un día después y que persiste al menos 5 días en un segundo test de retención (Maldonado y *col.*, 2014; Maldonado y *col.*, 2011). Resultados similares se observaron cuando el estrés es administrado un día antes de la evocación de memorias formadas por un entrenamiento débil (Giachero y *col.*, 2013a; Giachero y *col.*, 2013b). En función de estos resultados, es importante destacar que la falta de expresión de la memoria no siempre es indicativo de que no haya habido un proceso de almacenamiento. Por otro lado, cuando el estrés es aplicado antes de un entrenamiento más robusto, induce una memoria que exhibe una aparente resistencia a la extinción (Rodríguez Manzanares y *col.*, 2005). Asimismo, se ha observado un aumento del comportamiento de tipo ansiedad 24 hs después de la exposición al estrés (Bignante y *col.*, 2010; Maldonado y *col.*, 2014; Martijena y *col.*, 2002).

Cabe destacar que ABL tiene un rol crítico tanto en la formación de la memoria de miedo como en el comportamiento de tipo ansiedad, por lo cual resulta lógico pensar que el estrés puede inducir cambios en la funcionalidad de ABL. En relación a esto, se ha observado que el estrés induce un aumento en la excitabilidad en ABL, evidenciado por una disminución en el umbral necesario para generar LTP. Esta hiperexcitabilidad está dada por una disminución en el control inhibitorio mediado por la transmisión GABAérgica en dicha estructura (Isoardi y *col.*, 2007; Rodríguez Manzanares y *col.*, 2005) (Figura 5).

Brevemente, el GABA (ácido γ -amino butírico) es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central y ejerce sus efectos en parte a través del receptor GABA-A, receptor ionotrópico permeable al ión Cl^- . Dicho receptor puede ser a su vez modulado alostéricamente por benzodiazepinas, las cuales aumentan la frecuencia de apertura del canal de cloruro y la afinidad del receptor por el GABA. Para que este grupo de drogas pueda ejercer su efecto, deben unirse al sitio de benzodiazepina, ubicado en la unión de las subunidades α y γ que conforman el receptor. Se ha observado que el estrés induce una disminución en las corrientes de Cl^- y una disminución en la unión de benzodiazepinas al receptor GABA-A (Martijena y

col., 1997; Martijena y *col.*, 2002), así como una disminución en el ARN mensajero de la subunidad α_1 (Liu y Glowa, 2000).

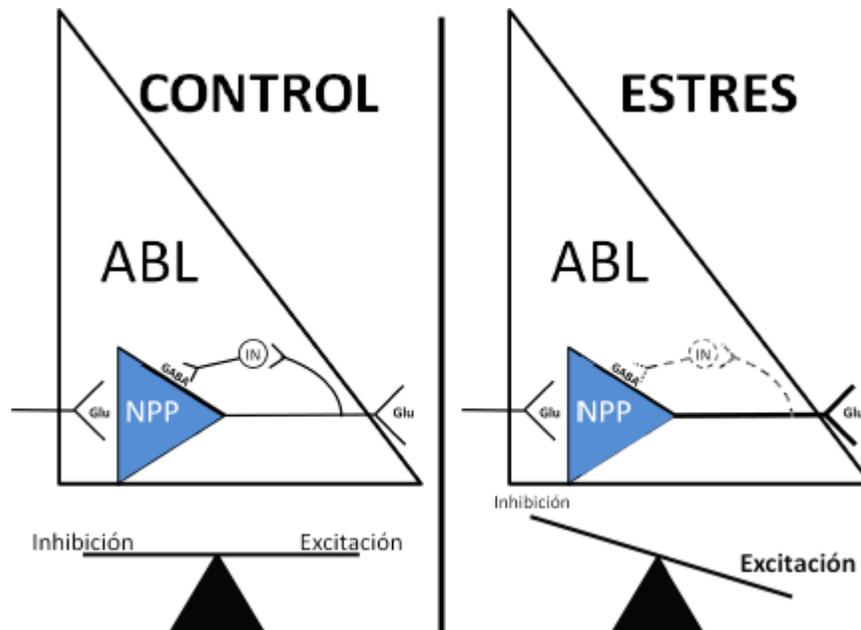


Figura 5. Efecto del estrés sobre el control inhibitorio de ABL. La exposición al estrés disminuye el control inhibitorio GABAérgico sobre las neuronas principales de proyección (NPP); esto incrementa la excitabilidad de ABL facilitando la inducción de PLP. A su vez, facilita la formación de memorias de miedo y aumenta el comportamiento de tipo ansiedad. Adaptado de Martijena y Molina, (2012).

En concordancia con esta evidencia, se ha observado que la administración sistémica o intra-ABL de MDZ previene los efectos promotores del estrés observados tanto a nivel de la formación de memoria y del comportamiento de tipo ansiedad, como en la hiperexcitabilidad de ABL (Giachero y *col.*, 2013a; Maldonado y *col.*, 2011; Rodríguez Manzanares y *col.*, 2005). Asimismo, la administración intra-ABL de bicuculina, antagonista competitivo del receptor GABA-A, mimetiza los efectos del estrés observados a nivel de comportamiento y de la excitabilidad de dicha estructura (Giachero y *col.*, 2015; Rodríguez Manzanares y *col.*, 2005). En resumen, los efectos promotores del estrés sobre la formación de la memoria y el comportamiento de tipo ansiedad coinciden con un aumento en la excitabilidad de ABL y una disminución en la transmisión GABAérgica en dicha estructura (Martijena y Molina, 2012).

Trabajos de nuestro laboratorio han demostrado que la reconsolidación de la memoria puede ser interferida por la administración sistémica de MDZ luego de la evocación de la memoria (Bustos y *col.*, 2006; 2009). Sin embargo, el estrés previo a la formación de la memoria induce resistencia al efecto interferente de MDZ sobre la reconsolidación (Bustos y *col.*, 2010).

Adicionalmente, esta resistencia puede ser revertida por la administración de D-cicloserina, un agonista del sitio de glicina del receptor NMDA, previo a la reactivación (Bustos y *col.*, 2010) .

Como se ha expuesto previamente, existen condiciones que limitan la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación, esto puede evidenciarse por una resistencia a la interferencia luego de su evocación. Bajo esta perspectiva, la formación de la memoria bajo un estado de estrés parece limitar la posterior desestabilización de la memoria cuando es evocada. Asimismo, la activación de los receptores NMDA es un evento necesario para la desestabilización de la memoria (Ben Mamou y *col.*, 2006; Milton y *col.*, 2013); por lo tanto, el hecho de que la administración de DCS revierta la resistencia de la memoria a ser interferida indicaría que DCS está favoreciendo la desestabilización de dicha memoria resistente. En conclusión, esta última evidencia indicaría que el estrés al momento de la formación de la memoria puede significar un factor limitante para las propiedades dinámicas de la memoria.

Relevancia clínica

A partir del resurgimiento de la teoría de la reconsolidación (Nader y *col.*, 2000), se generaron grandes expectativas respecto a la modulación de este proceso como estrategia terapéutica. Más aún, se ha argumentado que la interferencia de la reconsolidación presenta más ventajas que la potenciación de la extinción dado que la primera estrategia terapeutica minimizaría la probabilidad de la recuperación espontánea. De manera que en los últimos años se han realizado (y se realizan hasta la actualidad) numerosos trabajos en humanos, aún con las limitaciones metodológicas y farmacológicas que esto implica (Beckers y Kindt, 2017; Kindt y *col.*, 2014; Kroes y *col.*, 2016; Nader, 2015; Schiller y Phelps, 2011; Torregrossa y Taylor, 2016).

Particularmente, muchos estudios se enfocaron en estudiar la posibilidad de interferir memorias traumáticas, tales como fobias, trastornos de ansiedad y desórdenes de estrés postraumático. Sin embargo, en muchas ocasiones no se considera que estas memorias suelen ser robustas y persistentes; dado que en general se forman durante situaciones de carga emocional extrema (guerra, accidente automovilístico o exposición a un predador en un entorno natural). En consecuencia, estas memorias pueden perder flexibilidad (es decir sus propiedades dinámicas)

y ser resistentes a la interferencia. Por lo tanto, resulta imperativo profundizar en los mecanismos que determinan la resistencia de una memoria a experimentar el proceso de labilización/reconsolidación, así como los posibles tratamientos que puedan revertir la resistencia al favorecer la desestabilización de la memoria bajo parámetros de evocación en los que normalmente no ocurriría dicho fenómeno.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Como se expuso previamente, una memoria consolidada puede ingresar a un nuevo estado de inestabilidad luego de su evocación, siendo necesario un proceso de reestabilización subsecuente denominado reconsolidación (Alberini, 2005; Lee, 2009; Nader y Hardt, 2009). Este proceso de labilización/reconsolidación permite el fortalecimiento y/o la actualización de la memoria; asimismo, la reestabilización de la memoria puede ser interferida mediante la administración de agentes farmacológicos como inhibidores de la síntesis de proteínas (Nader y *col.*, 2000) ó benzodiazepinas (Bustos y *col.*, 2006), entre otros.

Sin embargo, no siempre que una memoria es evocada ocurre el proceso de labilización/reconsolidación. Ha sido ampliamente reportado que factores como la fuerza del entrenamiento, el tiempo transcurrido desde el aprendizaje, la disponibilidad de información novedosa durante la evocación, la duración de la misma y la ocurrencia de un error de predicción determinan la vulnerabilidad de la memoria a la ocurrencia del proceso antes mencionado. Las condiciones bajo las cuales no se produce la desestabilización de la memoria son conocidas como condiciones limitantes (Alberini, 2005; Haubrich y Nader, 2016).

Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la exposición a un evento estresante un día antes de un protocolo de CMC disminuye la vulnerabilidad de la memoria a ser interferidas por la administración de MDZ luego de su evocación (Bustos y *col.*, 2010), sugiriendo que el estrés previo a la formación de la memoria induce resistencia a la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación. No obstante, la evidencia comportamental debe ser complementada con la evaluación de mecanismos moleculares que pueden participar en la desestabilización y la reestabilización de la memoria.

Por otro lado, numerosos trabajos han demostrado el impacto del estrés sobre la transmisión GABAérgica del complejo basolateral de la amígdala (ABL), estructura críticamente implicada en la memoria de miedo. La exposición al estrés induce un aumento en la excitabilidad de ABL por disminución de la transmisión GABAérgica inhibitoria, siendo este efecto el responsable del aumento del comportamiento de tipo ansiedad, la facilitación en la formación de la memoria y la disminución en el umbral para inducir PLP en ABL (Martijena y Molina, 2012; Martijena y *col.*, 2002; Rodríguez Manzanares y *col.*, 2005). En concordancia con estas

evidencias, la potenciación de la transmisión GABAérgica mediante la administración sistémica o intra-ABL de midazolam (MDZ) antes de la exposición al estrés previene los efectos antes mencionados (Giachero y *col.*, 2013a; Maldonado y *col.*, 2011). Asimismo, los efectos del estrés sobre la memoria, el comportamiento de tipo ansiedad y la PLP son mimetizados por la administración intra-ABL de un antagonista de receptores GABA-A (Giachero y *col.*, 2015; Rodriguez Manzanares y *col.*, 2005). Sin embargo, resulta necesario evaluar si la modulación de la transmisión GABAérgica en ABL participa en la resistencia inducida por estrés a la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación en una memoria de miedo.

Finalmente, se ha demostrado que la resistencia inducida por estrés es revertida por la administración sistémica de D-cicloserina (DCS), un modulador alostérico positivo del receptor NMDA, previo a la evocación de la memoria (Bustos y *col.*, 2010). Esta evidencia concuerda con diversos trabajos que demuestran la participación de los receptores NMDA en la desestabilización de la memoria (Ben Mamou y *col.*, 2006; Milton y *col.*, 2013). Por lo tanto, resulta necesario complementar esta evidencia evaluando las consecuencias a nivel comportamental y neurobiológico de la administración tanto sistémica como intra-ABL de DCS.

Objetivo general: Por lo expuesto anteriormente, y por la relevancia clínica de aportar evidencias sobre las condiciones que pueden favorecer la desestabilización de memorias traumáticas, el objetivo general de este trabajo fue *evaluar los factores neurobiológicos que definen la resistencia inducida por estrés de la memoria de miedo a iniciar el proceso de labilización/reconsolidación; así como evaluar tratamientos farmacológicos que induzcan la labilización luego de la evocación de una memoria emocional consolidada y resistente.*

Hipótesis de trabajo: La presente tesis se basa en la hipótesis general de que *el estado emocional del individuo al momento de la formación de la memoria, y por ende la carga emocional de la experiencia de aprendizaje, determina la posterior ocurrencia de los mecanismos subyacentes al proceso de labilización/reconsolidación. En otras palabras, se propone que la carga emocional es un factor determinante de las propiedades dinámicas de la*

memoria. Además, sugerimos que el impacto del estrés sobre la transmisión GABAérgica de ABL es un factor crucial en la generación de la resistencia y que la administración de DCS, además de revertir dicha resistencia a nivel comportamental, podría favorecer la ocurrencia de los mecanismos involucrados en el proceso de labilización/reconsolidación.

A partir del objetivo principal, se definieron los siguientes objetivos específicos:

Objetivo Específico 1: Caracterizar, desde una perspectiva comportamental y neurobiológica, la memoria resistente al proceso de labilización/reconsolidación inducida por estrés previo al condicionamiento.

Objetivo Específico 1.1: Reproducir el modelo de memoria resistente inducida por estrés al efecto interferente de MDZ sobre la reconsolidación.

Objetivo Específico 1.2: Evaluar la expresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA en ABL luego de la evocación de la memoria en animales con y sin estrés previo.

Objetivo Específico 1.3: Evaluar la expresión de proteínas poliubiquitinadas en ABL luego de la evocación de la memoria en animales con y sin estrés previo.

Objetivo Específico 1.4: Estudiar la expresión del factor de transcripción Zif-268 en ABL luego de la evocación de la memoria en animales con y sin estrés previo.

Objetivo Específico 2: Evaluar el impacto de la modulación GABAérgica en ABL sobre la resistencia de la memoria al proceso de labilización/reconsolidación.

Objetivo Específico 2.1: Reproducir el modelo de memoria resistente inducida por estrés al efecto interferente de MDZ sobre la reconsolidación en animales sometidos a cirugía estereotáxica en ABL.

Objetivo Específico 2.2: Estudiar la influencia de la administración intra-ABL de MDZ previo al estrés sobre la resistencia al efecto interferente de MDZ.

Objetivo Específico 2.3: Evaluar la influencia de la administración intra ABL de MDZ previo al estrés sobre la resistencia al efecto interferente de PROP.

Objetivo Específico 2.4: Evaluar la influencia de la administración intra-ABL de BIC previo al condicionamiento sobre la resistencia al efecto interferente de MDZ.

Objetivo Específico 3: Estudiar la reversión farmacológica de la resistencia de la memoria a la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación

Objetivo Específico 3.1: Estudiar el efecto de la administración sistémica de DCS sobre la resistencia de la memoria al efecto interferente de MDZ.

Objetivo Específico 3.2: Estudiar el efecto de la administración intra-ABL de DCS sobre la resistencia de la memoria al efecto interferente de MDZ.

Objetivo Específico 3.3: Evaluar el efecto de la administración sistémica de DCS sobre la expresión de Zif-268 en BLA luego de la evocación de la memoria en animales con y sin estrés previo.

Objetivo Específico 3.4: Estudiar el impacto de la administración sistémica de DCS sobre la resistencia inducida por BIC intra-ABL al efecto interferente de MDZ.

METODOS

Animales

Para este estudio se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 60 días de edad (280 a 320 g al comienzo del experimento), provistos por el bioterio del Departamento de Farmacología-Instituto de Farmacología Experimental Córdoba (IFEC-CONICET), de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ), de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Los animales fueron alojados en cajas plexiglás (30 x 45 x 18 cm) en grupos de 2 a 4 individuos por cajas, con agua y alimento disponible en todo momento. La habitación de alojamiento se mantuvo en un ciclo luz/oscuridad de 12 horas (ciclo de luz de 07:00 a 19:00) y a una temperatura de 21-23 °C. Los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité de Cuidado de Animales de la FCQ-UNC, y son consistentes con las normas establecidas en la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (National Institutes of Health-NIH). Todos los animales fueron habituados a la manipulación durante tres días previos al comienzo de los experimentos. Es importante señalar que se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar la cantidad de animales utilizados y el sufrimiento de los mismos. Todos los experimentos de comportamiento fueron realizados en el rango horario comprendido entre 10:00 y 14:00 h.

Estrés por inmovilización

Los animales fueron transportados a una habitación de experimentación, donde fueron inmovilizados durante 30 minutos bajo luz intensa provista por una lámpara de 100W (Grupo E). Para tal fin, se utilizaron inmovilizadores plásticos adecuados al tamaño y a la forma del animal, los cuales impiden el movimiento del animal pero permiten la respiración normal. Una vez finalizada la sesión de estrés, los animales fueron devueltos a su caja, permaneciendo 30 minutos adicionales en la pieza de experimentación antes de volver a la habitación de alojamiento. Este protocolo ha sido ampliamente utilizado en numerosos trabajos de nuestro laboratorio (Giachero y *col.*, 2013a; Maldonado y *col.*, 2011; Rodríguez Manzanares y *col.*, 2005). Los animales controles fueron llevados a una zona de experimentación distinta, donde permanecieron el mismo tiempo que los animales estresados antes de ser devueltos a la habitación de alojamiento (Grupo NE).

Condicionamiento de miedo contextual (CMC)

El dispositivo de condicionamiento consiste en una caja de plexiglás con tres paredes blancas, una de color negro y techo transparentes (20 x 23 x 20 cm). El piso de la caja consta en una grilla de acero inoxidable, con 10 barras de 1,5 mm de diámetro y separadas una de otra 1,5 cm. Dicha grilla está conectada a un generador de shock eléctrico. La iluminación del cuarto fue provista por una lámpara de 60 W ubicada en el techo, el ruido de fondo provino del ventilador del generador de shock. Entre cada animal, la caja se limpió con una solución de alcohol al 50%. A continuación se detallan las diferentes etapas del CMC y los parámetros utilizados en este trabajo:

Condicionamiento: Cada animal fue colocado en la caja de condicionamiento, y se permitió la libre exploración durante 3 minutos, a continuación, se administraron 3 shocks de 0,5 mA de 3 segundos de duración y a un intervalo de 30 segundos entre cada uno. Una vez finalizado el último shock, el animal permaneció 50 segundos adicionales. Luego de esto, el animal retornó a la caja de alojamiento. Para aquellos animales sometidos a la cirugía estereotáxica, la intensidad de shock utilizada fue de 0,65 mA, dado que la canulación crónica puede disminuir los niveles de la respuesta de miedo (Blanchard y Blanchard, 1969).

Reactivación (ó evocación): Un día después del condicionamiento, los animales fueron expuestos al contexto de aprendizaje durante 5 minutos sin recibir shock eléctrico (Grupo R). En los experimentos con animales no reactivados (grupo NR) los mismos permanecieron en su caja de alojamiento hasta el momento del sacrificio o del test.

Test: Un día después de la reactivación, los animales se colocaron nuevamente en el contexto de condicionamiento durante 10 minutos sin recibir el shock eléctrico (Test 1). Un segundo test (Test 2) fue realizado una semana posterior al test 1 con el objetivo de evaluar la persistencia de los posibles cambios en el comportamiento.

En cada una de las etapas se midió la respuesta de congelamiento ("*freezing*"), el cual es ampliamente utilizado como un indicador de miedo y se define como la inmovilidad total del animal exceptuando los movimientos asociados a la respiración. El mismo fue expresado como porcentaje del tiempo total que el animal permaneció en el contexto.

Cirugía estereotáxica

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina y xilacina (55 mg/kg y 11 mg/kg respectivamente) y colocados en un aparato estereotáxico (Stoelting). La barra de los incisivos se colocó a -3,3 mm para asegurar que la cabeza tenga un posicionamiento horizontal. Se realizó una apertura en el cuero cabelludo y se recortaron la aponeurosis y el periostio. Una vez que se expuso y se limpió el cráneo, se tomaron las coordenadas de bregma y se determinó la posición del complejo basolateral de la amígdala (ABL, AP: -2,8; L: \pm 4,9; DV: -6,1). Las coordenadas utilizadas fueron consultadas en el atlas de coordenadas estereotáxicas del cerebro de rata (Paxinos y Watson, 2009). Se realizaron perforaciones en el cráneo para el implante de las cánulas guías (calibre 22 G; 12 mm de longitud). Las mismas se fijaron con cemento acrílico y con un tornillo de relojería anclado al cráneo. Para prevenir el ingreso de partículas contaminantes, se colocaron tapas de cánulas fijadas al cemento. Una vez finalizada la cirugía, el animal fue retirado y colocado en una caja con viruta limpia donde fue continuamente supervisado hasta su recuperación. Los animales recibieron una inyección subcutánea de penicilina y estreptomina para disminuir el riesgo de contraer infecciones. Los animales tuvieron un período de recuperación de 5-7 días, durante el cual fueron habituados al procedimiento de infusión.

Infusión intracraneal y procedimiento histológico

Al momento correspondiente en cada experimento, se retiraron los tapones de las cánulas y se insertaron inyectores (calibre 30 G; 14 mm de longitud) conectados mediante tubos de polietileno (PE 10, Becton Dickinson, MD) a microjeringas de 10 μ l (Hamilton, Reno, NV) montadas a una bomba de infusión (Cole-Parmer). La velocidad de infusión fue de 0,25 μ l/min. Una vez finalizada la infusión, el inyector permaneció introducido un minuto adicional para permitir la correcta difusión de las drogas.

Luego de finalizados los experimentos, los animales fueron sacrificados, sus cerebros removidos y colocados en una solución de paraformaldehído al 4% durante al menos 72 hs para la fijación del tejido. Se realizaron cortes coronales de 60 μ m y se observaron bajo lupa para la confirmación del sitio de infusión. Solo los animales sin daño tisular y con una correcta

infusión bilateral fueron incluidos en el análisis de datos. Las imágenes representativas del sitio de infusión se obtuvieron con un microscopio confocal (Fluoview FV1200, Olympus) o mediante captura con una cámara digital desde el lente de una lupa 4X (Figura 6).

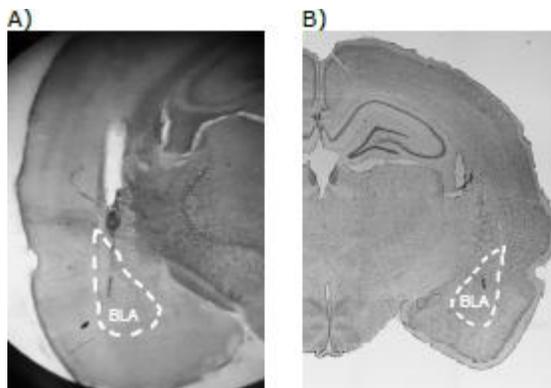


Figura 6. Imágenes representativas del sitio de infusión en animales sometidos a cirugía estereotáxica. Se observa el sitio de llegada del inyector a diferentes zonas del ABL. A) Imagen obtenida por captura digital desde una lupa con aumento 4X. B) Imagen obtenida por microscopio confocal.

Drogas y administración

Todas las drogas fueron disueltas en solución salina estéril (SAL, NaCl 0,9 % p/v).

Midazolam (MDZ, Gobbi Novag, Arg), agonista del sitio de benzodiazepinas del complejo receptor GABA-A, fue utilizado a una concentración de 3 mg/ml y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para administración intraperitoneal (i.p.) e intracraneal respectivamente. Dosis final: 3mg/kg i.p.; 0,5 ug/lado intra-ABL.

D-cicloserina (DCS, Sigma-Aldrich), modulador alostérico positivo del complejo receptor NMDA, Se utilizó a una concentración de 15 mg/ml para la administración i.p. La concentración utilizada para la administración intracraneal fue de 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Dosis final: 15 mg/kg i.p.; 10 ug/lado intra-ABL.

Propranolol (PROP, Sigma Aldrich), antagonistas de receptores adrenérgicos tipo β , fue administrado i.p. a una concentración de 10 mg/ml. Dosis final: 10 mg/kg.

Bicuculina metaiodato (BIC, Fluka-Sigma Aldrich), antagonista competitivo del receptor GABA-A, fue administrado intracranealmente a una concentración de 40 pmoles/ μl . Dosis final: 10 pmol/lado.

Para la administración i.p. se inyectó un volumen de solución con droga de 1 ml/kg o un volumen equivalente de SAL en los animales controles. La administración intracraneal se realizó a un volumen de 0.25 µl/lado de la droga o un volumen equivalente de SAL en los grupos controles.

Disección de ABL y extracción de proteínas totales

Los animales fueron sacrificados por decapitación, e inmediatamente después el cerebro fue removido y colocado en una matriz de disección sobre hielo (Stoelting). Se efectuaron cortes coronales de 2 mm de los cuales se extrajo la ABL. Para la disección se utilizó como referencia el atlas de coordenadas estereotáxicas (Paxinos y Watson, 2009). La disección de tejido enriquecido en ABL se realizó mediante el uso de un sacabocados de 2 mm de diámetro.

Las estructura disecada fue colocada en buffer de lisis a 4°C (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico (HEPES) 25 mM; NaCl 0,5M; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM; dihidrotreitol (DTT) 1 mM; Nonidet-P40 (NP40) 0,1%) con inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo(PMSF) 1 mM; leupeptina 10ug/ml; aprotinina 10 ug/ml; pepstatina 1ug/ml) e inhibidor de fosfatasas (ortovanadato de sodio (Na₃VO₄) 1mM). Luego, las muestras se homogeneizaron por ultrasonido (5 pulsos de 3 segundos). Los homogenizados fueron centrifugados durante 2 minutos a 20.000 x g y los sobrenadantes obtenidos se almacenaron a -70 °C hasta el momento de su uso. La concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Bradford a partir de una alícuota del sobrenadante.

Western Blot

Los sobrenadantes obtenidos se combinaron con 1/3 de su volumen de buffer de muestra 4X (Glicerol 50%; dodecil sulfato de sodio (SDS) 4%; Tris 125 mM; DTT 400 mM; azul de bromofenol 0,02%), y se calentaron a 70°C durante 10 minutos. Las muestras resultantes fueron resueltas en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Luego se transfirieron a membranas de polivinildeno (PVDF). Las membranas fueron bloqueadas con 5% de albúmina sérica bovina ó leche descremada en buffer TTBS (Tris 50 mM pH: 7,5; NaCl 150 mM; Tween 20 0,1%), según correspondiese, durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez bloqueadas, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4° C. Al día

siguiente, las membranas se lavaron con TTBS durante 15 minutos (3 lavados de 5 minutos) y fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados de 5 minutos, se procedió al revelado de las membranas mediante la reacción de quimioluminiscencia aumentada (ECL) y captura películas de rayos X (con el posterior escaneo de los mismos) ó mediante la obtención de imágenes digitales con el scanner Odyssey (LICOR) dependiendo de la proteína en estudio. Con el objeto de realizar un control de carga de las muestras se realizó la cuantificación de proteínas estructurales, tales como actina y tubulina. Las películas y las imágenes obtenidas fueron procesados con el programa de análisis de imágenes Gel-Pro analyzer. Con el propósito de estandarizar los valores de intensidad entre los distintos revelados, la densidad óptica (DO) de cada banda se dividió por la intensidad total de cada placa ó imagen. Posteriormente la DO normalizada de cada banda fue relativizada a la DO de su respectiva proteína control. Finalmente, los datos fueron expresados como DO de la proteína en estudio /DO proteína control.

A continuación se detallan algunas especificaciones metodológicas para cada proteína estudiada:

GluN2B

Concentración del gel: 7,5%

Proteínas sembradas: 15 µg

Solución de bloqueo: BSA al 5% en TTBS

Anticuerpo primario: Rabbit Anti GluN2B (1:750, Cell Signaling Technology)

Anticuerpo Secundario: Donkey Anti Rabbit, (1:2000, IRDye® 800 WC)

Anticuerpo primario, proteína control: Mouse Anti Tubulina (1:2500, Sigma-Aldrich)

Anticuerpo secundario: Donkey Anti Mouse (1:2000, IRDye® 800 WC)

Revelado: Oddysey

Zif-268 (Egr-1)

Concentración del gel: 10%

Proteínas sembradas: 40 µg

Solución de bloqueo: BSA al 5% en TTBS

Anticuerpo primario: Rabbit Anti Zif-268 (1:500, Santa Cruz Biotechnology)

Anticuerpo Secundario: Donkey Anti Rabbit unido a peroxidasa (1:2500, Cell Signaling Technology)

Anticuerpo primario, proteína control: Mouse Anti Actina (1:1000, Sigma-Aldrich)

Anticuerpo secundario: Donkey Anti mouse unido a peroxidasa (1:2500, Cell Signaling Technology)

Revelado: ECL

Ub-Lys 48

Concentración del gel: 7,5%

Proteínas sembradas: 40 µg

Solución de bloqueo: leche descremada al 5% en TTBS

Anticuerpo primario: Anti Ub-lys48, Rabbit (1:500. Merk-Millipore)

Anticuerpo Secundario: Donkey Anti Rabbit unido a peroxidasa (1:2500, Cell Signaling Technology)

Anticuerpo primario, proteína control: Mouse Anti Actina(1:1000, Sigma-Aldrich)

Anticuerpo secundario: Donkey Anti mouse unido a peroxidasa (HRP-linked, 1:2500, Cell Signaling Technology)

Revelado: ECL

Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media (E.E.M.). Los datos se analizaron con el programa estadístico STATISTICA, se utilizó el test t de Student ó el análisis de varianza (ANOVA factorial de 2 ó 3 factores) dependiendo la cantidad de grupos a comparar. En el caso que existieran interacciones entre los factores, se utilizó el test de comparación post hoc Newman Keuls a los fines de determinar diferencias significativas (nivel de significancia: $p < 0,05$). La homogeneidad de varianza de los datos se evaluó mediante el test de Levene. Dependiendo el experimento analizado, los factores de comparación fueron: Condición (E vs NE); Pretratamiento (MDZ vs SAL; BIC vs SAL; DCS vs SAL); Reactivación (R vs NR); Tratamiento (MDZ vs SAL; PROP vs SAL; DCS vs SAL).

PROCEDIMIENTOS Y

RESULTADOS

Capítulo 1: Caracterización de la memoria resistente al proceso de labilización/reconsolidación inducida por estrés previo al condicionamiento. Evidencia conductual y molecular.

INTRODUCCION

Como se mencionó anteriormente, la exposición a un evento estresante previo al condicionamiento de miedo promueve la formación de memorias robustas y persistentes. Particularmente, el estrés previo a un condicionamiento de miedo contextual es capaz de generar memorias resistentes a ser interferidas por la administración de MDZ luego de su evocación (Bustos y *col.*, 2010). Este fenómeno puede deberse a una limitación en la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación que habitualmente se desencadena luego de que la memoria es evocada. No obstante, para sustentar esta hipótesis, resulta necesario demostrar la ausencia de los mecanismos subyacentes al proceso de labilización/reconsolidación en memorias resistentes inducidas por estrés.

Numerosos trabajos han demostrado que la iniciación de la fase de labilización es dependiente de diferentes eventos y cascadas de señalización en la ABL, tales como la activación de los receptores NMDA que contienen la subunidad NR2B, la activación de receptores canabinoides, la actividad de GVCCs y la degradación proteica por acción del SUP (Finnie y Nader, 2012; Flavell y *col.*, 2013; Haubrich y Nader, 2016).

La fase de reestabilización (reconsolidación) se caracteriza por la síntesis de diferentes proteínas de importancia estructural y funcional para la neurona. El factor de transcripción Zif-268 ha sido postulado como un marcador específico del proceso de reconsolidación en el hipocampo, como así también se ha demostrado su aumento en ABL luego de la evocación de memorias de miedo auditivas y contextuales (Veyrac y *col.*, 2014).

Por lo antes mencionado, y por la participación de ABL en el procesamiento de la memoria de miedo (Baldi y Bucherelli, 2015; LeDoux, 2007; Milton y *col.*, 2008a; Milton y *col.*, 2008b), en este capítulo nos propusimos estudiar posibles cambios en la expresión en ABL de moléculas que podrían ser consideradas marcadores del proceso de labilización, como la subunidad NR2B y las proteínas poliubiquitinadas, luego de la evocación de la memoria. Bajo la misma línea de razonamiento, evaluamos la expresión de Zif-268 como un posible marcador de la fase de reestabilización.

Nuestra hipótesis de trabajo supone que los posibles cambios moleculares observados luego de la reactivación de la memoria en los animales controles no se observarían en memorias resistentes generadas por estrés, lo cual indicaría la falta de ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación en estas últimas.

Objetivo específico 1.1. Evaluar el efecto interferente de MDZ sobre el proceso de reconsolidación en memorias resistentes. Revalidación del modelo.

El modelo de resistencia inducido por estrés ha sido establecido en trabajos previos de nuestro laboratorio (Bustos y *col.*, 2010). No obstante, con el objetivo de replicar dicho modelo y de sentar las bases comportamentales de los próximos experimentos, nos propusimos reproducir este modelo con algunas modificaciones respecto al esquema experimental realizado por Bustos y *col.* Para tal fin, los animales fueron divididos en dos grupos, uno de ellos recibió una sesión de estrés (Grupo E), el grupo restante permaneció en la sala de experimentación sin manipulación alguna (Grupo NE). Un día después, los animales fueron sometidos al condicionamiento de miedo contextual. Veinticuatro horas después, los animales fueron colocados nuevamente en la caja de condicionamiento durante cinco minutos sin recibir shock eléctrico (sesión de reactivación), luego, recibieron una inyección i.p. de SAL o MDZ y fueron devueltos a su caja. Uno y 8 días posteriores, los animales fueron colocados en la caja de condicionamiento durante 10 minutos para evaluar el comportamiento de “*freezing*” (Test 1 y Test 2). Los grupos resultantes fueron: NE/SAL (n= 6), NE/MDZ (n= 7), E/SAL (n= 6) y E/MDZ (n= 6).

Resultados

Durante la reactivación, no se observaron diferencias en los niveles de congelamiento entre los grupos NE (n= 13) y E (n= 12) [$t= 0,35$; $p > 0,05$] (Figura 7B). Al momento del Test 1 se observó una disminución en el porcentaje de “*freezing*” en el grupo NE/MDZ, por el contrario, esta disminución no fue observada en el grupo E/MDZ. El análisis ANOVA reveló un efecto significativo de la condición [$F(1,21)= 19,76$; $p < 0,01$], del tratamiento [$(1,21)= 21,89$; $p < 0,01$] y una interacción significativa entre la condición y el tratamiento [$(1,21)= 18,3$; $p < 0,01$]. El test post hoc confirmó que los niveles de “*freezing*” del grupo NE/MDZ fueron

significativamente menores en relación a los grupos restantes ($p < 0,01$). Durante el Test 2 se observó el mismo patrón de resultados. El ANOVA reveló un efecto significativo de la condición [$F(1,21) = 7,15$; $p < 0,01$], del tratamiento [$(1,21) = 5,02$; $p < 0,01$] y una interacción entre estos factores [$(1,21) = 17,26$; $p < 0,01$]. El test post hoc confirmó una disminución significativa en el grupo NE/MDZ comparado con los grupos restantes ($p < 0,01$) (Figura 7C).

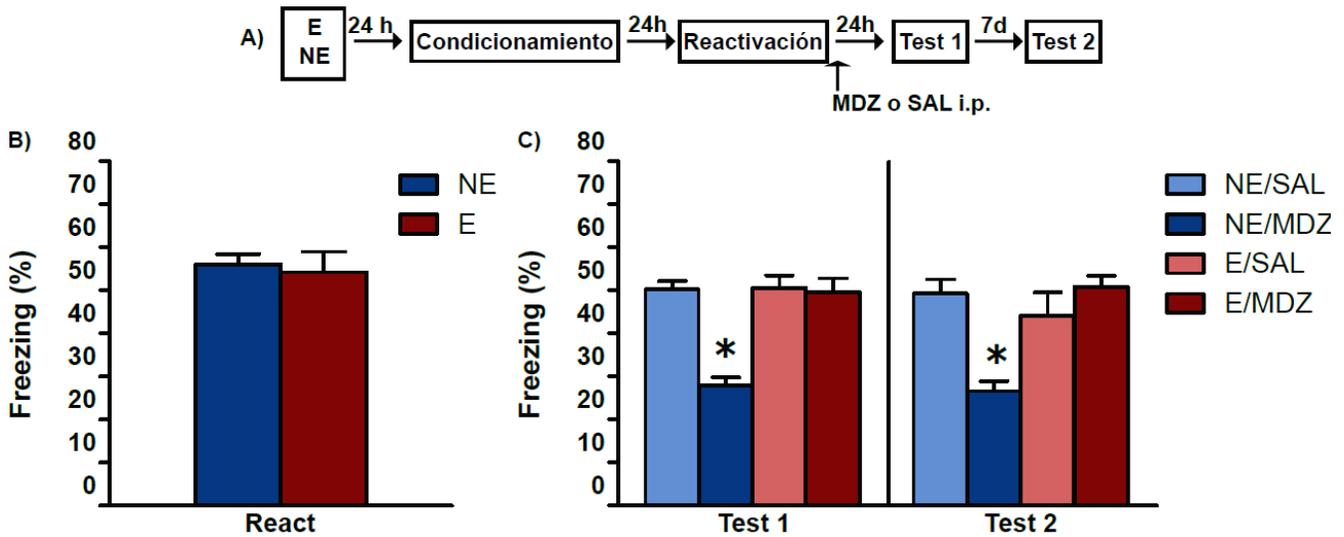


Figura 7. Evaluación del efecto interferente de MDZ sobre el proceso de reconsolidación en memorias resistentes. A) representación esquemática del diseño experimental. B) No se observan diferencias entre los grupos NE y E en los niveles de expresión de “freezing”. C) El estrés previo al condicionamiento induce resistencia al efecto interferente de MDZ sobre la reconsolidación. Los datos son expresados como la media \pm EEM del porcentaje de “freezing”. (*) Indica diferencia significativa respecto a los grupos restantes.

Con el propósito de evaluar si las diferencias observadas en ambos test pudieran deberse a una diferencia en la respuesta de miedo basal al contexto nuevo o a una percepción diferente del shock durante el condicionamiento, evaluamos el porcentaje de “freezing” durante el período previo y el posterior a la administración del shock eléctrico (preshock y postshock). No se observaron diferencias en los niveles de “freezing” durante el período preshock [$t = -0,2$; $p > 0,05$] y postshock [$t = -1,38157$; $p > 0,05$] entre los grupos NE y E (Figura 8B y 8C).

Conclusión

La administración de MDZ luego de la reactivación de la memoria interfiere con el proceso de reconsolidación en animales controles (NE). A su vez, el estrés previo al condicionamiento de miedo contextual induce una memoria resistente al efecto interferente de MDZ cuando es aplicado luego de la reactivación de la memoria. Además, la exposición al estrés no potencia la

respuesta de miedo a un contexto nuevo (Pre-Shock) ni tampoco modifica la respuesta de miedo ante la exposición a shock eléctrico (Post-Shock)

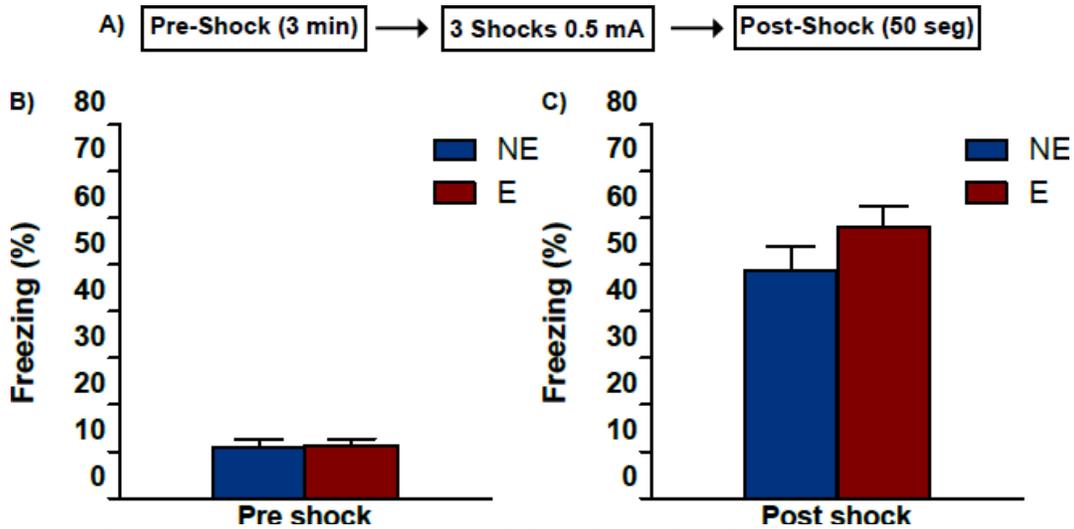


Figura 8. Porcentaje de “freezing” durante el condicionamiento de miedo contextual. A) Representación del condicionamiento de miedo contextual. B) No se observaron diferencias entre animales NE y E durante el período Pre-shock. C) El estrés previo no afecta los niveles de “freezing” durante el condicionamiento de miedo contextual. Los datos son expresados como la media \pm EEM del porcentaje de “freezing”. (*) Indica diferencia significativa respecto a los grupos restantes.

Objetivo específico 1.2. Evaluación de la expresión de la subunidad NR2B en ABL luego de la evocación de memorias en animales con y sin estrés previo.

El objetivo de este experimento fue evaluar si la evocación de la memoria induce cambios en la expresión de la subunidad NR2B del receptor en ABL. Para tal fin, los animales fueron divididos en los grupos NE y E como fue descrito en el Experimento 1. Un día después fueron sometidos al condicionamiento de miedo contextual. Veinticuatro horas posteriores, un grupo de animales fue sometido a la sesión de reactivación (Grupo R) y fueron sacrificados 60 minutos después. Este intervalo de tiempo fue elegido en base a trabajos previos (Leaderbrand y col., 2014; Monaco y col., 2015). El resto de los animales (Grupo NR) permanecieron en su caja de alojamiento hasta el momento de su sacrificio. Los grupos resultantes fueron: NE/NR (n= 8), NE/R (n= 8), E/NR (n= 8) y E/R (n= 7).

Resultados

No se observaron diferencias en los niveles de “freezing” entre ambos grupos reactivados (NE/R y E/R) [$t= 1,59$ $p> 0,05$] (Figura 9B). La evaluación de la expresión de la subunidad NR2B mostró un aumento en los animales controles luego de la reactivación (NE/R) mientras que ese aumento no es observado en el grupo estrés sometido a la reactivación. El ANOVA reveló una interacción significativa entre la condición y la reactivación [$F(1, 27)= 6,83$, $p< 0,05$]. El análisis pos hoc confirmó un nivel de expresión significativamente mayor en el grupo NE/R respecto a los grupos restantes ($p< 0,05$) (Figura 9C).

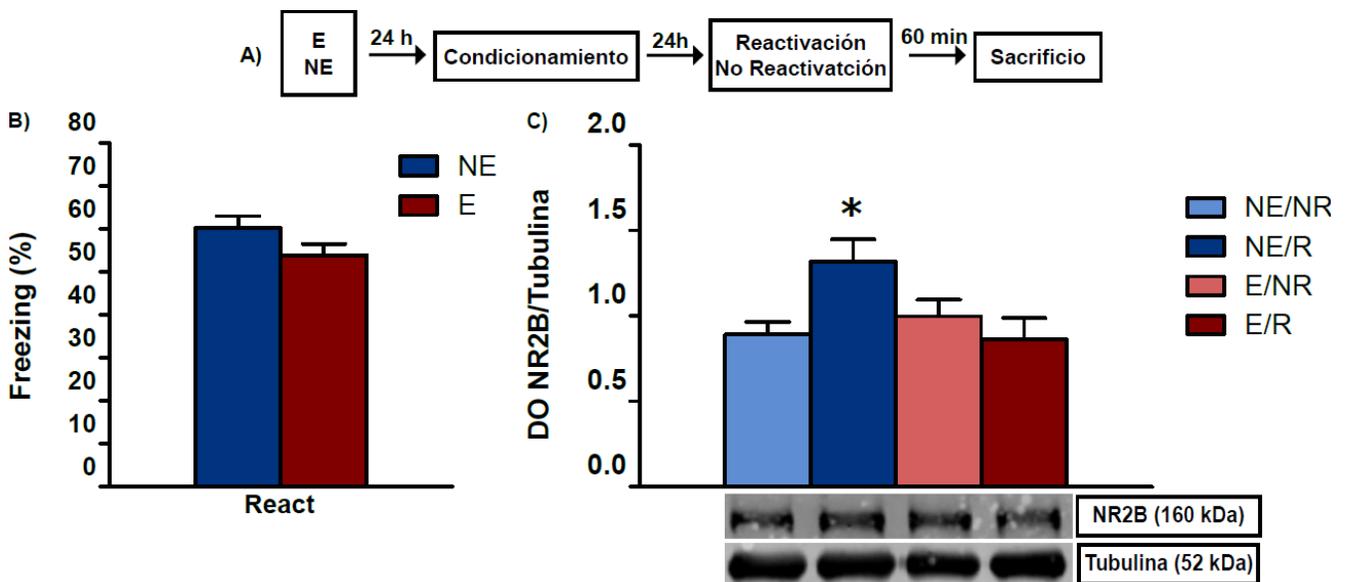


Figura 9. Evaluación de la expresión de la subunidad NR2B en ABL luego de la evocación de memorias en animales con y sin estrés previo. A) Representación esquemática del diseño experimental. B) No se observan diferencias entre los grupos NE y E en durante la evocación de la memoria. C) El estrés previo al condicionamiento impide el incremento en la expresión de NR2B luego de la evocación de la memoria. Los datos son expresados como la media \pm EEM del porcentaje de “freezing” y de la densidad óptica (DO) de NR2B/tubulina. (*) Indica diferencia significativa respecto a los grupos restantes.

Conclusión

La evocación de la memoria induce un aumento en la expresión, en ABL, de la subunidad NR2B en animales controles. A su vez, el estrés previo a la formación de la memoria impide el aumento en la expresión de la subunidad NR2B luego de la reactivación de la memoria.

Objetivo específico 1.3. **Evaluar la expresión de proteínas poliubiquitinadas en ABL luego de la evocación de memorias en animales con y sin estrés previo.**

Este experimento tuvo como objetivo evaluar cambios en la expresión de proteínas poliubiquitinadas, como un indicador de la degradación proteica, luego de la reactivación en animales controles y previamente estresados. Para tal fin, se utilizó un esquema experimental idéntico al realizado en el Experimento 2, utilizando los mismos parámetros temporales de sacrificio post reactivación (60 minutos). Este tiempo fue elegido basado en antecedentes previos (Jarome y *col.*, 2011; Lee y *col.*, 2008). Los grupos resultantes fueron: NE/NR (n= 8), NE/R (n= 8), E/NR (n= 6), E/R (n= 8).

Resultados

De manera muy similar a lo observado en el Experimento 2, no se evidenciaron diferencias entre los niveles de congelamiento de ambos grupos reactivados (NE/R y E/R) [$t = -1,57$; $p > 0,05$] (Figura 10B). En concordancia con evidencias previas (Jarome y *col.*, 2011), el ensayo de western blot mostró un aumento en la expresión de proteínas poliubiquitinadas en los animales controles sometidos a la reactivación (NE/R), no obstante, ningún cambio fue observado en los animales estresados que fueron reactivados (E/R). El análisis de ANOVA reveló un efecto significativo de la reactivación [$F(1, 26) = 10,18$; $p < 0,01$] y una interacción significativa entre la condición y la reactivación [$F(1, 26) = 4,45$; $p < 0,05$]. El test de post hoc confirmó el aumento significativamente diferente en el grupo NE/R respecto a los grupos restantes ($p < 0,05$) (Figura 10C).

Conclusión

La reactivación de una memoria de miedo en los animales control induce un aumento en la expresión de proteínas poliubiquitinadas 60 minutos luego de la reactivación. Asimismo, el aumento en la expresión de proteínas poliubiquitinadas no es observado luego de la evocación de memorias resistentes inducidas por estrés previo al condicionamiento.

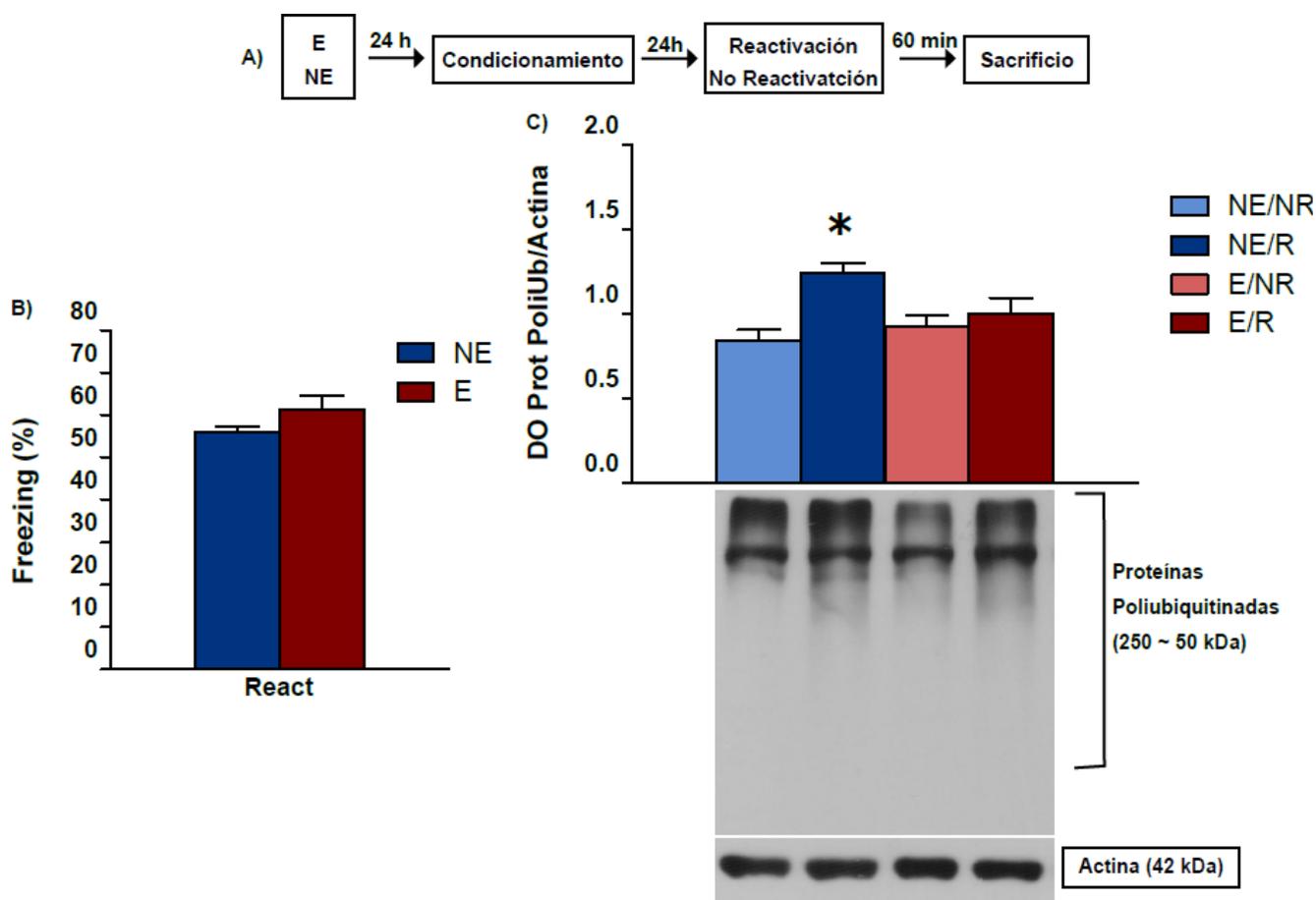


Figura 10. Evaluación de la expresión de proteínas poliubiquitinadas en ABL luego de la evocación de memorias en animales con y sin estrés previo. A) Representación esquemática del diseño experimental. B) No se observan diferencias entre los grupos NE y E en durante la evocación de la memoria. C) El estrés previo al condicionamiento impide el incremento en la expresión de proteínas poliubiquitinadas luego de la evocación de la memoria. Los datos son expresados como la media \pm EEM del porcentaje de “freezing” o de la densidad óptica (DO) de proteínas poliubiquitinadas/Actina. (*) Indica diferencia significativa respecto a los grupos restantes.

Objetivo específico 1.4. **Evaluar de la expresión de Zif-268 en ABL luego de la evocación de memorias en animales con y sin estrés previo.**

El objetivo de este experimento fue evaluar la expresión del factor de transcripción Zif-268 luego de la reactivación de la memoria. Para lo cual los animales fueron estresados, condicionados y reactivados de la misma manera que en los experimentos 2 y 3. No obstante, en este esquema experimental, los animales fueron sacrificados 90 minutos luego de ser reactivados (Diaz-Mataix *y col.*, 2013). Aquellos animales que no fueron reactivados, permanecieron en su caja de alojamiento hasta el momento del sacrificio. Los grupos resultantes fueron: NE/NR (n= 7), NE/R (n= 8), E/NR (n= 8), E/R (n= 7).

Resultados

No se observaron diferencias en los niveles de congelamiento entre los grupos reactivados (NE/R y E/R) [$t= -0,26$; $p> 0,05$] (Figura 11B). El análisis de western blot indicó un aumento en la expresión de Zif-268 en el grupo NE/R. Contrariamente, dicho aumento no fue observado en los animales estresados antes del condicionamiento y sometidos a la sesión de reactivación. El ANOVA reveló un efecto significativo de la condición [$F(1, 26)= 5,72$, $p< 0,05$] y una interacción significativa entre la condición y la reactivación [$F(1, 26)= 10,72$, $p< 0,01$]. El test de comparación Newman Keuls confirmó que los niveles de expresión en el grupo NE/R fueron significativamente mayores respecto de los grupos restantes ($p< 0,01$) (Figura 11C).

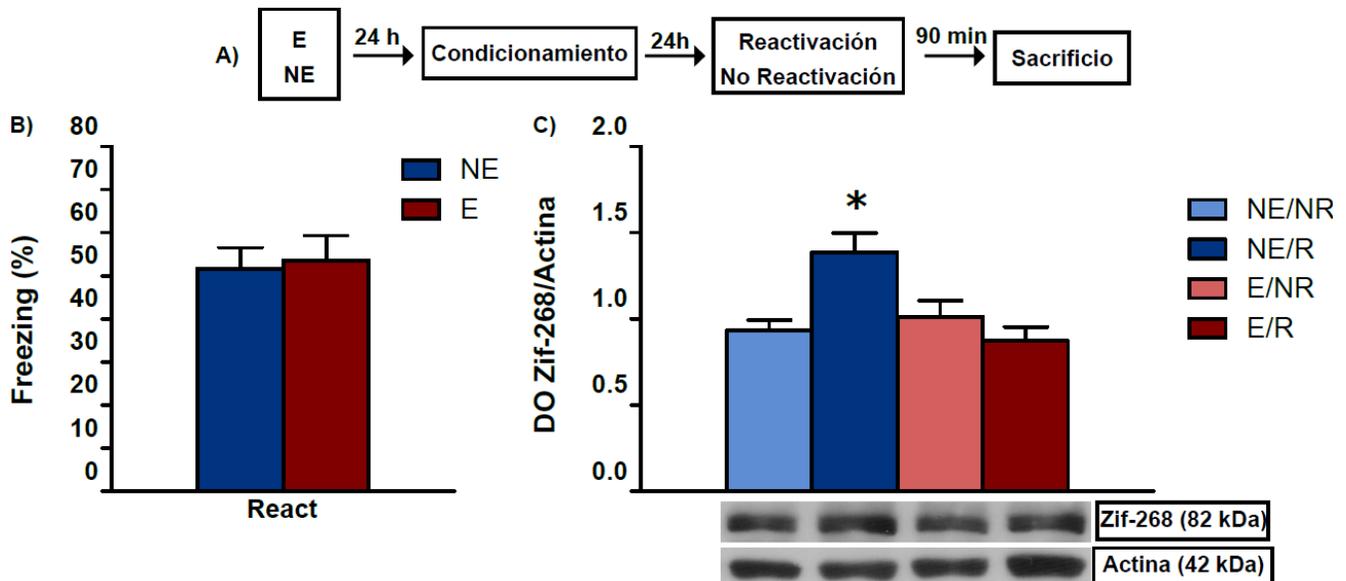


Figura 11. Evaluación de la expresión de Zif-268 en ABL luego de la evocación de memorias en animales con y sin estrés previo. B) No se observan diferencias entre los grupos NE y E en durante la evocación de la memoria. C) El estrés previo al condicionamiento impide el incremento en la expresión de Zif-268 luego de la evocación de la memoria. Los datos son expresados como la media \pm EEM del porcentaje de “freezing” o de la densidad óptica (DO) de Zif-268/Actina. (*) Indica diferencia significativa respecto a los grupos restantes.

Conclusión

La reactivación de una memoria de miedo aumenta los niveles de expresión de Zif-268 90 minutos luego de la reactivación en animales no sometidos a estrés. Además, el estrés previo al condicionamiento impide el aumento en la expresión de Zif-268 luego de la reactivación de la memoria.

DISCUSION

El modelo de resistencia inducida por estrés ha sido reportado en trabajos previos de nuestro laboratorio (Bustos y col., 2010). Dicho modelo ha sido replicado en la presente tesis con algunas diferencias en los parámetros experimentales, como la intensidad de shock durante el condicionamiento, la duración de la sesión de reactivación, la dosis del agente interferente y la duración de los test de retención, no obstante, el fenómeno observado es similar al observado por Bustos y col. (2010). La administración post reactivación de MDZ produce una disminución en la expresión de la memoria en los animales controles al momento del test, mientras que esta alteración no es observada en los animales que han sido estresados un día antes del condicionamiento. Una manera de demostrar la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación es mediante la administración de drogas o intervenciones interferentes luego de la reactivación de la memoria. De hecho, este tipo de observación indirecta es la más frecuentemente utilizada en trabajos que estudian dicho proceso (Alberini y Ledoux, 2013). Se asume que la fase de desestabilización ocurrió cuando la expresión de la memoria ha sido afectada luego de la manipulación experimental, asumiendo que esta manipulación interfiere con la fase de reestabilización. Por lo tanto, la falta de cambios en los niveles de “freezing”, y por lo tanto falta de interferencia de la memoria, en los animales previamente estresados podría ser interpretada como consecuencia de la no ocurrencia del proceso de labilización. Es importante remarcar que el comportamiento observado en el primer test de retención (Test 1) se mantiene durante el Test 2, esto demuestra que los cambios producidos por el tratamiento con MDZ son de carácter permanente al menos por una semana. Asimismo, descarta la posibilidad de que el efecto observado se deba a una potenciación de la extinción en lugar de una interferencia de la reconsolidación. Además, el hecho de que el estrés no modifique los niveles de “freezing” antes y después del condicionamiento respecto a los animales controles indica que el fenómeno observado no se debe a diferencias basales en el comportamiento de miedo ante un contexto novedoso o de una percepción diferente del estímulo eléctrico. Bajo el mismo razonamiento, el estrés no modifica los niveles de “freezing” durante la reactivación respecto al grupo control, Por lo tanto, la diferencia en la vulnerabilidad de la memoria a ser interferida no puede atribuirse a diferencias en la expresión de la misma sino a la falta de desestabilización. En resumen, la evidencia comportamental observada apoya

la hipótesis de que el estrés previo al condicionamiento impide la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación luego de la evocación de la memoria.

El bloqueo específico de receptores NMDA que contienen la subunidad NR2B en ABL previo a la reactivación previene el efecto interferente del inhibidor de la síntesis de proteínas anisomicina, indicando que el bloqueo de estos receptores podría limitar la ocurrencia de la desestabilización (Ben Mamou y *col.*, 2006). Además, este fenómeno fue confirmado en estudios donde se demostró que la subunidad NR2B participa en la etapa de desestabilización mientras que aquellos contienen la subunidad NR2A lo hacen en la etapa de reestabilización (Milton y *col.*, 2013). Bajo la misma línea de razonamiento, se ha reportado que las memorias formadas a partir de un protocolo de aprendizaje intenso, el cual induce resistencia a la interferencia por la administración de anisomicina, exhiben una disminución en los niveles de expresión de la subunidad NR2B en ABL (Wang y *col.*, 2009). Asimismo, trabajos recientes han demostrado que un protocolo de condicionamiento de miedo auditivo fuerte, el cual genera memorias resistentes, induce un aumento en la relación NR2A/NR2B en ABL (Holehonnur y *col.*, 2016). Por todo lo expuesto, parece existir una estrecha relación entre la funcionalidad de esta subunidad y la ocurrencia del proceso de desestabilización. En el presente capítulo se demuestra que la reactivación de la memoria en animales controles induce un aumento en la expresión de la subunidad NR2B en el ABL. Por el contrario, el estrés previo al condicionamiento impide dicho aumento. Esta evidencia, en concordancia con la resistencia a la interferencia de la memoria observada en los animales estresados, apoya la hipótesis de que el estrés previo al condicionamiento impide la ocurrencia de un proceso molecular subyacente al proceso de desestabilización de la memoria luego de su reactivación.

El rápido incremento en la expresión de NR2B observado en animales controles podría ser atribuido a la síntesis local debido a la presencia del ARNm de dicha unidas en la terminal dendrítica (Miyashiro y *col.*, 1994), y este aumento podría ser el responsable de cambios en los mecanismos de plasticidad. Si bien ha sido reportado que la activación de los receptores NMDA que contienen la subunidad NR2B estimula la vía de MAPK (Ras-ERK), la inserción de receptores AMPA y el aumento en el volumen de espinas dendríticas (El Gaamouch y *col.*, 2012; Krapivinsky y *col.*, 2003), otras investigaciones han demostrado el efecto contrario, es

decir, la activación de dichos receptores conduciría a una inhibición de la vía Ras-ERK, la remoción de receptores AMPA de la membrana postináptica y una consecuente depotenciación de la actividad sináptica (Kim *y col.*, 2005; Liu *y col.*, 2004; Massey *y col.*, 2004). Esta última evidencia concuerda con otros trabajos que demuestran una inhibición en la fosforilación de CREB y un aumento en la DLP como consecuencia de la activación de los receptores NR2B-NMDA (Hardingham *y col.*, 2002). Este efecto de depotenciación, como se explicará más adelante, podría ser el responsable de la desestabilización de la memoria.

Una limitación de la evidencia observada en esta tesis es que, al medir expresión total, no es posible saber si el aumento observado resulta en una mayor inserción en la membrana y por lo tanto en un cambio directo en la eficiencia sináptica. Durante el transcurso de este proyecto se intentó determinar la expresión de esta subunidad en membrana mediante “crosslinking” con la molécula BS3 (Boudreau *y col.*, 2012), técnica en la cual se determina la fracción en membrana mediante la diferencia entre la expresión total y la expresión intracelular. Sin embargo, la baja expresión a nivel intracelular dificultó considerablemente la posibilidad de determinar la fracción en membrana. No obstante, ha sido reportado que la mayor parte de las subunidades NR2B expresadas se encuentran ancladas a la membrana (Hall y Soderling, 1997), lo cual indicaría que los cambios observados en la expresión total podrían correlacionarse con la inserción de dicha subunidad en la membrana. De todas maneras, a los fines de estudiar más en profundidad la participación de esta subunidad en el proceso de labilización, resulta necesario evaluar, utilizando una técnica más adecuada, la presencia de esta subunidad en membrana y los posibles cambios inducidos por la evocación de la memoria. En conjunto, estos resultados sugieren que en diferentes tipos de memorias resistentes se podría observar algún tipo de alteración en la expresión de la subunidad NR2B.

Otro de los fenómenos cruciales que participa en la fase de labilización es la degradación de proteínas por parte del sistema SUP (Kaang *y col.*, 2009). Se ha demostrado que la evocación de una memoria de miedo contextual induce un aumento en la expresión de proteínas poliubiquitinadas y de la degradación de las mismas en el hipocampo (Lee *y col.*, 2008). Resultados similares se han encontrado en ABL luego de la reactivación de memorias de miedo asociadas a un tono o a un contexto (Jarome *y col.*, 2011). Asimismo, el bloqueo de la

degradación proteica previene el efecto de agentes interferentes sobre la reconsolidación (Lee y col., 2008). Este fenómeno también ha sido reportado en diversas especies tales como el cangrejo y en ratones (Sol Fustinana y col., 2014) o en *aplysia* (Lee y col., 2012) y utilizando distintos interferentes. Más aún, la inhibición de la degradación de proteínas en el hipocampo dorsal es capaz de impedir la actualización de la memoria por aprendizaje adicional, fenómeno mediado por el proceso de labilización/reconsolidación (Lee, 2010). En conclusión, estas evidencias apoyan la hipótesis de que la degradación de proteínas es un evento crítico en la desestabilización de la memoria. Los resultados de la presente tesis demuestran que la reactivación de la memoria de miedo contextual en animales controles induce un aumento en la expresión de proteínas poliubiquitinadas en ABL. Contrariamente, el estrés previo a la formación de la memoria previene este aumento. Esta evidencia concuerda con la resistencia de la memoria al efecto interferente de MDZ que se observa en animales estresados. Por lo tanto, concluimos que el estrés previo al condicionamiento impide la ocurrencia de un mecanismo críticamente implicado en el proceso de labilización.

El rol de la degradación proteica en los procesos de memoria ha recibido especial atención en los últimos años (Fioravante y Byrne, 2011; Hegde, 2017; Jarome y Helmstetter, 2013; Lip y col., 2017). En la revisión realizada por Jarome y colaboradores se proponen diferentes modelos para explicar la participación del SUP en las etapas de consolidación y reconsolidación. Este modelo propone que la degradación proteica favorece la desestabilización de la memoria a través del “desarmado” de la estructura sináptica (degradación de proteínas de anclaje, receptores, etc), lo cual implica la necesidad de sintetizar proteínas *de novo*. A su vez, el sistema ubiquitina-proteosoma podría participar en la degradación de factores que actúan como represores de la síntesis proteica, tales como Shank y MOV10 (Jarome y col., 2011; Lee y col., 2008). En consecuencia, la degradación de proteínas favorecería la posterior síntesis de proteínas (Jarome y Helmstetter, 2013). En concordancia con este modelo, Sue-Hyun Lee y col. (2012) demostraron, no solo en *aplysia* sino también en el circuito neuronal aislado, que la reactivación desencadena el proceso de labilización y de reestabilización, los cuales dependen de la degradación y la síntesis de proteínas respectivamente. La participación de la degradación proteica en la memoria también fue abordada por Fustiñana y col. (2014). En dicho trabajo se

demuestra que la inhibición del SUP durante el aprendizaje bloquea la consolidación de la memoria, mientras que la inhibición durante la reactivación impide la labilización de la misma. En consecuencia, el bloqueo de la desestabilización impide tanto la interferencia como la potenciación de la memoria. En conjunto, estas evidencias sugieren que la degradación de proteínas es uno de los principales reguladores del proceso de labilización/reconsolidación (Jarome y Helmstetter, 2013).

Es importante destacar la existencia de una conexión funcional entre los dos eventos neurobiológicos estudiados, es decir, la actividad de los receptores NR2B y la degradación de proteínas. Se ha demostrado que la activación de los receptores NMDA que contienen la subunidad NR2B conduce a una disminución en la fosforilación de CREB e induce un aumento de la degradación proteica (Flavell *y col.*, 2013; Hardingham *y col.*, 2002). Asimismo, la administración intra-ABL de ifenprodil, antagonista selectivo de la subunidad NR2B, previene el aumento en la expresión de proteínas poliubiquitinadas (Jarome *y col.*, 2011). Además, la degradación de proteínas es dependiente de la actividad de la CaMKII, el cual es a su vez un mensajero cascada abajo de los receptores NMDA (Jarome *y col.*, 2016). Por lo tanto, resulta lógico pensar que, dada la concatenación de ambos eventos, la falta de aumento en la expresión de NR2B conduzca a una falta de aumento en la poliubiquitinación de proteínas.

De la misma manera que estudiamos eventos neurobiológicos presuntamente implicados en la fase de desestabilización, también se evaluó un evento posiblemente implicado en la fase de reestabilización (reconsolidación), en otras palabras, la fase que se desencadena una vez que la memoria ha sido desestabilizada. Numerosos trabajos demuestran la participación de Zif-268 en los procesos de memoria (Veyrac *y col.*, 2014). El bloqueo de la expresión de Zif-268 en ABL ejerce un efecto deletéreo en la formación de la memoria (Maddox *y col.*, 2011; Malkani *y col.*, 2004). También se ha demostrado que un tratamiento interferente sobre el proceso de reconsolidación en una memoria de miedo contextual disminuye los niveles de expresión de Zif-268 en hipocampo (Machado *y col.*, 2015). A su vez, se han establecido mecanismos diferenciales para el proceso de consolidación y reconsolidación en el hipocampo dorsal, siendo el factor Zif-268 necesario para este último proceso mientras que no participa en el proceso de consolidación (Lee *y col.*, 2004; Lee y Hynds, 2013). Asimismo, se ha demostrado

un aumento en la expresión de Zif-268 en ABL luego de la reactivación de memoria de miedo auditivas o contextuales (Diaz-Mataix *y col.*, 2013; Hall *y col.*, 2001a). Por todo esto, Zif-268 podría ser un buen correlato de la ocurrencia del proceso de reestabilización.

Los resultados presentados en este capítulo muestran un aumento en la expresión de Zif-268 en ABL luego de la reactivación en animales controles. Por el contrario, dicho incremento no es observado en animales previamente estresados. Esto sugiere que el estrés previo al condicionamiento previene la ocurrencia de un mecanismo molecular asociado al proceso de reestabilización, además apoya la idea de que la fase de reestabilización no se desencadena si la memoria no ha sido previamente desestabilizada.

El factor Zif-268 pertenece a un grupo de proteínas de respuesta temprana y regula numerosas funciones celulares, como por ejemplo, desarrollo celular, síntesis de proteínas y mecanismos de plasticidad neuronal. Se ha demostrado un rápido incremento en la expresión de Zif-268 luego de la activación de receptores glutamatérgicos (Worley *y col.*, 1991). Asimismo, Zif-268 regula la expresión de numerosas proteínas involucradas en cascadas de señalización y fortalecimiento sináptico entre otras (James *y col.*, 2005). Más aún, James *y col.* proponen que Zif-268 ejercería un efecto inhibitorio sobre la degradación proteica, indicando que el aumento en la expresión de dicha proteína podría restringir los mecanismos que participan en la fase de desestabilización para dar lugar a los mecanismos involucrados en la reestabilización de la memoria (ej: reinserción de receptores en membrana, síntesis proteica, etc). En relación a las cascadas que podrían regular la expresión de Zif-268, se ha reportado que esta es dependiente de la actividad de la cascada de señalización de las MAPK/ERK, que mediante la fosforilación de CREB y Elk-1 estimulan la expresión de Zif-268. Se ha demostrado que la inhibición de esta vía de señalización, y por consiguiente, la inhibición en la expresión de Zif-268, tiene como efecto una caída en las etapas tardías de la PLP, sugiriendo que Zif-268 participaría principalmente en la mantención de los mecanismos de plasticidad más que en la fase de inducción de los mismos (Davis *y col.*, 2000; Treisman, 1996). Otra hipótesis propuesta para la participación de Zif-268 en la reconsolidación de memorias hipocampales consiste en una vía de señalización independiente de la vía de señalización de MAPK/ERK. Lee & Hynds (2013) proponen que la activación de los receptores NMDA regularía la expresión de Zif-268

mediante la activación del factor de transcripción NFκB. No obstante, los diferentes mecanismos propuestos pueden no ser mutuamente excluyentes o pueden diferir en función del tipo de modelo utilizado, el tipo de memoria o de la estructura cerebral estudiada. En conclusión, el aumento en la expresión de Zif-268 observado en ABL luego de la reactivación participaría en la fase de reestabilización de la memoria, por lo tanto, al no desencadenarse la fase de labilización tampoco se observan cambios en los mecanismos que participan en la reestabilización de la memoria.

Finalmente, los resultados observados a nivel molecular del presente capítulo apoyan y complementan la evidencia comportamental. La ausencia de interferencia en animales estresados coincide con la falta de cambios en la expresión de moléculas asociadas al proceso de labilización/reconsolidación. Confirmamos por lo tanto que el estrés previo al condicionamiento de miedo contextual induce resistencia a la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación

Capítulo 2: Efecto de la modulación GABAérgica en ABL sobre la resistencia de la memoria de miedo al proceso de labilización/reconsolidación.

INTRODUCCION

Numerosos trabajos han demostrado cómo el estrés altera el balance entre la transmisión excitatoria e inhibitora en ABL, siendo esta alteración una de las responsables de las secuelas observables tanto a nivel comportamental, como a nivel de circuitos y funcionamiento neuronal (Martijena y Molina, 2012). La exposición a un evento estresante provoca una disminución en la transmisión GABAérgica en ABL resultando en una hiperexcitabilidad de dicha estructura, esto coincide con una facilitación en la inducción de plasticidad (LTP), un aumento en el comportamiento de tipo ansiedad y con el efecto promotor sobre la formación de memorias aversivas (Giachero y *col.*, 2013a; Isoardi y *col.*, 2007; Maldonado y *col.*, 2011; Martijena y *col.*, 2002; Rodriguez Manzanares y *col.*, 2005).

En consonancia con esta evidencia, el aumento de la transmisión GABAérgica por la administración sistémica o local de MDZ antes de la sesión de estrés previene sus efectos en la formación de memoria, la plasticidad sináptica y el comportamiento de ansiedad (Giachero y *col.*, 2013a; Maldonado y *col.*, 2011; Rodriguez Manzanares y *col.*, 2005). Por el contrario, la administración local de BIC, antagonista competitivo del receptor GABA-A, es capaz de mimetizar los efectos del estrés (Giachero y *col.*, 2015; Rodriguez Manzanares y *col.*, 2005). No obstante, no se había investigado hasta el momento si la modulación de la transmisión GABAérgica tiene algún impacto en la generación de memorias resistentes. Por lo antes expuesto, en el presente capítulo evaluamos el efecto de la administración de MDZ intra-ABL antes del estrés sobre la generación de resistencia al efecto de MDZ y PROP, dos agentes ampliamente utilizados en la disrupción del proceso de reconsolidación de la memoria. Bajo la misma línea de razonamiento, evaluamos el impacto de la administración intra-ABL de BIC sobre la generación de memorias resistentes al efecto interferente de MDZ. Estos experimentos fueron realizados bajo la hipótesis de que la potenciación de la transmisión GABAérgica por la administración de MDZ antes del estrés prevendría la generación de resistencia a los agentes interferentes antes mencionados. Por el contrario, la disminución de la transmisión GABAérgica por la administración de BIC mimetizaría el efecto del estrés sobre la generación de memorias resistentes a ser interferidas luego de su evocación.

Objetivo específico 2.1. Evaluar el efecto interferente de MDZ sobre el proceso de reconsolidación en memorias resistentes. Revalidación del modelo.

El objetivo de este experimento fue reproducir el modelo de resistencia en animales canulados. Para lo cual, los animales fueron sometidos al procedimiento de cirugía estereotáxica, en donde se colocaron cánulas en ABL. Una vez transcurrido el período de recuperación, todos los animales recibieron una infusión de SAL. Luego de transcurridos 10 minutos de la infusión, una parte de los animales fueron sometidos a la sesión de estrés, luego de la cual retornaron a su caja de alojamiento. Un día después todos los animales fueron condicionados y devueltos a su caja de alojamiento. Luego de 24 hs, los animales se colocaron nuevamente en la caja de condicionamiento durante 5 minutos (reactivación), inmediatamente después recibieron una inyección sistémica (i.p.) de SAL o MDZ. De la misma manera que en el experimento 1, los test de retención se realizarán 24 hs y 8 días luego de la reactivación. Los grupos resultantes fueron: NE/SAL (n= 8), NE/MDZ (n= 8), E/SAL (n= 8), E/MDZ (n= 8)

Resultados

No se observaron diferencias al momento de la reactivación en los niveles de “freezing” entre los grupos NE (n= 16) y E (n= 16) [$t= 0,73$ $p> 0,05$] (Figura 12C). De manera similar a lo observado en el Experimento 1, los niveles de “freezing” exhibidos por el grupo NE/MDZ durante el Test 1 fueron menores que los grupos restantes. Por el contrario, dicha disminución no se observó en el grupo E/MDZ. El análisis ANOVA indicó un efecto significativo de la condición [$F(1, 28)= 13,79$; $p< 0,01$], del tratamiento [$F(1, 28)= 13,53$; $p< 0,01$] y una interacción significativa entre la condición y el tratamiento [$F(1, 28)= 19,37$; $p< 0,01$]. El análisis post hoc indicó que los niveles de “freezing” en el grupo NE/MDZ es significativamente menor a los grupos restantes ($p< 0,01$). Resultados similares fueron observados durante el Test 2. El ANOVA indicó un efecto significativo de la condición [$F(1, 28)= 20,87$, $p< 0,01$], del tratamiento [$F(1, 28)= 5,75$; $p< 0,05$] y una interacción significativa entre la condición y el tratamiento [$F(1, 28)= 18,09$; $p< 0,01$]. El análisis post hoc indicó que los niveles de “freezing” en el grupo NE/MDZ es significativamente menor a los grupos restantes ($p< 0,01$) (Figura 12D).

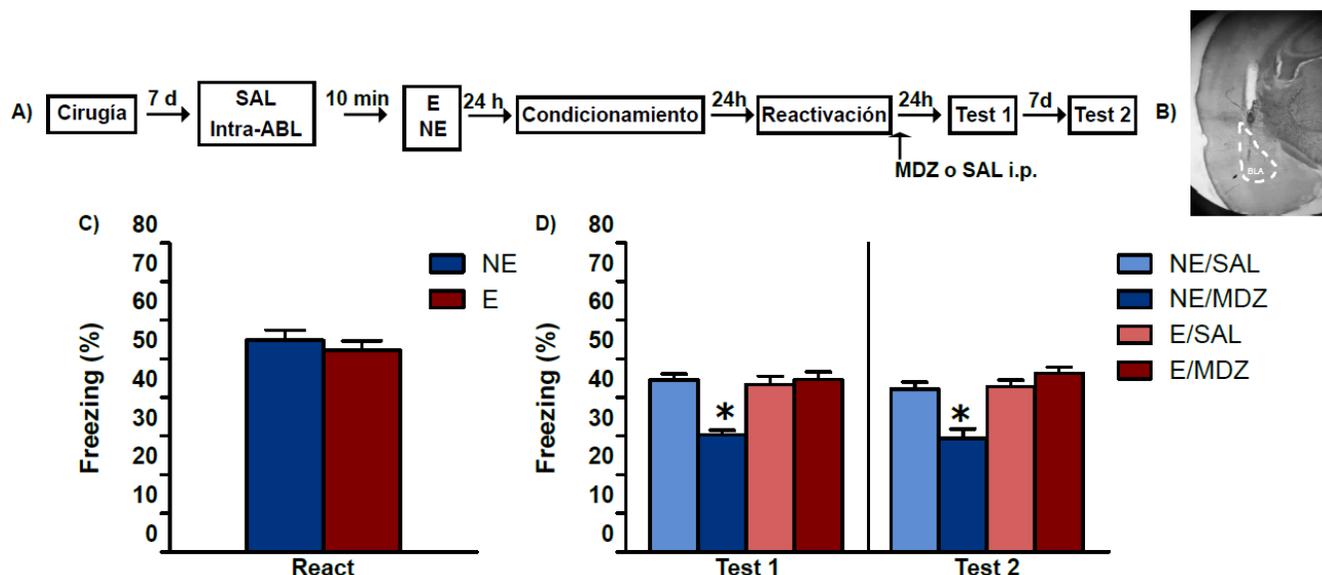


Figura 12. Evaluación del efecto interferente de MDZ sobre el proceso de reconsolidación en memorias resistentes en ratas sometidas a cirugía estereotáxica. A) representación esquemática del diseño experimental. B) Imagen representativa del sitio de infusión. C) No se observan diferencias entre los grupos NE y E en los niveles de expresión de “freezing”. D) El estrés previo al condicionamiento induce resistencia al efecto interferente de MDZ sobre la reconsolidación. Los datos son expresados como la media \pm EEM del porcentaje de “freezing”. (*) Indica diferencia significativa respecto a los grupos restantes.

Conclusión

La administración de MDZ luego de la reactivación de la memoria interfiere con el proceso de reconsolidación en animales controles sometidos a cirugía estereotáxica. Por el contrario, los animales operados que recibieron una sesión de estrés antes del condicionamiento de miedo contextual exhiben resistencia al efecto interferente de MDZ cuando es administrado luego de la reactivación.

Objetivo específico 2.2. Estudiar el efecto de la administración intra-ABL de MDZ previo al estrés sobre la resistencia al efecto interferente de MDZ

El objetivo de este experimento fue evaluar si la potenciación de la actividad GABAérgica previo al estrés es capaz de prevenir la generación de resistencia al efecto interferente de MDZ. Para tal fin, los animales fueron implantados en ABL, luego del período de recuperación, los animales fueron divididos en dos grupos, uno de los cuales recibió una infusión de MDZ, los animales restantes fueron infundidos con SAL. Diez minutos luego de la infusión, todos los animales fueron estresados. Un día después, todos los animales fueron sometidos al condicionamiento de miedo contextual. Veinticuatro horas posteriores, los animales fueron reactivados e inmediatamente después recibieron una inyección i.p. de MDZ o SAL. Los test de

retención de memoria fueron realizados 24 horas y 8 días después de la reactivación como fue descrito previamente. Los grupos resultantes fueron: SAL/SAL (n= 9), SAL/MDZ (n= 8), MDZ/SAL (n= 8), MDZ/MDZ (n= 8).

Resultados

Como puede observarse en la figura 13C, no se observaron diferencias en los niveles de “freezing” al momento de la reactivación entre los animales infundidos con SAL (n= 17) o MDZ (n= 16) previo al estrés [$t= 0,15$; $p > 0,05$]. Durante el test 1 se observó que los niveles de congelamiento del grupo MDZ/MDZ fueron menores en comparación con los grupos restantes, mientras que, no se observó una reducción en los niveles de congelamiento en el grupo SAL/MDZ. El ANOVA indicó un efecto significativo del Pretratamiento [$F(1, 29)= 8,36$; $p < 0,01$] del tratamiento [$F(1, 29)= 6,39$; $p < 0,05$] y una interacción entre el pretratamiento y el tratamiento [$F(1, 29)= 11,11$; $p < 0,01$]. El análisis de comparación post hoc Newman Keuls confirmó una reducción significativa en el grupo MDZ/MDZ respecto a los grupos restantes ($p < 0,01$). El mismo resultado fue observado durante el Test 2. El ANOVA indicó un efecto significativo del pretratamiento [$F(1, 29)= 9,78$; $p < 0,01$] del tratamiento [$F(1, 29)= 22,56$; $p < 0,01$] y una interacción entre el pretratamiento y el tratamiento [$F(1, 29)= 20,43$; $p < 0,01$]. El análisis post hoc indicó una reducción significativa del grupo MDZ/MDZ respecto a los grupos restantes ($p < 0,01$) (Figura 13D).

Con el propósito de demostrar que el efecto observado es dependiente de la reactivación de la memoria, un grupo de animales fue sometido a un esquema similar, con la diferencia que, un día posterior al condicionamiento, todos los animales fueron inyectados sistémicamente con MDZ sin ser sometidos a la sesión de reactivación. El test fue realizado un día después. No se observaron diferencias entre los grupos administrados con MDZ i.p. independientemente de haber sido infundidos antes del estrés con MDZ (n= 6) o SAL (n= 6) [$t= -1,40870$; $p > 0,05$] Figura 14(B).

Conclusión

La administración intra-ABL de MDZ previo al estrés previene la generación de resistencia al efecto interferente de MDZ. Además, el efecto interferente de MDZ es dependiente de la reactivación de la memoria.

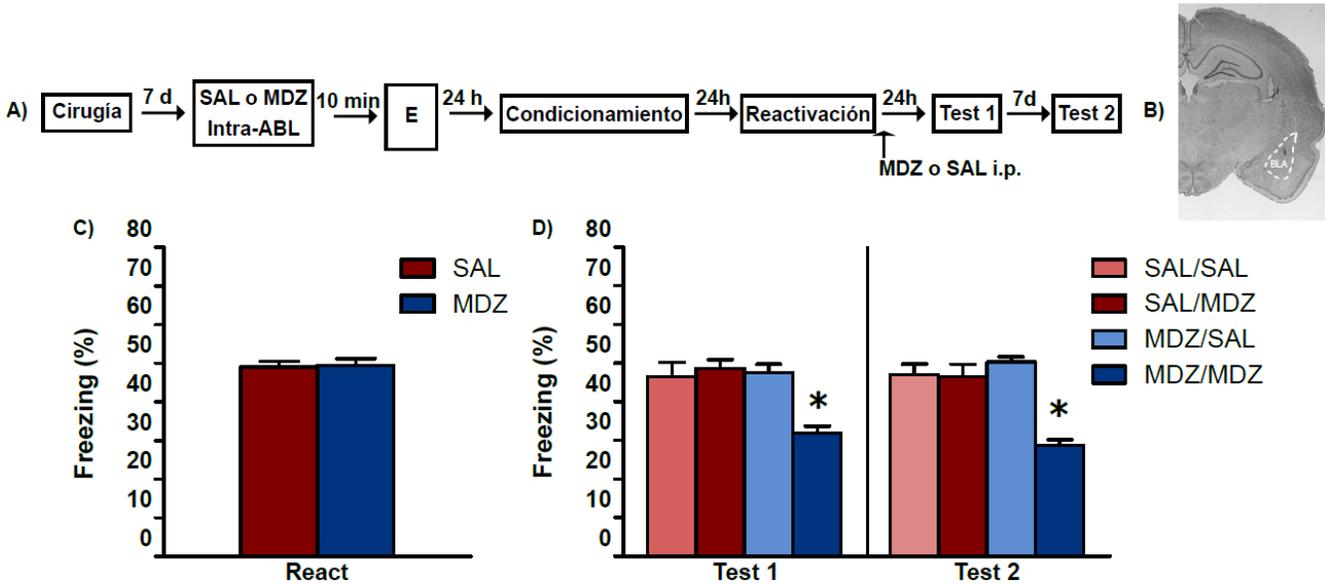


Figura 13. Influencia de la administración intra-ABL de MDZ previo al estrés sobre la resistencia al efecto interferente de MDZ. A) representación esquemática del diseño experimental. B) Imagen representativa del sitio de infusión C) No se observan diferencias entre los grupos SAL y MDZ en los niveles de expresión de “freezing”. D) La administración intra-ABL de MDZ previo al estrés previene la resistencia al efecto interferente de MDZ sobre la reconsolidación. Los datos son expresados como la media ± EEM del porcentaje de “freezing”. (*) Indica diferencia significativa respecto a los grupos restantes.

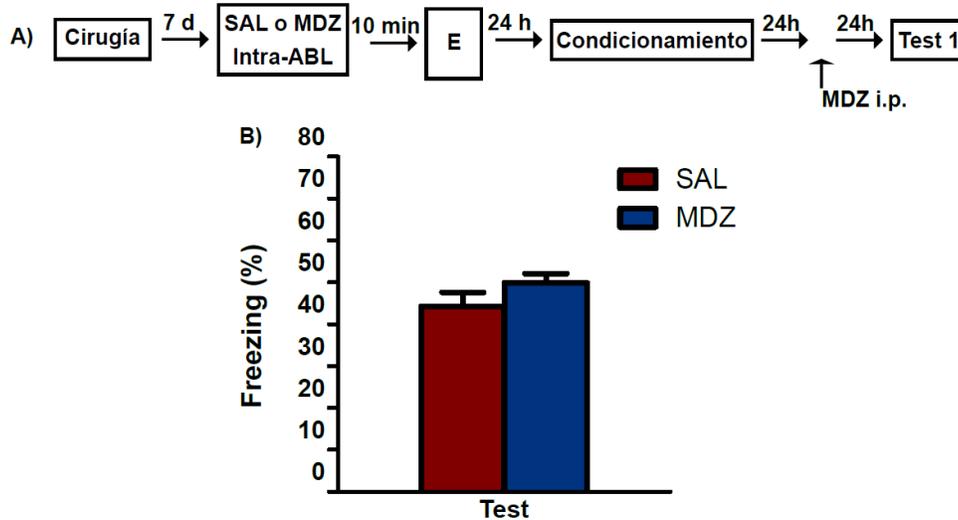


Figura 14. Efecto de la reactivación sobre el efecto interferente de MDZ. A) representación esquemática del diseño experimental. B) El efecto interferente de la administración sistémica de MDZ no es observado cuando se administra en ratas que no fueron sometidas a la sesión de evocación. Los datos son expresados como la media ± EEM del porcentaje de “freezing”.

Objetivo específico 2.3. Evaluar la influencia de la administración intra-ABL de MDZ previo al estrés sobre la resistencia al efecto interferente de PROP

Este experimento tuvo como propósito descartar la posibilidad de que el efecto observado en el experimento 6 pudiera deberse a la administración repetida del mismo agente antes del estrés y luego de la reactivación. Para lo cual, los animales fueron canulados y sometidos al mismo esquema experimental antes mencionado, pero en lugar de MDZ post reactivación, los animales recibieron una inyección i.p. de PROP. Los grupos resultantes fueron: SAL/SAL (n= 8), SAL/PROP (n= 8), MDZ/SAL (n= 10), MDZ/PROP(n= 9).

Resultados

Al igual que en el experimento 6, no se observaron diferencias en los niveles de “freezing” entre los animales infundidos con SAL (n= 16) o MDZ (n= 19) durante la reactivación [$t = -0,202$; $p > 0,05$] (Figura 15C). Al momento del Test 1, se observaron niveles de congelamiento menores en el grupo MDZ/PROP, mientras que en el grupo SAL/MDZ no se observó tal disminución. El ANOVA indicó un efecto significativo del pretratamiento [$F(1, 31) = 5,08$; $p < 0,05$] del tratamiento [$F(1, 31) = 5,64$; $p < 0,05$] y una interacción significativa entre pretratamiento y tratamiento [$F(1, 31) = 9,79$; $p < 0,01$]. El análisis de comparación Newman Keuls confirmó que los niveles de “freezing” en el grupo MDZ/PROP fueron significativamente menores respecto a los grupos restantes ($p < 0,01$). Durante el Test 2 se observó el mismo patrón de comportamiento. El ANOVA indicó una interacción significativa entre pretratamiento y tratamiento [$F(1, 31) = 14,02$; $p < 0,01$]. El test post hoc confirmó niveles de congelamiento significativamente menores respecto a los grupos restantes ($p < 0,05$) (Figura 15D).

Con el objeto de demostrar que el fenómeno de interferencia observado en el grupo MDZ/PROP es dependiente de la reactivación, un grupo de animales canulados fue sometido al mismo protocolo experimental, con la diferencia que un día después del condicionamiento, los animales recibieron una inyección i.p. de PROP sin ser sometidos a la sesión de reactivación. El Test de retención se realizó un día después. La figura 16B muestra que no se observaron

diferencias en los niveles de congelamiento durante el test entre los animales infundidos con SAL (n= 6) o MDZ (n= 6) antes de la sesión de estrés [t= -0,31; p> 0,05].

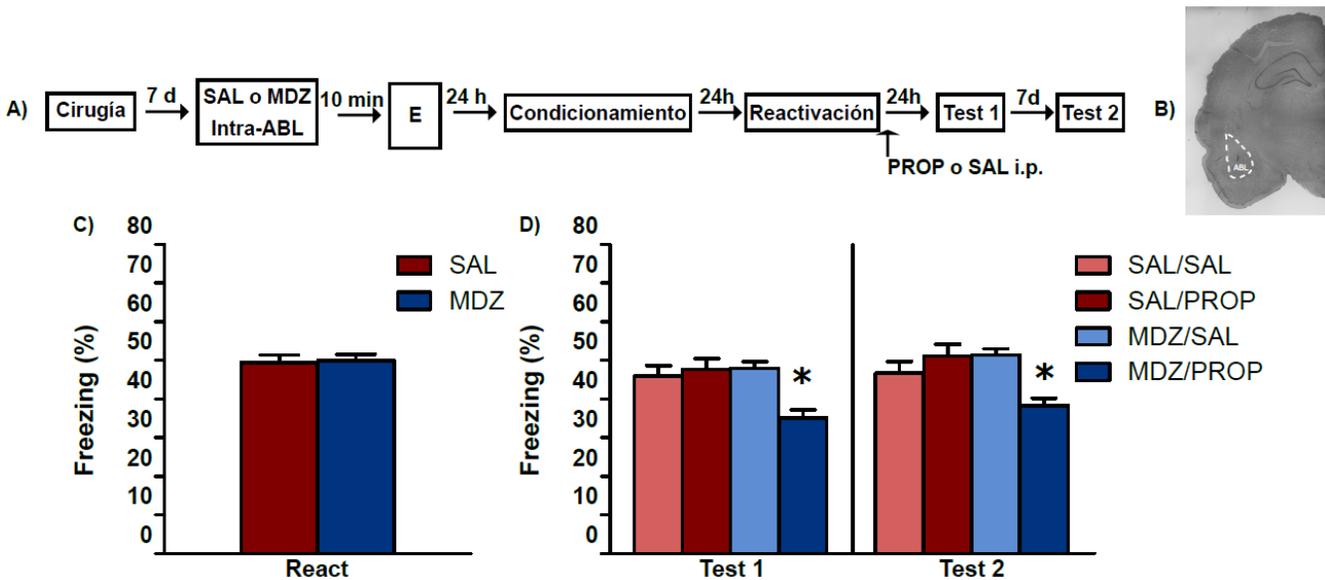


Figura 15. Influencia de la administración intra-ABL de MDZ previo al estrés sobre la resistencia al efecto interferente de PROP. A) representación esquemática del diseño experimental. B) Imagen representativa del sitio de infusión. C) No se observan diferencias entre los grupos SAL y MDZ en los niveles de expresión de “freezing”. D) La administración intra-ABL de MDZ previo al estrés previene la resistencia al efecto interferente de PROP sobre la reconsolidación. Los datos son expresados como la media ± EEM del porcentaje de “freezing”. (*) Indica diferencia significativa respecto a los grupos restantes.

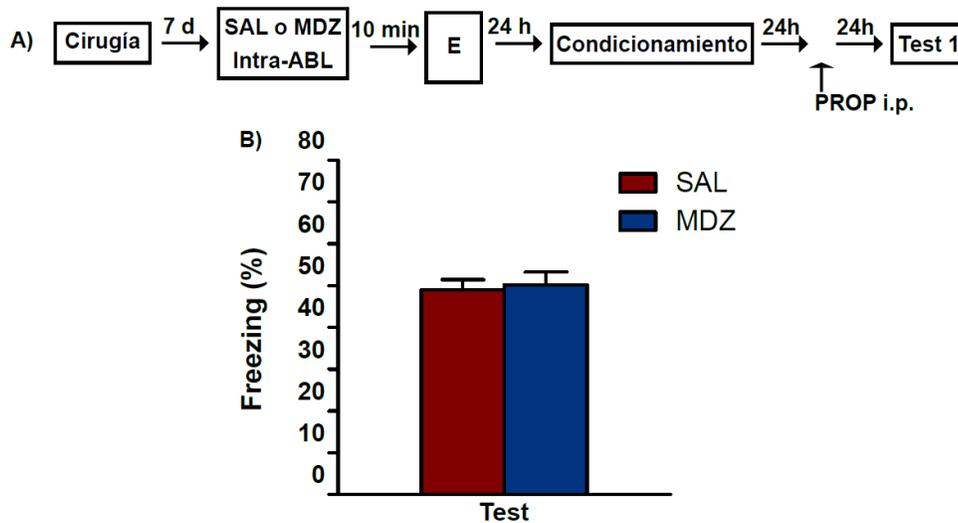


Figura 16. Efecto de la reactivación sobre el efecto interferente de PROP. A) representación esquemática del diseño experimental. B) El efecto interferente de la administración sistémica de PROP no es observado cuando se administra en ratas que no fueron sometidas a la sesión de evocación. Los datos son expresados como la media ± EEM del porcentaje de “freezing”.

Conclusión

La administración intra-ABL de MDZ previo al estrés previene la generación de resistencia al efecto interferente de PROP. Además, el efecto interferente de PROP es dependiente de la reactivación de la memoria.

Objetivo específico 2.4. **Evaluar la influencia de la administración intra-ABL de BIC previo al condicionamiento sobre la resistencia al efecto interferente de MDZ**

Este experimento tuvo como objetivo evaluar si el bloqueo de la actividad GABAérgica por la administración de BIC mimetiza el efecto de estrés sobre la generación de memorias resistentes al efecto interferente de MDZ. Para cumplir este objetivo, los animales fueron sometidos a cirugía estereotáxica. Luego del período de recuperación, las ratas recibieron una infusión de BIC o SAL 15 minutos antes de ser condicionadas. Un día después, todos los animales fueron reactivados e inmediatamente después recibieron una inyección i.p. de MDZ o SAL. Los test de retención fueron realizados, como fue descripto anteriormente, 24 horas y 8 días posteriores a la evocación de la memoria. Los grupos resultantes fueron: SAL/SAL(n= 9), SAL/MDZ(n= 9), BIC/SAL (n= 7), BIC/MDZ (n= 10).

Resultados

Como muestra la figura 17C no se encontraron diferencias durante la reactivación en los niveles de “freezing” entre los animales infundido con SAL(n= 18) o BIC (n= 17) [$t = -0,35$; $p > 0,05$]. En el Test 1, se observó una disminución de los niveles de “freezing” en el grupo SAL/MDZ, mientras que esta disminución no fue observada en el grupo BIC/MDZ. El ANOVA reveló un efecto significativo del pretratamiento [$F(1, 31) = 9,11$; $p < 0,01$] del tratamiento [$F(1, 31) = 11,02$; $p < 0,01$] y una interacción significativa entre el pretratamiento y el tratamiento [$F(1, 31) = 18,2$; $p < 0,01$]. El test post hoc confirmó niveles de “freezing” significativamente menores en el grupo SAL/MDZ respecto a los grupos restantes ($p < 0,01$). Un patrón similar de comportamiento fue observado durante el Test 2. El ANOVA indicó un efecto del pretratamiento [$F(1, 31) = 10,62$; $p < 0,01$] del tratamiento [$F(1, 31) = 7,06$; $p < 0,05$] y una interacción entre pretratamiento y tratamiento [$F(1, 31) = 13,41$; $p < 0,01$]. El test de post

hoc confirmó una disminución significativa en los niveles de “freezing” en el grupo SAL/MDZ respecto a los grupos restantes ($p < 0,01$) (Figura 17D).

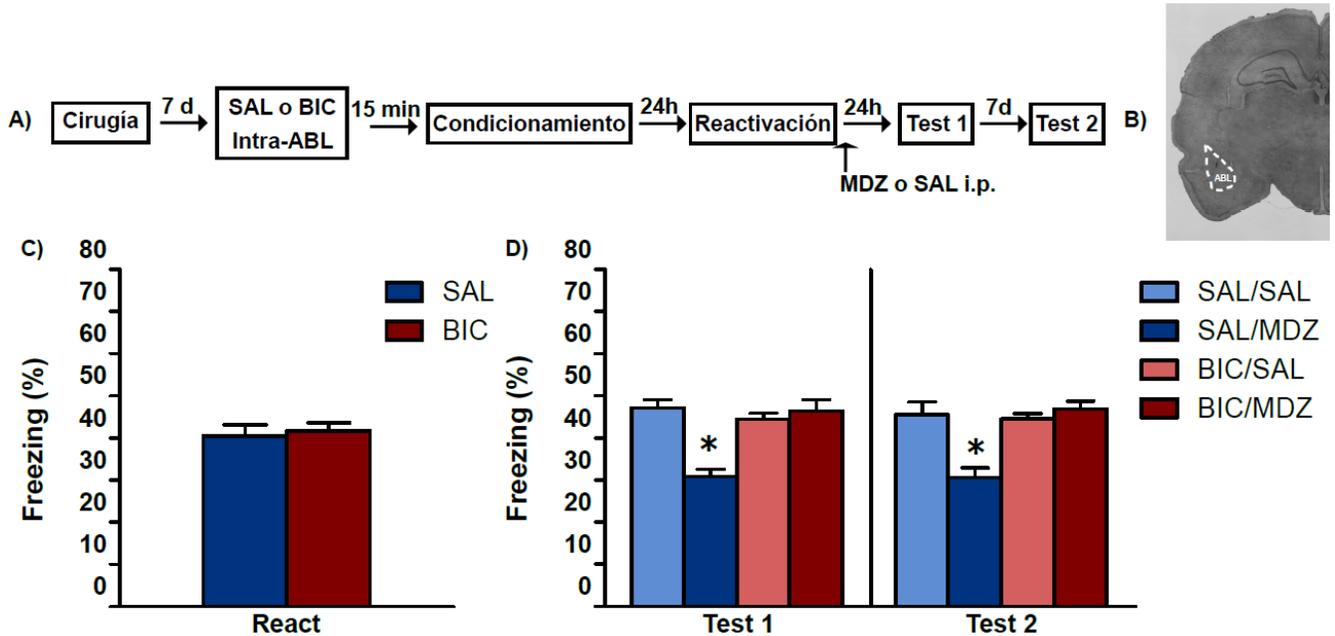


Figura 17. Influencia de la administración intra-ABL de BIC previo al condicionamiento sobre la resistencia al efecto interferente de MDZ. A) representación esquemática del diseño experimental. B) Imagen representativa del sitio de infusión C) No se observan diferencias entre los grupos SAL y BIC en los niveles de expresión de “freezing”. D) La administración intra-ABL de BIC antes del condicionamiento de miedo contextual induce resistencia al efecto interferente de MDZ sobre la reconsolidación. Los datos son expresados como la media \pm EEM del porcentaje de “freezing”. (*) Indica diferencia significativa respecto a los grupos restantes.

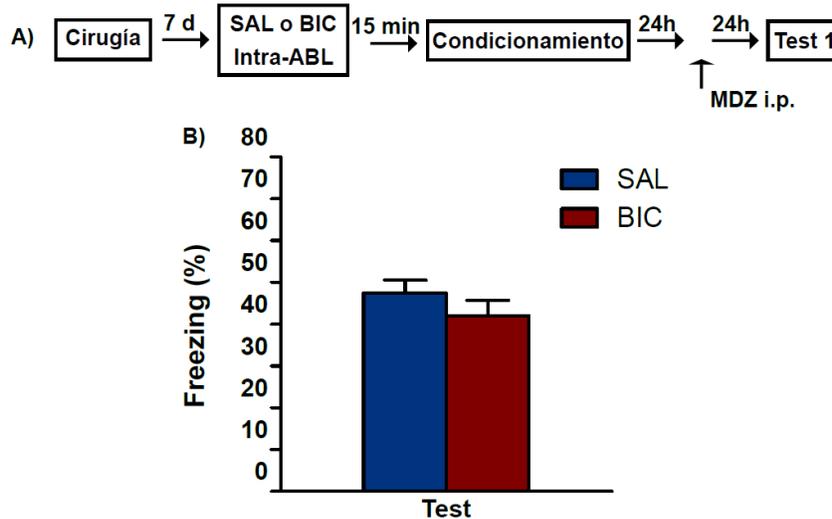


Figura 18. Efecto de la reactivación sobre el efecto interferente de MDZ. A) representación esquemática del diseño experimental. B) El efecto interferente de la administración sistémica de MDZ no es observado cuando se administra en ratas que no fueron sometidas a la sesión de evocación. Los datos son expresados como la media \pm EEM del porcentaje de “freezing”.

Con el objeto de evaluar si el fenómeno de interferencia es dependiente de la reactivación, un grupo de animales canulados fue infundido y condicionado como se explicó previamente. Un día después, los animales recibieron una inyección i.p. de MDZ sin haber sido reactivados. Veinticuatro horas después, se realizó el Test de retención. La figura 18B muestra que, independientemente de la infusión de BIC (n= 7) o SAL (n= 7) antes del condicionamiento, no se observaron diferencias significativas en los niveles de congelamiento durante el test [$t= 1,13$, $p > 0,05$].

Conclusión

La administración intra-ABL de BIC antes del condicionamiento favorece la generación de memorias resistentes al efecto interferente de MDZ. Asimismo, el efecto interferente de MDZ es dependiente de la reactivación de la memoria.

DISCUSION

En este capítulo se reprodujo el fenómeno de resistencia inducida por estrés al efecto interferente de MDZ en ratas sometidas a cirugía estereotáxica en ABL. Además de observarse el mismo fenómeno que en ratas sin operar (capítulo 1), descartamos la posibilidad de que la cirugía, el cambio de intensidad del shock o la infusión local pudieran modificar el fenómeno de resistencia. A pesar de que se observa una pequeña reducción en los niveles de congelamiento en todos los grupos de animales operados en comparación con animales sin operar, dicha disminución no afecta la posibilidad de observar las diferencias entre animales administrados con SAL o los agentes interferentes. En resumen, hemos podido replicar el modelo de resistencia en animales operados, lo cual nos permitió abordar los objetivos propuestos en este capítulo.

Antecedentes de nuestro laboratorio han demostrado que la potenciación de la actividad GABAérgica por la administración sistémica o intra-ABL de MDZ es capaz de prevenir las secuelas del estrés, como la facilitación en la formación de memorias de miedo y en la inducción de PLP, el aumento en el comportamiento de tipo ansiedad y la activación de cascadas moleculares que se desencadenan en respuesta a esta situación traumática (Giachero y *col.*, 2013a; Maldonado y *col.*, 2011; Rodríguez Manzanares y *col.*, 2005). En este capítulo

demostramos que la administración intra-ABL de MDZ previo al estrés restablece la vulnerabilidad de la memoria al efecto interferente de MDZ. Este efecto también es observado con la administración sistémica de PROP luego de la reactivación, otro agente ampliamente utilizado como interferente (Debiec y Ledoux, 2004; Ortiz y *col.*, 2015; Soeter y Kindt, 2011) incluso en memorias asociadas a drogas (Bernardi y *col.*, 2006). El hecho de que el efecto del estrés sea observado usando dos interferentes con mecanismos distintos podría indicar que la resistencia podría darse para otro tipo de agentes interferentes. No obstante, es necesario realizar estudios para probar esta hipótesis, incluso mediante el uso de inhibidores de la síntesis de proteínas. Además, el uso de PROP descarta la posibilidad de que el efecto observado en el grupo MDZ/MDZ pueda atribuirse a la administración repetida del mismo agente farmacológico, ya que el grupo MDZ/PROP exhibe la misma disminución en los niveles de “freezing” (Objetivo específico 2.3). De manera similar a lo observado en los experimentos de comportamiento previos, los niveles de congelamiento observados en el Test 1 se mantienen al menos una semana después, cuando se realizó el segundo test de retención (Test 2). Además, se demuestra que el efecto interferente en los grupos MDZ/MDZ y MDZ/PROP solo es observado si los animales son sometidos a la sesión de reactivación. Por todo esto concluimos que la potenciación de la transmisión GABAérgica previo al estrés previene la formación de memorias resistentes a la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación luego de la reactivación.

En oposición a lo observado con la potenciación GABAérgica, se ha demostrado que el uso de un antagonista competitivo del receptor GABA-A (BIC) mimetiza el efecto del estrés, observado a nivel comportamental, sináptico y neurobiológico (Giachero y *col.*, 2015; Rodríguez Manzanares y *col.*, 2005). En el objetivo específico 2.3 se muestra que la administración intra-ABL de BIC antes del condicionamiento induce resistencia de la memoria al efecto interferente de MDZ. De la misma manera que en los experimentos anteriores, los cambios observados en Test 1 se mantienen en el Test 2. Además, el efecto interferente en el grupo SAL/MDZ es dependiente de la reactivación, ya que dicha interferencia no es observada cuando los animales no son sometidos a la sesión de reexposición al contexto de aprendizaje. En conclusión, la atenuación de la transmisión GABAérgica en ABL mimetiza el efecto del estrés

sobre la generación de memorias resistentes a la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación.

Una interpretación alternativa a este resultado sería que la administración de un antagonista competitivo GABA-A podría afectar la sensibilidad del receptor a la acción de MDZ, esto podría explicar la falta de interferencia en el grupo BIC/MDZ. Sin embargo, esta hipótesis puede ser descartada, al menos en parte, con experimentos que se presentan en el capítulo siguiente.

Como se expuso previamente, la ABL está sujeta a un delicado balance entre la transmisión excitatoria e inhibitoria. Específicamente, esta estructura posee una gran cantidad de interneuronas GABAérgicas que ejercen un control inhibitorio sobre las neuronas glutamatérgicas (Bolshakov, 2009; Ehrlich *y col.*, 2009; Martijena y Molina, 2012). Esta inhibición controla la respuesta a estímulos que no representan una amenaza. Sin embargo, ante la presentación de estímulos de relevancia (como un depredador o en este caso la asociación contexto + shock) dicho control inhibitorio disminuye, aumentando la excitabilidad de las neuronas y favoreciendo la inducción de mecanismos de plasticidad con el objetivo de facilitar el aprendizaje y el almacenamiento de la información (LeDoux, 2007). Así pues, el efecto promotor del estrés en la formación de la memoria, y en la generación de memorias resistentes, puede ser explicados en términos de la atenuación que produce sobre la inhibición GABAérgica en ABL. Además, esta hiperexcitabilidad generada a partir de la atenuación del control inhibitorio también explica la facilitación en la inducción de PLT y el aumento en el comportamiento de tipo ansiedad que se observa luego de la exposición a un evento traumático (Martijena y Molina, 2012; Martijena *y col.*, 2002).

Numerosos estudios han demostrado que la desinhibición transitoria y controlada de una estructura es necesaria para que puedan desencadenarse procesos de aprendizaje y memoria. Esto ha sido observado en diferentes estructuras cerebrales y en diversos paradigmas de aprendizaje (Letzkus *y col.*, 2015; Lu *y col.*, 2000; Mohler y Rudolph, 2017). Particularmente, en el trabajo realizado por Wolff *y col.* (2014) se evaluó el rol de los diferentes subtipos de interneuronas GABAérgicas de ABL en el procesamiento de una memoria de miedo auditiva.

Dicho trabajo demuestra, mediante la manipulación optogenética, que los estímulos recibidos durante el aprendizaje, es decir el tono y el shock eléctrico, ejercen diferentes patrones de inhibición de las interneuronas GABAérgicas. De esta manera se incrementa la excitabilidad de las neuronas principales en ABL y consecuentemente se ve facilitada la adquisición de la información. Los resultados presentados en este capítulo concuerdan con la evidencia antes mencionada ya que se demuestra, mediante un enfoque metodológico más sencillo, cómo la modulación (tanto aumento como disminución) de la actividad GABAérgica en ABL antes del aprendizaje es capaz de modificar la fuerza de la memoria resultante, evidenciada por la vulnerabilidad de la misma a ser interferida luego de su evocación. Más aún, trabajos recientes realizados en ratas, monos e incluso en humanos demuestran que la administración de moduladores alostéricos negativos del receptor GABA-A facilitan el aprendizaje de tareas cognitivas y espaciales (Mohler y Rudolph, 2017). En conjunto, estas evidencias apoyan la hipótesis de que el balance entre la excitación y la inhibición ejerce un control dinámico sobre el aprendizaje y que dicho control puede ser modificado, entre otros factores, por la experiencia propiamente dicha y por el estado interno del individuo (Wolff y *col.*, 2014).

Finalmente, estos resultados suman evidencias a los ya reportados efectos del estrés, y de la consecuente atenuación de la transmisión GABAérgica en el ABL, sobre la memoria de miedo (Martijena y Molina, 2012). Mientras que el estrés potencia la formación y la persistencia de memorias resultantes de un entrenamiento débil (Giachero y *col.*, 2013a; Maldonado y *col.*, 2011), su efecto sobre un entrenamiento más robusto consiste en una restricción al desencadenamiento de los mecanismos moleculares subyacentes de labilización/reconsolidación luego de la reactivación y la consecuente resistencia a ser interferida (Bustos y *col.*, 2010)

Capítulo 3: Reversión farmacológica de la resistencia de la memoria al proceso de labilización/reconsolidación.

INTRODUCCION

El rol de la transmisión glutamatérgica en la inducción de la fase de labilización ha sido descrito previamente. Diferentes trabajos han demostrado que el antagonismo de la subunidad NR2B previo a la reactivación de la memoria resulta en la falta de labilización de la misma y una insensibilidad al efecto de agentes interferentes. Asimismo, en el Capítulo 1 demostramos una falta de aumento en la expresión de la subunidad NR2B en ABL en aquellas memorias resistentes a ingresar en fase de labilización. Además, trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que la administración sistémica de DCS revierte la resistencia inducida por estrés al efecto interferente de MDZ (Bustos y *col.*, 2010). En consecuencia, nos propusimos profundizar el estudio de los mecanismos involucrados en el efecto de DCS en la reversión de la resistencia de la memoria.

En primer lugar nos propusimos evaluar, reproduciendo el experimento previamente realizado por Bustos y colaboradores (2010), el efecto de la administración sistémica de DCS sobre la resistencia al efecto interferente de MDZ. Bajo la misma línea de razonamiento, evaluamos el efecto de la administración intra-ABL de DCS sobre la resistencia inducida por estrés al efecto interferente de MDZ. Posteriormente, evaluamos el impacto de la administración sistémica de DCS en la expresión de Zif-268. Finalmente, evaluamos el impacto de la administración sistémica de DCS sobre la resistencia inducida por BIC intra-ABL al efecto interferente de MDZ.

Estos experimentos fueron realizados bajo la hipótesis de que la activación de los receptores NMDA, tanto por la administración sistémica como intra-ABL de DCS, es capaz de revertir la resistencia inducida por estrés al efecto interferente de MDZ. En el mismo sentido, hipotetizamos que la falta de expresión de Zif-268 observada en animales estresados podría ser revertida por la administración de DCS previo a la reactivación. Por último, suponemos que la administración sistémica de DCS sería capaz de revertir la resistencia inducida por la administración intra-ABL de BIC.

Objetivo específico 3.1. **Estudiar el efecto de la administración sistémica de DCS sobre la resistencia de la memoria al efecto interferente de MDZ**

El objetivo de este experimento fue evaluar, bajo nuestras condiciones experimentales, si la administración de DCS es capaz de revertir la resistencia a la interferencia farmacológica inducida por estrés de la memoria. Para lograr este objetivo, los animales fueron divididos en grupo E y NE como fue descrito en experimentos previos. Un día después, todos los animales fueron sometidos al condicionamiento de miedo contextual, después de lo cual fueron devueltos a su caja de alojamiento. Luego de 24 horas, los animales recibieron una inyección i.p. de SAL o DCS y 30 minutos después la memoria fue reactivada. Inmediatamente después de la reactivación, los animales recibieron una inyección i.p. de MDZ o SAL. Los tests de retención se realizaron 24 hs y 8 días después de la reactivación. Los grupos resultantes al momento de la reactivación fueron: NE/SAL(n= 15), NE/DCS(n= 14), E/SAL(n= 17), E/DCS(n= 16). Al momento del test los grupos fueron: NE/SAL/SAL(n= 7), NE/SAL/MDZ(n= 8), NE/DCS/SAL(n= 7), NE/DCS/MDZ (n= 7), E/SAL/SAL(n= 8), E/SAL/MDZ(n= 9), E/DCS/SAL(n= 7), E/DCS/MDZ(n= 9).

Resultado

Como muestra la Figura 19B, independientemente de la condición (NE o E) o del pretratamiento (SAL o DCS), no se observaron diferencias en los niveles de “freezing” durante la reactivación [$F(1, 58) = 0,002$; $p > 0,05$]. Durante el test 1 se observó una disminución en los niveles de “freezing” en todos los grupos NE administrados con MDZ (SAL/MDZ y DCS/MDZ), mientras que en el grupo de animales estresados, solo los animales tratados con DCS y MDZ exhibieron niveles de “freezing” menores. El ANOVA reveló una interacción significativa entre la condición y el tratamiento [$F(1, 54) = 6,15$; $p < 0,05$] entre el pretratamiento y el tratamiento [$F(1, 54) = 7,36$; $p < 0,01$] y una triple interacción entre la condición, el pretratamiento y el tratamiento [$F(1, 54) = 14,07$; $p < 0,01$]. El test de comparación Newman Keuls confirmó que los niveles de congelamiento de los grupos NE/SAL/MDZ, NE/DCS/MDZ y E/DCS/MDZ, fueron significativamente menores respecto a los grupos restantes ($p < 0,01$) (Figura 19C).

Durante el Test 2 se observó un patrón de comportamiento similar. El ANOVA indicó una interacción entre el pretratamiento y el tratamiento [$F(1,54)= 4,19$; $p < 0,05$] y una triple interacción entre condición, pretratamiento y tratamiento [$F(1, 54)= 15,13$; $p < 0,01$]. El análisis post hoc indicó que los niveles de “freezing” de los grupos NE/SAL/MDZ, NE/DCS/MDZ y E/DCS/MDZ, fueron significativamente menores respecto a los grupos restantes ($p < 0,01$).

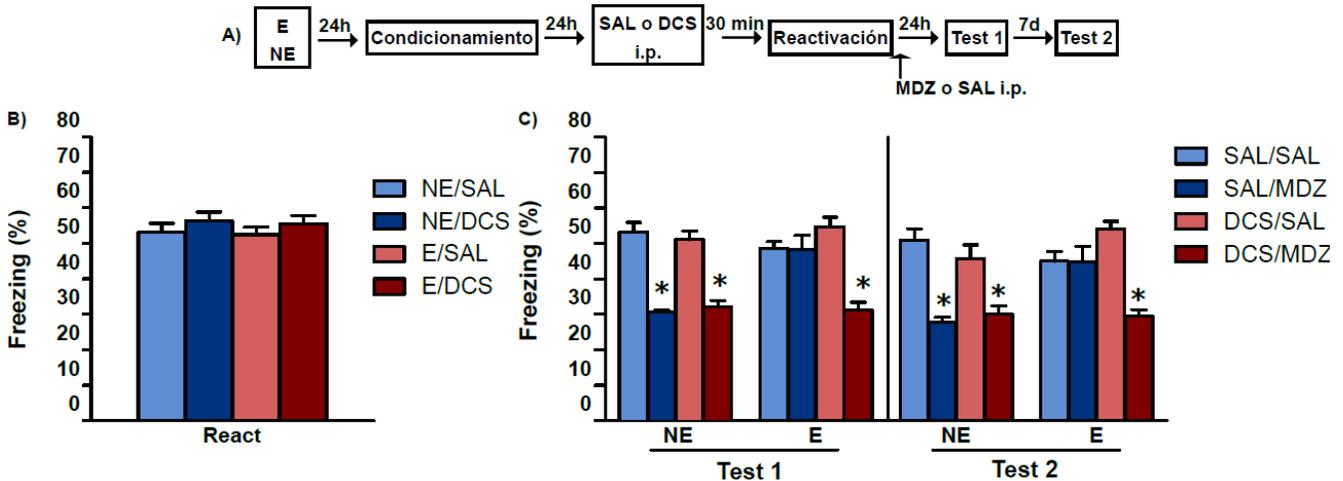


Figura 19. Impacto de la administración sistémica de DCS sobre la resistencia de la memoria al efecto interferente de MDZ. A) Representación esquemática del diseño experimental. B) No se observan diferencias entre los grupos NE/SAL, NE/DCS, E/SAL y E/DCS en los niveles de expresión de “freezing” durante la evocación. B) La administración sistémica de DCS antes de la evocación revierte la resistencia inducida por estrés al efecto interferente de MDZ sobre la reconsolidación. Los datos son expresados como la media \pm EEM de porcentaje de “freezing”. (*) Indica diferencia significativa respecto a los grupos restantes.

Conclusión

En base a los experimentos realizados previamente y a los resultados obtenidos en la presente tesis, podemos concluir que la administración sistémica de DCS antes de la reactivación revierte la resistencia inducida por estrés al efecto interferente de MDZ sobre la reconsolidación de la memoria

Objetivo específico 3.2. Estudiar el efecto de la administración intra-ABL de DCS sobre la resistencia de la memoria al efecto interferente de MDZ.

Una vez confirmado el efecto de la administración sistémica de DCS, nuestro propósito fue evaluar si el mismo tratamiento, esta vez aplicado localmente en ABL, es capaz también de revertir la resistencia inducida por estrés al efecto interferente de MDZ. Para cumplir este objetivo, se utilizaron animales canulados en ABL, los cuales luego de su recuperación fueron divididos en grupo E y NE. Un día después, todos los animales fueron condicionados y

devueltos a su caja de alojamiento. Luego de 24 horas, los animales recibieron una infusión de DCS o SAL 15 minutos antes de la reactivación, luego de esto, fueron administrados sistémicamente con SAL o MDZ. Los tests de retención se realizaron como fue descrito en experimentos previos.

Los grupos resultantes al momento de la reactivación fueron: NE/SAL(n= 22), NE/DCS(n= 19), E/SAL(n= 19), E/DCS(n= 23). Al momento del test los grupos fueron: NE/SAL/SAL(n= 11), NE/SAL/MDZ(n= 10), NE/DCS/SAL(n= 10), NE/DCS/MDZ (n= 9), E/SAL/SAL(n= 9), E/SAL/MDZ(n= 9), E/DCS/SAL(n= 11), E/DCS/MDZ(n= 12).

Resultados

De manera similar a lo observado en el experimento 8, independientemente de la condición (E o NE) o de la infusión intra-ABL de SAL o DCS, no se encontraron diferencias en los niveles de “freezing” durante la reactivación [$F(1, 79) = 0,99$; $p > 0,05$] (Figura 20C). Al momento del test se observó que los grupos NE tratados con MDZ exhibieron menores niveles de “freezing”, mientras que en los grupos estresados, solo los animales que recibieron DCS y MDZ exhibieron menores niveles de “freezing”. El ANOVA indicó una interacción significativa entre la condición y el pretratamiento [$F(1, 75) = 4,36$; $p < 0,05$], entre la condición y el tratamiento [$F(1, 75) = 12,05$; $p < 0,01$] entre el pretratamiento y el tratamiento [$F(1, 75) = 8,74$; $p < 0,01$] y una triple interacción entre la condición, el pretratamiento y el tratamiento [$F(1, 75) = 14,78$; $p < 0,01$]. El análisis post hoc indicó que los niveles de “freezing” de los grupos NE/SAL/MDZ, NE/DCS/MDZ y E/DCS/MDZ, fueron significativamente menores respecto a los grupos restantes ($p < 0,01$). Un resultado similar fue observado durante el Test 2. El análisis ANOVA indicó una interacción significativa entre la condición y el tratamiento [$F(1, 75) = 8,86$; $p < 0,01$], entre el pretratamiento y el tratamiento [$F(1, 75) = 9,06$, $p < 0,01$] y una triple interacción entre la condición, el pretratamiento y el tratamiento [$F(1, 75) = 13,45$; $p < 0,01$] (Figura 20D). El test de comparación Newman Keuls confirmó una reducción significativamente diferente en los grupos NE/SAL/MDZ, NE/DCS/MDZ y E/DCS/MDZ respecto a los grupos restantes ($p < 0,05$).

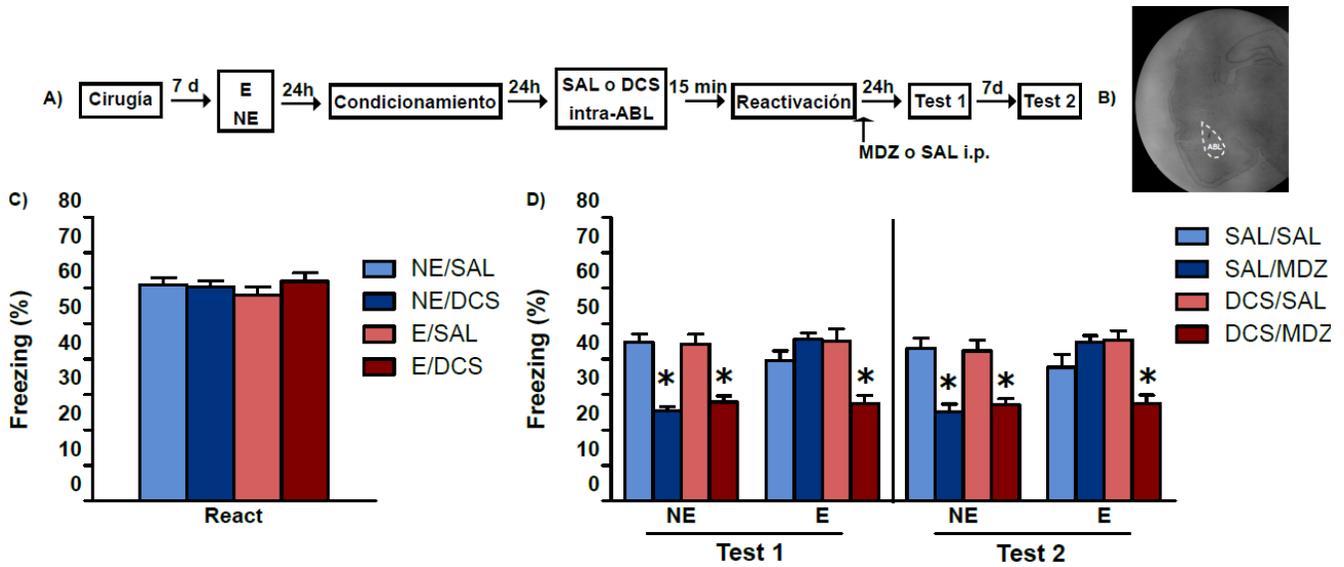


Figura 20. Impacto de la administración intra-ABL de DCS sobre la resistencia de la memoria al efecto interferente de MDZ. A) Representación esquemática del diseño experimental. B) Imagen representativa del sitio de infusión. C) No se observan diferencias entre los grupos NE/SAL, NE/DCS, E/SAL y E/DCS en los niveles de expresión de “freezing” durante la evocación. D) La administración intra-ABL de DCS antes de la evocación revierte la resistencia inducida por estrés al efecto interferente de MDZ sobre la reconsolidación. Los datos son expresados como la media \pm EEM del porcentaje de “freezing”. (*) Indica diferencia significativa respecto a los grupos restantes.

Dada esta nueva evidencia del efecto de la administración local de DCS, resultó necesario evaluar, como se realizó en algunos objetivos anteriores, si dicho efecto es dependiente de la reactivación. Para tal fin, los animales fueron operados, estresados y condicionados como fue descrito previamente. Un día después, los animales fueron infundidos con SAL o DCS y veinte minutos después, sin ser sometidos a la reactivación, recibieron una inyección i.p. de MDZ. Veinticuatro horas después, se realizó el test de retención. Los grupos resultantes fueron: NE/SAL(n= 6), NE/DCS (n= 6), E/SAL(n= 6) y E/DCS (n= 6). Como era esperado, no se observaron diferencias en los niveles de congelamiento entre los diferentes grupos durante el test [$F(1,20)= 4,09$; $p > 0,05$] (Figura 21B) .

Conclusión

La administración intra-ABL de DCS previo a la reactivación revierte la resistencia inducida por estrés de la memoria al efecto interferente de MDZ. Además, el efecto de la administración local de DCS es dependiente de la reactivación de la memoria.

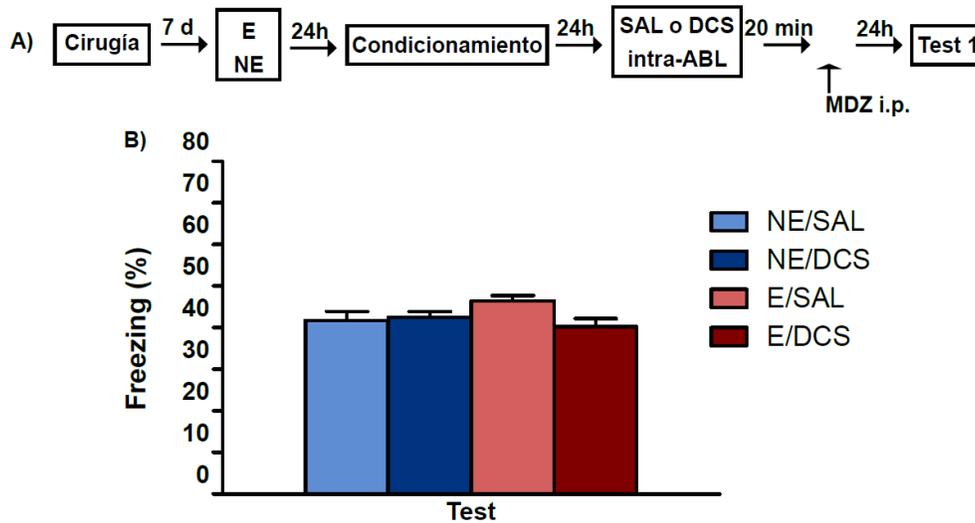


Figura 21. Efecto de la reactivación sobre el efecto interferente de MDZ. A) representación esquemática del diseño experimental. B) El efecto interferente de la administración sistémica de MDZ no es observado cuando se administra en ratas que no fueron sometidas a la sesión de evocación. Los datos son expresados como la media \pm EEM del porcentaje de “freezing”.

Objetivo específico 3.3. **Evaluar el efecto de la administración sistémica de DCS sobre la expresión de Zif 268 en ABL.**

El objetivo de este experimento fue evaluar si la administración sistémica de DCS es capaz de restablecer el aumento en la expresión de Zif-268 en memorias resistentes inducidas por estrés. Para cumplir con dicho objetivo, un grupo de animales fue dividido en grupos NE y E, y un día después recibieron el condicionamiento de miedo contextual. Luego de 24 horas, los animales recibieron una inyección i.p. de DCS o SAL, todos los animales fueron reactivados 30 minutos después. El sacrificio de los mismos se efectuó 90 minutos después de la reactivación. Los grupos resultantes en este experimento fueron: NE/SAL(n= 5), NE/DCS (n= 6), E/SAL(n= 6), E/DCS(n= 6)

Resultados

De manera similar a lo descrito en experimentos anteriores, la figura 22B demuestra que no se observaron diferencias en los niveles de “freezing” entre los diferentes grupos durante la reactivación [$F(1, 19) = 3,82$; $p > 0,05$]. El análisis de la expresión de Zif-268 mostró niveles menores para el grupo E/SAL mientras que el grupo E/DCS exhibió niveles de expresión aumentados y comparables a los grupos controles. El análisis ANOVA indicó un efecto significativo de la condición [$F(1,19) = 8,6$; $p < 0,01$] y una interacción significativa entre la

condición y la reactivación [$F(1, 19) = 5,53$; $p < 0,05$] (Figura 22C). El análisis post hoc confirmó que los niveles de expresión del grupo E/SAL fueron significativamente menores a los grupos restantes ($p < 0,05$).

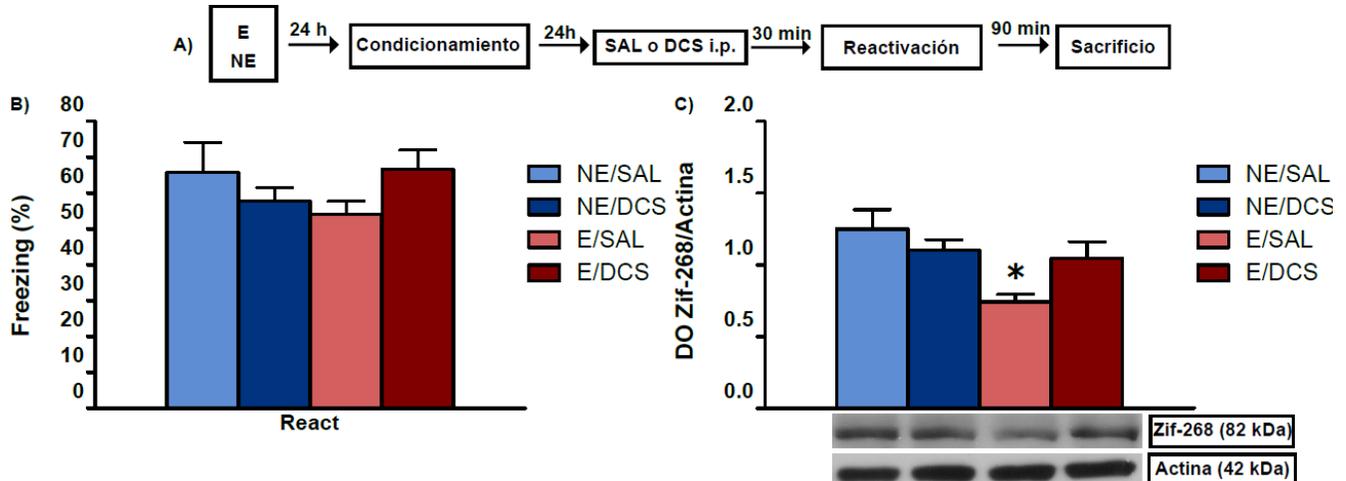


Figura 22. Impacto de la administración sistémica de DCS sobre la expresión de Zif 268 en ABL. A) Representación esquemática del diseño experimental. B) No se observaron diferencias durante la evocación entre animales NE y E. C) la administración sistémica de DCS antes de la evocación restablece el incremento en la expresión de Zif-268 en animales estresados. Los datos son expresados como la media \pm EEM del porcentaje de “freezing” y de la densidad óptica (DO) de Zif-268/Actina. (*) Indica diferencia significativa respecto a los grupos restantes.

Conclusión

La administración sistémica de DCS antes de la reactivación facilita el incremento en la expresión de Zif-268 en ABL luego de la evocación de memorias resistentes.

Objetivo específico 3.4. Estudiar el efecto de la administración sistémica de DCS sobre la resistencia inducida por BIC intra-ABL al efecto interferente de MDZ.

Dado que la administración tanto sistémica como local de DCS es capaz de revertir la resistencia inducida por el estrés, este experimento tuvo como objetivo evaluar si la administración sistémica de DCS es capaz también de revertir la resistencia inducida por la administración local de BIC previa al condicionamiento. Para esto, animales canulados recibieron una infusión de SAL o MDZ y luego de 15 minutos fueron condicionados. Un día después, los animales recibieron una inyección i.p. de DCS o SAL y fueron reactivados luego de 30 minutos. Inmediatamente después de la reactivación todos los animales recibieron una administración i.p. de MDZ. Los tests de retención se realizaron 24 hs y 8 días posteriores a la

reactivación. Los grupos resultantes fueron: SAL/SAL(n= 7), SAL/DCS(n= 9), BIC/SAL(n= 9) y BIC/DCS(n= 9).

Resultados

Independientemente del pretratamiento (BIC o SAL) o el tratamiento (DCS o SAL), no se observaron diferencias en los niveles de “*freezing*” durante la reactivación [$F(1, 30) = 0,3$; $p > 0,05$] (Figura 23C). Durante el Test 1, el grupo BIC/SAL/MDZ exhibió altos niveles de “*freezing*”, mientras que los grupos SAL/SAL/MDZ, SAL/DCS/MDZ y BIC/DCS/MDZ exhibieron un bajo nivel de congelamiento. El ANOVA indicó un efecto significativo del pretratamiento [$F(1, 30) = 31,93$; $p < 0,01$], del tratamiento [$F(1, 30) = 25,49$; $p < 0,01$] y una interacción significativa entre el pretratamiento y el tratamiento [$F(1, 30) = 20,83$; $p < 0,01$]. El análisis post hoc confirmó que los niveles de “*freezing*” del grupo BIC/SAL/MDZ fueron significativamente mayores a los grupos restantes ($p < 0,01$). Este patrón de comportamiento se mantiene durante el Test 2. El ANOVA indicó un efecto significativo para el pretratamiento [$F(1, 30) = 40,29$; $p < 0,01$], el tratamiento [$F(1, 30) = 15,49$; $p < 0,01$] y una interacción significativa entre el pretratamiento y el tratamiento [$F(1, 30) = 16,97$; $p < 0,01$] (Figura 23D). El análisis de comparaciones Newman Keuls indicó confirmó niveles significativamente mayores para el grupo BIC/SAL/MDZ en relación a los grupos restantes ($p < 0,01$).

Conclusión

La administración sistémica de DCS antes de la reactivación revierte la resistencia inducida por la administración intra-ABL de BIC al efecto interferente de MDZ.

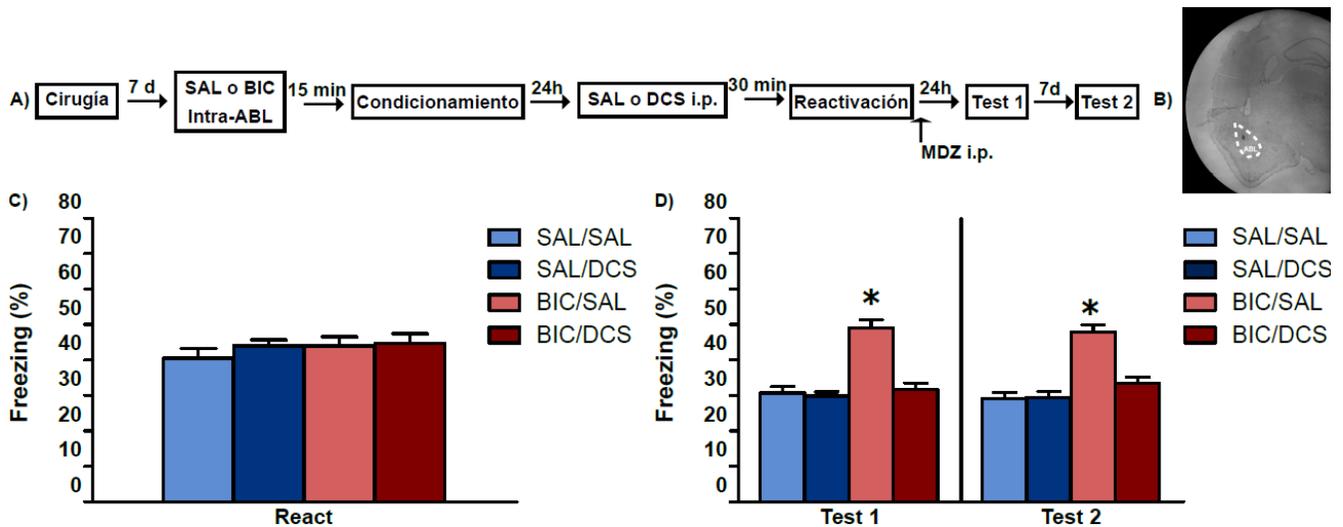


Figura 23. Influencia de la administración intra-ABL de BIC previo al condicionamiento sobre la resistencia al efecto interferente de MDZ. A) representación esquemática del diseño experimental. B) Imagen representativa del sitio de infusión. C) No se observan diferencias entre los grupos SAL y BIC en los niveles de expresión de “freezing”. D) La administración sistémica de DCS antes de la reactivación revierte la resistencia al efecto interferente de MDZ sobre la reconsolidación en animales administrados con BIC intra-ABL. Los datos son expresados como la media \pm EEM del porcentaje de “freezing”. (*) Indica diferencia significativa respecto a los grupos restantes.

DISCUSION

De manera similar a lo observado en trabajos previos, en el presente capítulo se observa que la activación de los receptores NMDA por la administración sistémica de DCS antes de la reactivación revierte la resistencia inducida por estrés al efecto interferente de MDZ (Bustos y col., 2010). En este caso, el fenómeno pudo ser reproducido y confirmado utilizando un protocolo con algunas modificaciones. Además, se demuestra que mediante la administración intra-ABL de DCS también se induce una disminución en los niveles de congelamiento en animales estresados administrados con MDZ (Objetivo Específico 3.2). Esta evidencia sugiere que el ABL es al menos una de las estructuras en las que DCS podría ejercer su efecto.

Existen trabajos que arrojan conclusiones diferentes en relación a la administración intra-ABL de DCS y su influencia sobre la memoria. Mientras que algunos demuestran un efecto facilitador sobre la reconsolidación de memorias apetitivas (Portero-Tresserra y col., 2013), otros atribuyen un efecto facilitador sobre la extinción de memorias de miedo (Wu y col., 2015). No obstante, es necesario considerar que estas evidencias están basadas en modelos de memoria diferentes, lo cual puede justificar la discrepancia en los efectos observados. Sin embargo, nuestra evidencia comportamental, junto con trabajos que han utilizado antagonistas de los receptores NMDA (Ben Mamou y col., 2006; Milton y col., 2008a; Milton y col., 2013)

apoyan la idea de que el efecto de DCS estaría dado sobre el proceso de labilización/reconsolidación.

Se puede observar que la administración local o sistémica de DCS no modifica los niveles de “freezing” durante la reactivación, como así tampoco potencia o modifica el efecto de MDZ en los animales controles. Esto último indicaría que DCS no afecta significativamente el proceso de labilización/reconsolidación en aquellas condiciones donde este proceso ocurre de manera natural. De la misma manera que en experimentos anteriores, los efectos observados en el Test 1 persisten al menos una semana después, al momento de la realización del Test 2. Además, el efecto de la administración local de DCS solo es observado cuando los animales son sometidos a la sesión de reactivación. Esto indica que la sola activación de los receptores NMDA no es suficiente para inducir la desestabilización, sino que el efecto de DCS es dependiente de la evocación de la memoria. Asimismo, otros trabajos han reportado el efecto de DCS en la reversión de la resistencia inducida por abstinencia al etanol (Ortiz y *col.*, 2015) o por la potenciación de la neurotransmisión noradrenérgica inmediatamente después del condicionamiento (Gazarini y *col.*, 2014). En conjunto, toda esta evidencia confirma el rol crítico que tienen los receptores NMDA de ABL en la desestabilización de la memoria y en restablecer la vulnerabilidad de memorias resistentes a ser interferidas.

De la misma manera que la resistencia observada a nivel del comportamiento condice con alteraciones en los mecanismos moleculares subyacentes al proceso de labilización/reconsolidación, en el presente capítulo se demuestra que el efecto de DCS observado en el comportamiento condice con su efecto sobre uno de los mecanismos implicados en la fase de reestabilización. La administración sistémica de DCS antes de la reactivación facilita el aumento en la expresión de Zif-268 en los animales estresados, los cuales exhiben niveles similares a los grupos NE, mientras que el grupo E/SAL muestra niveles significativamente menores a los grupos restantes. Más aún, el efecto observado de DCS concuerda con reportes previos que demuestran la participación de receptores NMDA en la expresión de Zif-268 (Worley y *col.*, 1991). Esta evidencia apoya la idea de que la administración de DCS restablece la ocurrencia del proceso de desestabilización/reconsolidación en animales estresados. De manera similar a lo observado en

objetivos específicos 3.1 y 3.2, la administración de DCS no potencia la expresión de Zif-268 en animales NE, indicando que este tratamiento no afecta o modifica la ocurrencia normal del proceso de labilización/reconsolidación. Esta evidencia discrepa con los resultados obtenidos por Wu y *col.* (2015), en donde se observa que la administración de DCS participa en el efecto facilitador de Zif-268 sobre la extinción. Sin embargo, dado que los modelos utilizados son diferentes (miedo contextual vs respuesta de sobresalto) es posible que la participación de Zif-268 difiera en cada uno de estos tipos de memoria. Otra posible interpretación es que Zif-268 participe en ambos procesos, reconsolidación y extinción, dependiendo de cual se esté llevando a cabo, y dado que nuestro protocolo de reactivación conduce a la reconsolidación de la memoria, el fenómeno observado es atribuible a dicho proceso y no al proceso de extinción. Una posible crítica a este experimento es que solo se evaluó la expresión de Zif-268 en animales reactivados, esto puede justificarse por la necesidad de minimizar la cantidad de grupos y animales utilizados. Además, el hecho de que la DCS no tenga efecto cuando es aplicada en animales no sometidos a la reactivación, nos permite suponer que la expresión de Zif-268 no estaría modificada si DCS se administrase en grupos no reactivados.

Si bien hubiese resultado interesante evaluar el efecto de DCS en los fenómenos asociados a la fase de labilización, como por ejemplo la expresión de NR2B, este objetivo fue desestimado por el hecho de que se estaría administrando un agente que actúa sobre el receptor que contiene la subunidad que se pretende medir, lo que podría dificultar la interpretación de los resultados. En relación a esto, se ha observado que la administración de DCS previo a un protocolo de extinción durante 5 días consecutivos aumenta la expresión de la subunidad NR2B en hipocampo (Ren y *col.*, 2013). Sin embargo, dicho experimento carece de un grupo de animales que reciban DCS sin ser sometidos al proceso de extinción, por lo cual resulta difícil concluir si el aumento en la expresión es debido a la sola administración de DCS o al efecto conjunto de DCS y el protocolo de extinción. Respecto al efecto de DCS sobre la poliubiquitinación de proteínas, este objetivo no pudo cumplirse ya que el estudio de este fenómeno fue abordado en las etapas finales de esta tesis. En conclusión, si bien es necesario realizar estudios complementarios, esta evidencia indicaría que la administración de DCS en animales

estresados facilitaría la ocurrencia de los mecanismos asociados al proceso de labilización/reconsolidación.

Por otra parte, en el objetivo específico 3.4 se demostró que la administración sistémica de DCS restablece la vulnerabilidad al efecto interferente de MDZ en memorias resistentes inducidas por la infusión local intra-ABL de BIC. Una vez más, el comportamiento observado durante el Test 1 persiste una semana después cuando se realiza el Test 2. Esta evidencia sugiere que la activación de los receptores NMDA durante la reactivación promueve la desestabilización de memorias resistentes inducidas por la disminución de la transmisión GABAérgica en ABL al momento del condicionamiento. Además, descarta en parte la posibilidad de que la administración de BIC altere significativamente la sensibilidad de los receptores GABA-A al efecto de MDZ. Este fenómeno de insensibilidad ha sido observado en trabajos de nuestro laboratorio contemporáneos a esta tesis. El trabajo realizado por Ortiz y *col.* (Ortiz y *col.*, 2015) demuestra que las memorias de miedo formadas durante la abstinencia al etanol exhiben resistencia al efecto interferente de MDZ aún cuando se promueve la desestabilización de la memoria por la administración de DCS. Por el contrario, en esta tesis se demuestra que en la resistencia inducida por estrés o por la administración de BIC es posible restablecer la vulnerabilidad al MDZ mediante la activación de los receptores NMDA, lo cual indica que la resistencia está dada por la falta de labilización mas que por la alteración en la sensibilidad al efecto interferente de MDZ. No obstante, es necesario realizar estudios que confirmen esta hipótesis. En resumen, este resultado sugiere que la resistencia inducida por la atenuación GABAérgica en ABL es semejante a aquella inducida por estrés.

Resulta necesario remarcar que, si bien DCS actúa en el sitio de unión de glicina ubicado en la subunidad NR1, este agente podría estar activando los receptores NMDA-NR2B necesarios para desencadenar la desestabilización. No obstante es necesario recordar que no existen diferencias previas a la reactivación en la expresión de la subunidad NR2B (Objetivo Específico 1.2) en animales controles y estresados. Por lo tanto, resulta necesario profundizar en el estudio de los mecanismos mediante los cuales DCS favorece la labilización de memorias resistentes. En relación a esto, es posible que en las memorias resistentes se observe una disminución en la expresión de NR1 y en consecuencia una menor cantidad de receptores

funcionales. Por lo tanto, la administración de DCS podría potenciar la activación de los receptores presentes al momento de la evocación.

Finalmente, este conjunto de evidencias resalta la importancia de los receptores NMDA de ABL en la desestabilización de la memoria. A su vez, estos resultados aportan información sobre el potencial uso terapéutico de DCS en el tratamiento de patologías asociadas a memorias traumáticas que podrían presentar resistencia al proceso de labilización/reconsolidación.

DISCUSSION GENERAL

Los hallazgos expuestos en la presente tesis concuerdan con evidencias comportamentales previas sobre el efecto del estrés en la generación de memorias resistentes a la interferencia del proceso de reconsolidación (Bustos *y col.*, 2010). Particularmente, esta tesis demuestra desde una perspectiva neurobiológica que la resistencia observada a nivel comportamental coincide con la falta de ocurrencia de los mecanismos que subyacen al proceso de labilización/reconsolidación. Por el contrario, estos eventos moleculares son observados en animales no expuestos al evento estresante.

En la presente tesis se observó que bajo condiciones experimentales donde la evocación genera un proceso de labilización/reconsolidación, dicho proceso se acompaña de un aumento en la expresión de la subunidad NR2B en ABL (Figura 24A). Por el contrario, este aumento no es observado en memorias resistentes, como la que se observa en animales estresados (Figura 25A). Esta evidencia concuerda con trabajos previos que demuestran una correlación entre la resistencia de la memoria y una alteración en la expresión de NR2B en ABL (Holehonnur *y col.*, 2016; Wang *y col.*, 2009) y de reportes que demuestran que el antagonismo selectivo de esta subunidad en ABL induce resistencia a la interferencia (Ben Mamou *y col.*, 2006; Milton *y col.*, 2013). Incluso se ha observado la participación de esta subunidad en la labilización de memorias asociadas a drogas (Yu *y col.*, 2016). En conjunto, toda esta evidencia indica la participación crítica de la subunidad NR2B en la desestabilización de la memoria (Figura 24).

Otro proceso críticamente implicado en la desestabilización es la degradación proteica por parte del SUP (Finnie y Nader, 2012; Flavell *y col.*, 2013; Haubrich y Nader, 2016; Jarome y Helmstetter, 2013). En particular, se ha observado que la evocación de la memoria induce un aumento en la poliubiquitinación de proteínas y de la actividad del proteosoma en ABL y en Hipocampo (Jarome *y col.*, 2016; Jarome *y col.*, 2011). Asimismo, el bloqueo de la actividad proteolítica induce resistencia al efecto interferente de diferentes agentes (Lee *y col.*, 2008; Sol Fustinana *y col.*, 2014) o impide la actualización de la memoria (Lee, 2008; 2010). En Capitulo 1 se reportó que la evocación de la memoria induce un aumento en la expresión de proteínas poliubiquitinadas en ABL (Figura 24A), mientras que este aumento no fue observado en animales estresados (Figura 25A). En conjunto, esta evidencia muestra el rol crítico de este proceso en la desestabilización de la memoria. Más aún, esto sugiere una posible relación

causal entre la falta de aumento de NR2B y de proteínas poliubiquitinadas, ya que como fue antes mencionado, existe una conexión funcional entre la activación de receptores NMDA y la degradación de proteínas (Jarome y *col.*, 2011; Mao y *col.*, 2008). Por otra parte, es importante remarcar que estos fenómenos moleculares conducen a una depotenciación de la sinapsis, lo cual parece ser un fenómeno crítico para la desestabilización de la memoria (Bonin y De Koninck, 2015). Más aún, se ha observado que un déficit para inducir depotenciación de las sinapsis coincide con la falta de flexibilidad de memorias espaciales (Nicholls y *col.*, 2008).

Resulta lógico pensar que si no se produce la desestabilización de la memoria, tampoco se desencadenarán los mecanismos necesarios para la reestabilización de la misma. Los hallazgos reportados en esta tesis demuestran que la evocación de la memoria induce un aumento en la expresión de Zif-268 en los animales no expuestos al estímulo estresante (Figura 24A). Por el contrario, este aumento no es observado en memorias resistentes (Figura 25A). Dado que ha sido ampliamente reportada la participación de este factor de transcripción en la reestabilización de la memoria (Besnard y *col.*, 2013; Bozon y *col.*, 2003; Lee y *col.*, 2004), la falta de aumento de Zif-268 indicaría una ausencia del proceso antes mencionado (Figura 24). En este caso, la reestabilización de la memoria está dada por mecanismos de plasticidad que potencian la conectividad de las sinapsis previamente desestabilizadas (Bonin y De Koninck, 2015).

Dado que los mecanismos neurobiológicos evaluados en este trabajo podrían ser buenos correlatos moleculares de la flexibilidad de la memoria, resultaría interesante estudiar los mismos en otros tipos de memorias resistentes; como las que son formadas a partir de protocolos de entrenamiento fuerte o aquellas que son evocadas luego de mucho tiempo transcurrido desde el aprendizaje. Como se ha expuesto previamente, memorias resistentes inducidas por entrenamientos fuertes exhiben menores niveles de la subunidad NR2B en ABL (Wang y *col.*, 2009). Asimismo, trabajos más recientes han demostrado que un protocolo de condicionamiento de miedo auditivo robusto, el cual genera memorias resistentes, induce un aumento en la relación NR2A/NR2B en ABL (Holehonnur y *col.*, 2016). Estos resultados, en conjunto con los de esta tesis, sugieren que en diferentes tipos de memorias resistentes se podría observar algún tipo de alteración en la expresión o la funcionalidad de la subunidad

NR2B. Este estudio también podría hacerse extensivo a los otros mecanismos moleculares estudiados, tales como la expresión de Zif-268 o de proteínas poliubiquitinadas. Además, esto podría aportar información sobre la posible universalidad de los mecanismos de resistencia de la memoria.

Es importante remarcar que no se evidenciaron diferencias basales, es decir previo a la reactivación, entre grupos controles y estresados en los parámetros neurobiológicos estudiados; sino que las diferencias fueron observadas luego de la evocación. Esto significa que ninguno de los parámetros medidos es un indicador *a priori* de la resistencia. Por lo cual, sería interesante evaluar otras moléculas o procesos que puedan ser indicativos de la resistencia antes de la reactivación. Ha sido reportado que el tráfico de receptores AMPA, particularmente el cambio de receptores impermeables a calcio por receptores permeables a calcio, un requisito necesario para la desestabilización de la memoria (Hong y *col.*, 2013; Rao-Ruiz y *col.*, 2011). Por lo tanto, la resistencia podría estar dada por una diferencia en la expresión de subunidades de receptores AMPA previo a la reactivación; como así también por una alteración en el tráfico como ha sido demostrado en diversos trabajos (Holehonnur y *col.*, 2016; Jarome y *col.*, 2016). Además, se sabe que la activación de receptores NMDA (los cuales se encuentran bloqueados por Mg^{2+} al potencial de reposo de membrana) requiere de la activación previa de receptores AMPA u otros receptores (por ejemplo receptores metabotrópicos). Esto desplaza al ión Mg^{2+} permitiendo entonces la activación de los receptores NMDA. Por lo tanto, alteraciones en la funcionalidad de los receptores AMPA podrían repercutir en los mecanismos que permiten la desestabilización. Cambios en la expresión de receptores cannabinoides CB1 o de canales de calcio dependiente de voltaje (Suzuki y *col.*, 2004) o incluso en la liberación de glutamato podrían ser otros indicadores de la resistencia de la memoria.

Como fue mencionado previamente, la ocurrencia del error de predicción es un fenómeno asociado a la generación de la fase de desestabilización de la memoria (Exton-McGuinness y *col.*, 2015; Flavell y *col.*, 2013; Pedreira y *col.*, 2004). En este sentido, la formación de la memoria bajo las secuelas del estrés puede alterar la posterior detección de diferencias entre la expectativa de lo que ocurrirá y de lo que realmente ocurre. Alteraciones en la transmisión dopaminérgica del área tegmento ventral (ATV) o una alteración en los procesos atencionales

podrían afectar la detección de discrepancias durante la evocación. En consecuencia, resultaría interesante evaluar si en nuestro modelo de resistencia es posible desestabilizar la memoria bajo otras condiciones experimentales, por ejemplo, mediante cambios en los parámetros de la sesión de evocación que puedan facilitar la generación del error de predicción, promoviendo entonces la desestabilización de la memoria.

Como ha sido mencionado en esta tesis, la exposición al estrés resulta en la atenuación del control inhibitorio GABAérgico sobre las NPPs en ABL. Así, dicha atenuación estaría implicada en el efecto promotor del estrés sobre la formación de la memoria asociativa de miedo y con la facilitación en la generación del PLP en ABL (Rodríguez Manzanares *y col.*, 2005). En relación a la modulación de la transmisión GABAérgica y el efecto sobre la resistencia de la memoria, los resultados de la presente tesis claramente concuerdan con evidencias previas que demuestran que la potenciación de la transmisión GABAérgica inhibitoria específicamente en ABL es capaz de prevenir las secuelas inducida por estrés (Giachero *y col.*, 2013a; Giachero *y col.*, 2015; Maldonado *y col.*, 2011) (Capítulo 2). Por el contrario, los efectos del estrés sobre la memoria de miedo pueden ser mimetizados por el antagonismo de receptores GABA-A en ABL previo al condicionamiento (Giachero *y col.*, 2015; Rodríguez Manzanares *y col.*, 2005) (Capítulo 2). Asimismo, ha sido ampliamente reportado que para la ocurrencia de diferentes tipos de aprendizaje es necesaria una desinhibición controlada y transitoria de los circuitos involucrados en dicho aprendizaje (Ehrlich *y col.*, 2009; Letzkus *y col.*, 2015; Wolff *y col.*, 2014). Bajo esta perspectiva, el estrés podría exacerbar esta desinhibición en ABL; facilitando por lo tanto la formación de memorias robustas y persistentes. Más aún, es posible que la formación de una memoria resistente producto de un entrenamiento robusto pueda darse por un mayor grado de desinhibición durante el aprendizaje. De los hallazgos previamente descritos, se desprende que la modulación del sistema GABAérgico inhibitorio en ABL cumple un rol crítico en la resistencia de la memoria de miedo, es decir a la generación del proceso de labilización/reconsolidación. Por lo tanto, y asumiendo que este proceso es un indicador de la flexibilidad de la memoria de miedo, es posible sugerir que el grado de desinhibición de las neuronas de proyección en ABL

al momento de la generación de la memoria de miedo determina su propiedad dinámica durante la evocación.

De manera similar a lo observado en trabajos previos de nuestro laboratorio (Bustos y *col.*, 2010; Ortiz y *col.*, 2015) y de otros grupos (Gazarini y *col.*, 2014), en esta tesis se demuestra el efecto de DCS sobre la reversión de la resistencia de la memoria (Figura 25C). Esto se demuestra no solo por la administración sistémica, sino también por la administración intra-ABL de esta droga (Capítulo 3). Más aún, se demostró que la administración de DCS es capaz de restablecer el aumento en la expresión de Zif-268, un mecanismo subyacente al proceso de reestabilización (Figura 25B). En conjunto, la evidencia obtenida en la presente tesis así como otros antecedentes (Ben Mamou y *col.*, 2006; Milton y *col.*, 2008a; Milton y *col.*, 2013) demuestran que la activación de receptores NMDA en BLA es necesaria para la desestabilización de la memoria y la posterior ocurrencia de los mecanismos de reestabilización. Bajo esta premisa, resultaría interesante evaluar si es posible favorecer la desestabilización de otro tipo de memorias resistentes mediante el uso de DCS, como por ejemplo memorias remotas o memorias generadas por un entrenamiento robusto.

Es sabido que la amígdala cumple un papel fundamental en el circuito de procesamiento de la memoria de miedo (Baldi y Bucherelli, 2015; Izquierdo y *col.*, 2016; LeDoux, 2007; LeDoux, 2000; Pape y Pare, 2010). Asimismo, ha sido ampliamente reportado el efecto del estrés sobre esta estructura implicada en el procesamiento de la información emocional (Ciocchi y *col.*, 2010; Chattarji y *col.*, 2015; Martijena y Molina, 2012; Roozendaal y *col.*, 2009). Las evidencias presentadas en esta tesis están en concordancia con las nociones antes expuestas, ya que los mecanismos neurobiológicos en ABL que subyacen al proceso de labilización/reconsolidación se encuentran alterados en memorias resistentes. Bajo el mismo razonamiento, la administración de agentes farmacológicos en ABL puede prevenir (MDZ), inducir (BIC) o revertir (DCS) la resistencia de la memoria. En conjunto, estas evidencias apoyan un rol crucial de ABL tanto en el proceso de labilización/reconsolidación de una memoria de miedo, como en la resistencia inducida por estrés.

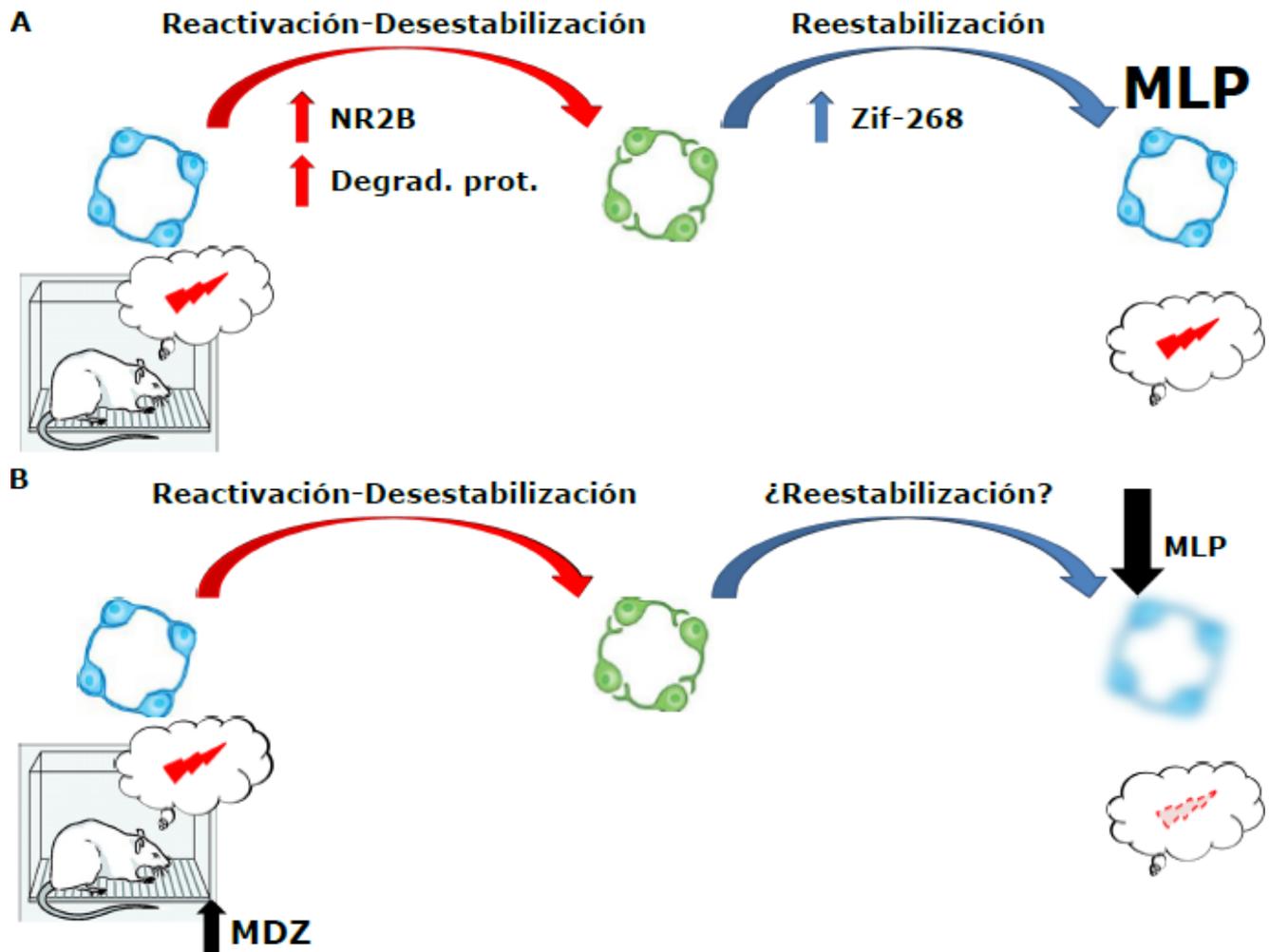
NO ESTRES

Figura 24. Comportamiento dinámico de la memoria en animales no estresados. A) La reactivación (evocación) de la memoria induce la desestabilización con la consecuente ocurrencia de los mecanismos subyacentes; posteriormente se produce la reestabilización por medio de los mecanismos involucrados en esta fase. B) la administración de MDZ luego de la evocación interferiría el proceso de reestabilización (reconsolidación). Esto conduciría a un déficit en el almacenamiento y la expresión de la memoria.

Finalmente, estos resultados se suman al conjunto de trabajos que proponen a la interferencia de la reconsolidación como una valiosa estrategia para el tratamiento de memorias traumáticas, tales como fobias, trastornos de ansiedad o desórdenes de estrés postraumáticos (Haubrich y Nader, 2016; Nader, 2015). Más aún, se argumenta que esta estrategia terapéutica presenta ventajas respecto a las terapias de extinción, dado que en esta última pueden darse procesos de recuperación espontánea o reinstalación de la memoria original (Duvarci y Nader, 2004).

ESTRES

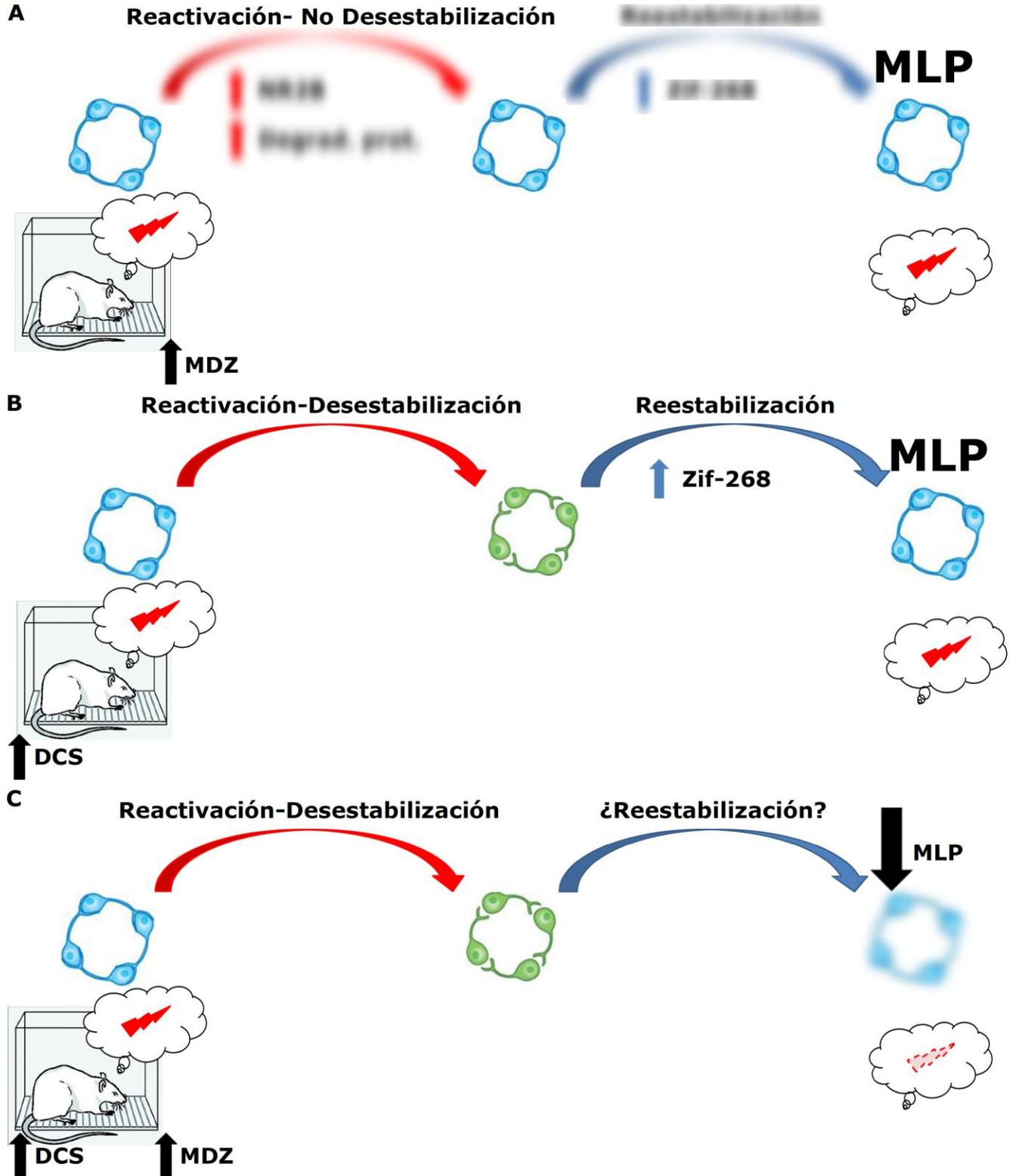


Figura 25. Resistencia de la memoria inducida por estrés. A) El estrés previo a la formación de la memoria impide la posterior ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación con la consecuente resistencia al efecto interferente de MDZ. B) La administración de DCS promueve la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación en memorias resistentes. C) La administración de DCS revierte la resistencia al efecto interferente de MDZ

Sin embargo, diversos trabajos han reportado que la combinación de ambas estrategias, es decir una sesión de extinción poco tiempo después de haber evocado la memoria, podría presentar ventajas respecto a una simple sesión de extinción. Se propone que este protocolo permite la incorporación de la memoria de extinción a la memoria original, la cual ha sido previamente desestabilizada (Monfils y *col.*, 2009; Quirk y *col.*, 2010; Schiller y *col.*, 2012). Además, no se observa recuperación espontánea en este tipo de terapia combinada, lo cual indicaría que la memoria ha sido actualizada con la información novedosa de la extinción, o en todo caso interferida.

No obstante, es necesario considerar que las psicopatologías antes mencionadas pueden estar asociadas a memorias sumamente robustas y que pueden presentar resistencia a la desestabilización. Por lo tanto, resulta necesario considerar que para poder modificar la memoria, sería necesario inducir antes la desestabilización de la misma (Beckers y Kindt, 2017). En este sentido, esta tesis en conjunto con otros trabajos sugiere que las memorias resistentes pueden ser desestabilizadas mediante el uso de DCS (Bustos y *col.*, 2010; Gazarini y *col.*, 2014; Ortiz y *col.*, 2015). Más aún, los agentes farmacológicos utilizados en este trabajo (MDZ, PROP y DCS) son ampliamente utilizados en humanos, con efectos y perfiles de toxicidad bien conocidos. Esto implica que sería posible el uso de estas combinaciones (DCS/MDZ ó DCS/PROP) para favorecer la desestabilización y la posterior interferencia de la memoria.

Así, los resultados obtenidos en esta tesis, en conjunto con otros antecedentes, permiten sugerir el siguiente modelo: **la exposición a una sesión de estrés agudo induce una disminución del control GABAérgico en ABL al menos hasta 24 horas después. El aprendizaje de miedo contextual bajo estas condiciones conduce a la formación de memorias resistentes a la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación. La resistencia es evidenciada por una ausencia de los mecanismos neurobiológicos que subyacen a dicho proceso, como el aumento en la expresión de NR2B, de proteínas poliubiquitinadas y del factor de transcripción Zif-268 (Figura 25A). Esto conduce a una pérdida de la dinámica de la memoria. Además, la activación de receptores NMDA durante a la evocación, los cuales contendrían presumiblemente la subunidad NR2B, facilita la desestabilización de la**

memoria, restableciendo la ocurrencia de los mecanismos que participan en el proceso de labilización/reconsolidación. En consecuencia, se restablecen las propiedades dinámicas de la memoria (Figura 25B).

CONCLUSION FINAL

Los resultados presentados en esta tesis apoyan la hipótesis general de que la instauración de un estado emocional negativo generado por estrés al momento de la formación de la memoria de miedo constituye un factor limitante que afecta las propiedades dinámicas de dicha memoria. En otras palabras, la exposición al estrés favorece la formación de memorias que exhiben una limitación en sus propiedades dinámicas, dificultando su tratamiento. Sin embargo, esa falta de flexibilidad puede ser revertida por la activación de receptores NMDA antes de la evocación, restableciendo la ocurrencia del proceso de labilización/reconsolidación.

REFERENCIAS

- Abel, T., & Lattal, K. M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol*, *11*, 180-187.
- Alberini, C. M. (2005). Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci*, *28*, 51-56.
- Alberini, C. M., & Ledoux, J. E. (2013). Memory reconsolidation. *Curr Biol*, *23*, R746-750.
- Alfei, J. M., Ferrer Monti, R. I., Molina, V. A., Bueno, A. M., & Urcelay, G. P. (2015). Prediction error and trace dominance determine the fate of fear memories after post-training manipulations. *Learn Mem*, *22*, 385-400.
- Baldi, E., & Bucherelli, C. (2015). Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. *Neurosci Biobehav Rev*, *53*, 160-190.
- Baratti, C. M., Boccia, M. M., Blake, M. G., & Acosta, G. B. (2008). Reactivated memory of an inhibitory avoidance response in mice is sensitive to a nitric oxide synthase inhibitor. *Neurobiol Learn Mem*, *89*, 426-440.
- Baumann, N., & Turpin, J. C. (2010). Neurochemistry of stress. An overview. *Neurochem Res*, *35*, 1875-1879.
- Bear, M. F. (1996). A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*, 13453-13459.
- Beckers, T., & Kindt, M. (2017). Memory Reconsolidation Interference as an Emerging Treatment for Emotional Disorders: Strengths, Limitations, Challenges, and Opportunities. *Annu Rev Clin Psychol*.
- Ben Mamou, C., Gamache, K., & Nader, K. (2006). NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nat Neurosci*, *9*, 1237-1239.
- Bernardi, R. E., Lattal, K. M., & Berger, S. P. (2006). Postretrieval propranolol disrupts a cocaine conditioned place preference. *Neuroreport*, *17*, 1443-1447.
- Besnard, A., Caboche, J., & Laroche, S. (2013). Recall and reconsolidation of contextual fear memory: differential control by ERK and Zif268 expression dosage. *PLoS One*, *8*, e72006.
- Bignante, E. A., Paglini, G., & Molina, V. A. (2010). Previous stress exposure enhances both anxiety-like behaviour and p35 levels in the basolateral amygdala complex: modulation by midazolam. *Eur Neuropsychopharmacol*, *20*, 388-397.
- Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (1972). Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J Comp Physiol Psychol*, *81*, 281-290.
- Blanchard, R. J., & Blanchard, D. C. (1969). Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol*, *67*, 370-375.
- Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, *361*, 31-39.
- Bliss, T. V., & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, *232*, 331-356.
- Bolshakov, V. Y. (2009). Nipping fear in the bud: inhibitory control in the amygdala. *Neuron*, *61*, 817-819.
- Bonilla-Jaime, H., Vazquez-Palacios, G., Arteaga-Silva, M., & Retana-Marquez, S. (2006). Hormonal responses to different sexually related conditions in male rats. *Horm Behav*, *49*, 376-382.
- Bonin, R. P., & De Koninck, Y. (2015). Reconsolidation and the regulation of plasticity: moving beyond memory. *Trends Neurosci*, *38*, 336-344.
- Boudreau, A. C., Milovanovic, M., Conrad, K. L., Nelson, C., Ferrario, C. R., & Wolf, M. E. (2012). A protein cross-linking assay for measuring cell surface expression of glutamate receptor subunits in the rodent brain after in vivo treatments. *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 5, Unit 5 30 31-19.
- 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.

- Bronson, F. H., & Desjardins, C. (1982). Endocrine responses to sexual arousal in male mice. *Endocrinology*, *111*, 1286-1291.
- Bustos, S. G., Giachero, M., Maldonado, H., & Molina, V. A. (2010). Previous stress attenuates the susceptibility to Midazolam's disruptive effect on fear memory reconsolidation: influence of pre-reactivation D-cycloserine administration. *Neuropsychopharmacology*, *35*, 1097-1108.
- Bustos, S. G., Maldonado, H., & Molina, V. A. (2006). Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. *Neuroscience*, *139*, 831-842.
- Bustos, S. G., Maldonado, H., & Molina, V. A. (2009). Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology*, *34*, 446-457.
- Cannon, W. B. (1935). Stress and strains of homeostasis. *Am. J. Med.Sci*, *189*, 1-14.
- Ciocchi, S., Herry, C., Grenier, F., Wolff, S. B., Letzkus, J. J., Vlachos, I., Ehrlich, I., Sprengel, R., Deisseroth, K., Stadler, M. B., Muller, C., & Luthi, A. (2010). Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. *Nature*, *468*, 277-282.
- Chattarji, S., Tomar, A., Suvrathan, A., Ghosh, S., & Rahman, M. M. (2015). Neighborhood matters: divergent patterns of stress-induced plasticity across the brain. *Nat Neurosci*, *18*, 1364-1375.
- Darwin, C. (1859). The origin of species by means of natural selection. *New York: D. Appleton and Company*.
- Davis, S., Vanhoutte, P., Pages, C., Caboche, J., & Laroche, S. (2000). The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci*, *20*, 4563-4572.
- de la Fuente, V., Freudenthal, R., & Romano, A. (2011). Reconsolidation or extinction: transcription factor switch in the determination of memory course after retrieval. *J Neurosci*, *31*, 5562-5573.
- De Oliveira Alvares, L., Crestani, A. P., Cassini, L. F., Haubrich, J., Santana, F., & Quillfeldt, J. A. (2013). Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*, *244*, 42-48.
- De Olmos, J. S., Beltramino, C. A., & Alheid, G. (2004). Amygdala and Extended Amygdala of the Rat: A Cytoarchitectonical, Fibroarchitectonical, and Chemoarchitectonical Survey. In: G. Paxinos, (Ed.), *The Rat Nervous System. Elsevier Academic Press, Amsterdam*, 509-603.
- Debiec, J., & Ledoux, J. E. (2004). Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. *Neuroscience*, *129*, 267-272.
- Debiec, J., LeDoux, J. E., & Nader, K. (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron*, *36*, 527-538.
- Delorenzi, A., Maza, F. J., Suarez, L. D., Barreiro, K., Molina, V. A., & Stehberg, J. (2014). Memory beyond expression. *J Physiol Paris*, *108*, 307-322.
- Dewar, M. T., Cowan, N., & Sala, S. D. (2007). Forgetting due to retroactive interference: a fusion of Muller and Pilzecker's (1900) early insights into everyday forgetting and recent research on anterograde amnesia. *Cortex*, *43*, 616-634.
- Diaz-Mataix, L., Ruiz Martinez, R. C., Schafe, G. E., LeDoux, J. E., & Doyere, V. (2013). Detection of a temporal error triggers reconsolidation of amygdala-dependent memories. *Curr Biol*, *23*, 467-472.
- Dudai, Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol*, *12*, 211-216.
- Duncan, C. P. (1949). The retroactive effect of electroshock on learning. *J Comp Physiol Psychol*, *42*, 32-44.
- Duvarci, S., & Nader, K. (2004). Characterization of fear memory reconsolidation. *J Neurosci*, *24*, 9269-9275.

- Duvarci, S., Nader, K., & LeDoux, J. E. (2005). Activation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning. *Eur J Neurosci*, *21*, 283-289.
- Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Cioocchi, S., Herry, C., & Luthi, A. (2009). Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron*, *62*, 757-771.
- Eichenbaum, H. (2003). Neurociencia cognitiva de la memoria. *Barcelona: Editorial Ariel*.
- Eisenberg, M., & Dudai, Y. (2004). Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in Medaka: old fears don't die. *Eur J Neurosci*, *20*, 3397-3403.
- Eisenberg, M., Kobil, T., Berman, D. E., & Dudai, Y. (2003). Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science*, *301*, 1102-1104.
- El Gaamouch, F., Buisson, A., Moustie, O., Lemieux, M., Labrecque, S., Bontempi, B., De Koninck, P., & Nicole, O. (2012). Interaction between alphaCaMKII and GluN2B controls ERK-dependent plasticity. *J Neurosci*, *32*, 10767-10779.
- Exton-McGuinness, M. T., Lee, J. L., & Reichelt, A. C. (2015). Updating memories--the role of prediction errors in memory reconsolidation. *Behav Brain Res*, *278*, 375-384.
- Fanselow, M. S., & Gale, G. D. (2003). The amygdala, fear, and memory. *Ann N Y Acad Sci*, *985*, 125-134.
- Finnie, P. S., & Nader, K. (2012). The role of metaplasticity mechanisms in regulating memory destabilization and reconsolidation. *Neurosci Biobehav Rev*, *36*, 1667-1707.
- Fioravante, D., & Byrne, J. H. (2011). Protein degradation and memory formation. *Brain Res Bull*, *85*, 14-20.
- Flavell, C. R., Lambert, E. A., Winters, B. D., & Bredy, T. W. (2013). Mechanisms governing the reactivation-dependent destabilization of memories and their role in extinction. *Front Behav Neurosci*, *7*, 214.
- Forcato, C., Argibay, P. F., Pedreira, M. E., & Maldonado, H. (2009). Human reconsolidation does not always occur when a memory is retrieved: the relevance of the reminder structure. *Neurobiol Learn Mem*, *91*, 50-57.
- Forcato, C., Fernandez, R. S., & Pedreira, M. E. (2014). Strengthening a consolidated memory: the key role of the reconsolidation process. *J Physiol Paris*, *108*, 323-333.
- Forcato, C., Rodriguez, M. L., Pedreira, M. E., & Maldonado, H. (2010). Reconsolidation in humans opens up declarative memory to the entrance of new information. *Neurobiol Learn Mem*, *93*, 77-84.
- Frankland, P. W., Ding, H. K., Takahashi, E., Suzuki, A., Kida, S., & Silva, A. J. (2006). Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learn Mem*, *13*, 451-457.
- Frenkel, L., Maldonado, H., & Delorenzi, A. (2005). Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water deprivation via brain angiotensin II. *Eur J Neurosci*, *22*, 1757-1766.
- Fukushima, H., Zhang, Y., Archbold, G., Ishikawa, R., Nader, K., & Kida, S. (2014). Enhancement of fear memory by retrieval through reconsolidation. *Elife*, *3*, e02736.
- Gazarini, L., Stern, C. A., Piornedo, R. R., Takahashi, R. N., & Bertoglio, L. J. (2014). PTSD-like memory generated through enhanced noradrenergic activity is mitigated by a dual step pharmacological intervention targeting its reconsolidation. *Int J Neuropsychopharmacol*, *18*.
- Giachero, M., Bustos, S. G., Calfa, G., & Molina, V. A. (2013a). A BDNF sensitive mechanism is involved in the fear memory resulting from the interaction between stress and the retrieval of an established trace. *Learn Mem*, *20*, 245-255.
- Giachero, M., Calfa, G. D., & Molina, V. A. (2013b). Hippocampal structural plasticity accompanies the resulting contextual fear memory following stress and fear conditioning. *Learn Mem*, *20*, 611-616.

- Giachero, M., Calfa, G. D., & Molina, V. A. (2015). Hippocampal dendritic spines remodeling and fear memory are modulated by GABAergic signaling within the basolateral amygdala complex. *Hippocampus*, *25*, 545-555.
- Gordon, W. C. (1977). Similarities of Recently Acquired and Reactivated Memories in Interference. *American Journal of Psychology*, *90*, 231-242.
- Groc, L., Bard, L., & Choquet, D. (2009). Surface trafficking of N-methyl-D-aspartate receptors: physiological and pathological perspectives. *Neuroscience*, *158*, 4-18.
- Hall, J., Thomas, K. L., & Everitt, B. J. (2001a). Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J Neurosci*, *21*, 2186-2193.
- Hall, J., Thomas, K. L., & Everitt, B. J. (2001b). Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala. *Eur J Neurosci*, *13*, 1453-1458.
- Hall, R. A., & Soderling, T. R. (1997). Differential surface expression and phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1 and NR2 in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem*, *272*, 4135-4140.
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., & Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*, *5*, 405-414.
- Haubrich, J., Crestani, A. P., Cassini, L. F., Santana, F., Sierra, R. O., Alvares Lde, O., & Quillfeldt, J. A. (2015). Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. *Neuropsychopharmacology*, *40*, 315-326.
- Haubrich, J., & Nader, K. (2016). Memory Reconsolidation. *Curr Top Behav Neurosci*.
- Hebb, D. O. (1949). The organization of behavior: a neuropsychological theory. *Wiley*.
- Hegde, A. N. (2017). Proteolysis, synaptic plasticity and memory. *Neurobiol Learn Mem*, *138*, 98-110.
- Hill, M. N., & McEwen, B. S. (2009). Endocannabinoids: The silent partner of glucocorticoids in the synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*, 4579-4580.
- Holehonnur, R., Phensy, A. J., Kim, L. J., Milivojevic, M., Vuong, D., Daison, D. K., Alex, S., Tiner, M., Jones, L. E., Kroener, S., & Ploski, J. E. (2016). Increasing the GluN2A/GluN2B Ratio in Neurons of the Mouse Basal and Lateral Amygdala Inhibits the Modification of an Existing Fear Memory Trace. *J Neurosci*, *36*, 9490-9504.
- Hong, I., Kim, J., Lee, S., Ko, H. G., Nader, K., Kaang, B. K., Tsien, R. W., & Choi, S. (2013). AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*, 8218-8223.
- Inda, M. C., Muravieva, E. V., & Alberini, C. M. (2011). Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *J Neurosci*, *31*, 1635-1643.
- Isoardi, N. A., Bertotto, M. E., Martijena, I. D., Molina, V. A., & Carrer, H. F. (2007). Lack of feedback inhibition on rat basolateral amygdala following stress or withdrawal from sedative-hypnotic drugs. *Eur J Neurosci*, *26*, 1036-1044.
- Izquierdo, I., Furini, C. R., & Myskiw, J. C. (2016). Fear Memory. *Physiol Rev*, *96*, 695-750.
- James, A. B., Conway, A. M., & Morris, B. J. (2005). Genomic profiling of the neuronal target genes of the plasticity-related transcription factor -- Zif268. *J Neurochem*, *95*, 796-810.
- Janak, P. H., & Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, *517*, 284-292.
- Jarome, T. J., Ferrara, N. C., Kwapis, J. L., & Helmstetter, F. J. (2016). CaMKII regulates proteasome phosphorylation and activity and promotes memory destabilization following retrieval. *Neurobiol Learn Mem*, *128*, 103-109.
- Jarome, T. J., & Helmstetter, F. J. (2013). The ubiquitin-proteasome system as a critical regulator of synaptic plasticity and long-term memory formation. *Neurobiol Learn Mem*, *105*, 107-116.

- Jarome, T. J., Werner, C. T., Kwapis, J. L., & Helmstetter, F. J. (2011). Activity dependent protein degradation is critical for the formation and stability of fear memory in the amygdala. *PLoS One*, *6*, e24349.
- Johansen, J. P., Cain, C. K., Ostroff, L. E., & LeDoux, J. E. (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, *147*, 509-524.
- Kaang, B. K., Lee, S. H., & Kim, H. (2009). Synaptic protein degradation as a mechanism in memory reorganization. *Neuroscientist*, *15*, 430-435.
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, *294*, 1030-1038.
- Kandel, E. R. (2007). En busca de la memoria: nacimiento de una nueva ciencia de la mente. *Buenos Aires: Katz Editores*.
- Kida, S., Josselyn, S. A., Pena de Ortiz, S., Kogan, J. H., Chevere, I., Masushige, S., & Silva, A. J. (2002). CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci*, *5*, 348-355.
- Kim, M. J., Dunah, A. W., Wang, Y. T., & Sheng, M. (2005). Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron*, *46*, 745-760.
- Kindt, M., Soeter, M., & Sevenster, D. (2014). Disrupting reconsolidation of fear memory in humans by a noradrenergic beta-blocker. *J Vis Exp*.
- Knapska, E., Radwanska, K., Werka, T., & Kaczmarek, L. (2007). Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. *Physiol Rev*, *87*, 1113-1173.
- Konorski, J. (1948). Conditioned reflexes and neuron organization. *University Press*.
- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., Flugge, G., Korte, S. M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M., & Fuchs, E. (2011). Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev*, *35*, 1291-1301.
- Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Manasian, Y., Ivanov, A., Tyzio, R., Pellegrino, C., Ben-Ari, Y., Clapham, D. E., & Medina, I. (2003). The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron*, *40*, 775-784.
- Kroes, M. C., Schiller, D., LeDoux, J. E., & Phelps, E. A. (2016). Translational Approaches Targeting Reconsolidation. *Curr Top Behav Neurosci*, *28*, 197-230.
- Lagasse, F., Devaud, J. M., & Mery, F. (2009). A switch from cycloheximide-resistant consolidated memory to cycloheximide-sensitive reconsolidation and extinction in *Drosophila*. *J Neurosci*, *29*, 2225-2230.
- Lazarus, R., Deese, J., & Osler, S. F. (1952). The effects of psychological stress upon performance. *Psychol Bull*, *49*, 293-317.
- Leaderbrand, K., Corcoran, K. A., & Radulovic, J. (2014). Co-activation of NR2A and NR2B subunits induces resistance to fear extinction. *Neurobiol Learn Mem*, *113*, 35-40.
- LeDoux, J. (2007). The amygdala. *Curr Biol*, *17*, R868-874.
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*, *23*, 155-184.
- Lee, J. L. (2008). Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci*, *11*, 1264-1266.
- Lee, J. L. (2009). Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends Neurosci*, *32*, 413-420.
- Lee, J. L. (2010). Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Front Behav Neurosci*, *4*, 168.
- Lee, J. L., Everitt, B. J., & Thomas, K. L. (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*, *304*, 839-843.

- Lee, J. L., & Hynds, R. E. (2013). Divergent cellular pathways of hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Hippocampus*, *23*, 233-244.
- Lee, J. L., Milton, A. L., & Everitt, B. J. (2006). Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *J Neurosci*, *26*, 10051-10056.
- Lee, S. H., Choi, J. H., Lee, N., Lee, H. R., Kim, J. I., Yu, N. K., Choi, S. L., Kim, H., & Kaang, B. K. (2008). Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science*, *319*, 1253-1256.
- Lee, S. H., Kwak, C., Shim, J., Kim, J. E., Choi, S. L., Kim, H. F., Jang, D. J., Lee, J. A., Lee, K., Lee, C. H., Lee, Y. D., Miniaci, M. C., Bailey, C. H., Kandel, E. R., & Kaang, B. K. (2012). A cellular model of memory reconsolidation involves reactivation-induced destabilization and restabilization at the sensorimotor synapse in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*, 14200-14205.
- Letzkus, J. J., Wolff, S. B., & Luthi, A. (2015). Disinhibition, a Circuit Mechanism for Associative Learning and Memory. *Neuron*, *88*, 264-276.
- Levine, S., & Ursin, H. (1991). What is stress? In: Brown, M. R.; Koob, G. F.; Rivier, C. (Eds.). *Stress: Neurobiology and Neuroendocrinology*. Marcel Dekker, inc., New York, pp. 3-21.
- Lewis, D. J. (1979). Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol Bull*, *86*, 1054-1083.
- Lip, P. Z., Demasi, M., & Bonatto, D. (2017). The role of the ubiquitin proteasome system in the memory process. *Neurochem Int*, *102*, 57-65.
- Liu, L., Wong, T. P., Pozza, M. F., Lingenhoehl, K., Wang, Y., Sheng, M., Auberson, Y. P., & Wang, Y. T. (2004). Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science*, *304*, 1021-1024.
- Liu, M., & Glowa, J. R. (2000). Regulation of benzodiazepine receptor binding and GABA(A) subunit mRNA expression by punishment and acute alprazolam administration. *Brain Res*, *887*, 23-33.
- Loftis, J. M., & Janowsky, A. (2003). The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacol Ther*, *97*, 55-85.
- Lu, Y. M., Mansuy, I. M., Kandel, E. R., & Roder, J. (2000). Calcineurin-mediated LTD of GABAergic inhibition underlies the increased excitability of CA1 neurons associated with LTP. *Neuron*, *26*, 197-205.
- Machado, I., Gonzalez, P. V., Vilcaes, A., Carniglia, L., Schioth, H. B., Lasaga, M., & Scimonelli, T. N. (2015). Interleukin-1beta-induced memory reconsolidation impairment is mediated by a reduction in glutamate release and zif268 expression and alpha-melanocyte-stimulating hormone prevented these effects. *Brain Behav Immun*, *46*, 137-146.
- Maddox, S. A., Monsey, M. S., & Schafe, G. E. (2011). Early growth response gene 1 (Egr-1) is required for new and reactivated fear memories in the lateral amygdala. *Learn Mem*, *18*, 24-38.
- Maldonado, N. M., Espejo, P. J., Martijena, I. D., & Molina, V. A. (2014). Activation of ERK2 in basolateral amygdala underlies the promoting influence of stress on fear memory and anxiety: influence of midazolam pretreatment. *Eur Neuropsychopharmacol*, *24*, 262-270.
- Maldonado, N. M., Martijena, I. D., & Molina, V. A. (2011). Facilitating influence of stress on the consolidation of fear memory induced by a weak training: reversal by midazolam pretreatment. *Behav Brain Res*, *225*, 77-84.
- Malkani, S., Wallace, K. J., Donley, M. P., & Rosen, J. B. (2004). An egr-1 (zif268) antisense oligodeoxynucleotide infused into the amygdala disrupts fear conditioning. *Learn Mem*, *11*, 617-624.
- Mamiya, N., Fukushima, H., Suzuki, A., Matsuyama, Z., Homma, S., Frankland, P. W., & Kida, S. (2009). Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *J Neurosci*, *29*, 402-413.

- Mao, S. C., Lin, H. C., & Gean, P. W. (2008). Augmentation of fear extinction by D-cycloserine is blocked by proteasome inhibitors. *Neuropsychopharmacology*, *33*, 3085-3095.
- Maren, S. (2001). Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci*, *24*, 897-931.
- Maren, S., & Fanselow, M. S. (1995). Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *J Neurosci*, *15*, 7548-7564.
- Maren, S., Phan, K. L., & Liberzon, I. (2013). The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci*, *14*, 417-428.
- Martijena, I. D., Calvo, N., Volosin, M., & Molina, V. A. (1997). Prior exposure to a brief restraint session facilitates the occurrence of fear in response to a conflict situation: behavioral and neurochemical correlates. *Brain Res*, *752*, 136-142.
- Martijena, I. D., & Molina, V. A. (2012). The influence of stress on fear memory processes. *Braz J Med Biol Res*, *45*, 308-313.
- Martijena, I. D., Rodriguez Manzanares, P. A., Lacerra, C., & Molina, V. A. (2002). Gabaergic modulation of the stress response in frontal cortex and amygdala. *Synapse*, *45*, 86-94.
- Massey, P. V., Johnson, B. E., Moulton, P. R., Auberson, Y. P., Brown, M. W., Molnar, E., Collingridge, G. L., & Bashir, Z. I. (2004). Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci*, *24*, 7821-7828.
- McEwen, B. S., & Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav*, *43*, 2-15.
- McGaugh, J. L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science*, *287*, 248-251.
- McGaugh, J. L., & Roozendaal, B. (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr Opin Neurobiol*, *12*, 205-210.
- Meir Drexler, S., & Wolf, O. T. (2016). The role of glucocorticoids in emotional memory reconsolidation. *Neurobiol Learn Mem*.
- Merlo, E., Freudenthal, R., Maldonado, H., & Romano, A. (2005). Activation of the transcription factor NF-kappaB by retrieval is required for long-term memory reconsolidation. *Learn Mem*, *12*, 23-29.
- Milekic, M. H., & Alberini, C. M. (2002). Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron*, *36*, 521-525.
- Milton, A. L., Lee, J. L., Butler, V. J., Gardner, R., & Everitt, B. J. (2008a). Intra-amygdala and systemic antagonism of NMDA receptors prevents the reconsolidation of drug-associated memory and impairs subsequently both novel and previously acquired drug-seeking behaviors. *J Neurosci*, *28*, 8230-8237.
- Milton, A. L., Lee, J. L., & Everitt, B. J. (2008b). Reconsolidation of appetitive memories for both natural and drug reinforcement is dependent on {beta}-adrenergic receptors. *Learn Mem*, *15*, 88-92.
- Milton, A. L., Merlo, E., Ratano, P., Gregory, B. L., Dumbreck, J. K., & Everitt, B. J. (2013). Double dissociation of the requirement for GluN2B- and GluN2A-containing NMDA receptors in the destabilization and restabilization of a reconsolidating memory. *J Neurosci*, *33*, 1109-1115.
- Misanin, J. R., Miller, R. R., & Lewis, D. J. (1968). Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science*, *160*, 554-555.
- Miyashiro, K., Dichter, M., & Eberwine, J. (1994). On the nature and differential distribution of mRNAs in hippocampal neurites: implications for neuronal functioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*, 10800-10804.
- Mohler, H., & Rudolph, U. (2017). Disinhibition, an emerging pharmacology of learning and memory. *F1000Res*, *6*.

- Monaco, S. A., Gulchina, Y., & Gao, W. J. (2015). NR2B subunit in the prefrontal cortex: A double-edged sword for working memory function and psychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, *56*, 127-138.
- Monfils, M. H., Cowansage, K. K., Klann, E., & LeDoux, J. E. (2009). Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. *Science*, *324*, 951-955.
- Nader, K. (2015). Reconsolidation and the Dynamic Nature of Memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *7*, a021782.
- Nader, K., & Hardt, O. (2009). A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci*, *10*, 224-234.
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, *406*, 722-726.
- Nicholls, R. E., Alarcon, J. M., Malleret, G., Carroll, R. C., Grody, M., Vronskaya, S., & Kandel, E. R. (2008). Transgenic mice lacking NMDAR-dependent LTD exhibit deficits in behavioral flexibility. *Neuron*, *58*, 104-117.
- Orsini, C. A., & Maren, S. (2012). Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neurosci Biobehav Rev*, *36*, 1773-1802.
- Ortiz, V., Giachero, M., Espejo, P. J., Molina, V. A., & Martijena, I. D. (2015). The effect of Midazolam and Propranolol on fear memory reconsolidation in ethanol-withdrawn rats: influence of d-cycloserine. *Int J Neuropsychopharmacol*, *18*.
- Pape, H. C., & Pare, D. (2010). Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiol Rev*, *90*, 419-463.
- Pavlov, I. P., & Anrep, G. V. (1927). Conditioned Reflexes. *Courier Dover Publications*.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2009). *The rat brain in stereotaxic coordinates: 6th edition*.
- Pedreira, M. E., & Maldonado, H. (2003). Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*, *38*, 863-869.
- Pedreira, M. E., Perez-Cuesta, L. M., & Maldonado, H. (2004). Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction. *Learn Mem*, *11*, 579-585.
- Perez-Cuesta, L. M., & Maldonado, H. (2009). Memory reconsolidation and extinction in the crab: mutual exclusion or coexistence? *Learn Mem*, *16*, 714-721.
- Portero-Tresserra, M., Marti-Nicolovius, M., Guillazo-Blanch, G., Boadas-Vaello, P., & Vale-Martinez, A. (2013). D-cycloserine in the basolateral amygdala prevents extinction and enhances reconsolidation of odor-reward associative learning in rats. *Neurobiol Learn Mem*, *100*, 1-11.
- Przybyslawski, J., Rouillet, P., & Sara, S. J. (1999). Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J Neurosci*, *19*, 6623-6628.
- Quirk, G. J., Pare, D., Richardson, R., Herry, C., Monfils, M. H., Schiller, D., & Vicentic, A. (2010). Erasing fear memories with extinction training. *J Neurosci*, *30*, 14993-14997.
- Rao-Ruiz, P., Rotaru, D. C., van der Loo, R. J., Mansvelter, H. D., Stiedl, O., Smit, A. B., & Spijker, S. (2011). Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. *Nat Neurosci*, *14*, 1302-1308.
- Reichelt, A. C., Exton-McGuinness, M. T., & Lee, J. L. (2013). Ventral tegmental dopamine dysregulation prevents appetitive memory destabilization. *J Neurosci*, *33*, 14205-14210.
- Ren, J., Li, X., Zhang, X., Li, M., Wang, Y., & Ma, Y. (2013). The effects of intra-hippocampal microinfusion of D-cycloserine on fear extinction, and the expression of NMDA receptor subunit NR2B and neurogenesis in the hippocampus in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *44*, 257-264.

- Rodrigues, S. M., Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2004). Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron*, *44*, 75-91.
- Rodriguez-Ortiz, C. J., De la Cruz, V., Gutierrez, R., & Bermudez-Rattoni, F. (2005). Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learn Mem*, *12*, 533-537.
- Rodriguez Manzanares, P. A., Isoardi, N. A., Carrer, H. F., & Molina, V. A. (2005). Previous stress facilitates fear memory, attenuates GABAergic inhibition, and increases synaptic plasticity in the rat basolateral amygdala. *J Neurosci*, *25*, 8725-8734.
- Rogan, M. T., Staubli, U. V., & LeDoux, J. E. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, *390*, 604-607.
- Romero, L. M., Dickens, M. J., & Cyr, N. E. (2009). The Reactive Scope Model - a new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. *Horm Behav*, *55*, 375-389.
- Roozendaal, B., McEwen, B. S., & Chattarji, S. (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci*, *10*, 423-433.
- Rudy, J. W. (2008). Destroying memories to strengthen them. *Nat Neurosci*, *11*, 1241-1242.
- Sanders, M. J., Wiltgen, B. J., & Fanselow, M. S. (2003). The place of the hippocampus in fear conditioning. *Eur J Pharmacol*, *463*, 217-223.
- Sara, S. J. (2000). Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem*, *7*, 73-84.
- Schiller, D., & Phelps, E. A. (2011). Does reconsolidation occur in humans? *Front Behav Neurosci*, *5*, 24.
- Schiller, D., Raio, C. M., & Phelps, E. A. (2012). Extinction training during the reconsolidation window prevents recovery of fear. *J Vis Exp*, e3893.
- Schneider, A. M., & Sherman, W. (1968). Amnesia: a function of the temporal relation of footshock to electroconvulsive shock. *Science*, *159*, 219-221.
- Sevenster, D., Beckers, T., & Kindt, M. (2012). Retrieval per se is not sufficient to trigger reconsolidation of human fear memory. *Neurobiol Learn Mem*, *97*, 338-345.
- Sevenster, D., Beckers, T., & Kindt, M. (2013). Prediction error governs pharmacologically induced amnesia for learned fear. *Science*, *339*, 830-833.
- Sevenster, D., Beckers, T., & Kindt, M. (2014). Prediction error demarcates the transition from retrieval, to reconsolidation, to new learning. *Learn Mem*, *21*, 580-584.
- Sierra-Mercado, D., Padilla-Coreano, N., & Quirk, G. J. (2011). Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, *36*, 529-538.
- Skinner, B. F. (1975). The shaping of phylogenic behavior. *J Exp Anal Behav*, *24*, 117-120.
- Soeter, M., & Kindt, M. (2011). Disrupting reconsolidation: pharmacological and behavioral manipulations. *Learn Mem*, *18*, 357-366.
- Sol Fustinana, M., de la Fuente, V., Federman, N., Freudenthal, R., & Romano, A. (2014). Protein degradation by ubiquitin-proteasome system in formation and labilization of contextual conditioning memory. *Learn Mem*, *21*, 478-487.
- Squire, L. R. (2009). The legacy of patient H.M. for neuroscience. *Neuron*, *61*, 6-9.
- Squire, L. R., & Zola-Morgan, S. (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science*, *253*, 1380-1386.
- Sterling, P., & Eyer, J. (1988). Allostasis: A New Paradigm to Explain Arousal Pathology. In: Fisher, S.; Reason, J (Eds.). Handbook of life Stress, Cognition and Health. *Oxford UNiverstiy Press, Oxford*, pp 629-650.

- Suzuki, A., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., Masushige, S., Silva, A. J., & Kida, S. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci*, *24*, 4787-4795.
- Takeuchi, T., Duzsikiewicz, A. J., & Morris, R. G. (2014). The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *369*, 20130288.
- Thompson, R. F., & Kim, J. J. (1996). Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*, 13438-13444.
- Torregrossa, M. M., & Taylor, J. R. (2016). Neuroscience of learning and memory for addiction medicine: from habit formation to memory reconsolidation. *Prog Brain Res*, *223*, 91-113.
- Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol*, *8*, 205-215.
- Tronel, S., Milekic, M. H., & Alberini, C. M. (2005). Linking new information to a reactivated memory requires consolidation and not reconsolidation mechanisms. *PLoS Biol*, *3*, e293.
- Tronson, N. C., & Taylor, J. R. (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci*, *8*, 262-275.
- Tronson, N. C., Wiseman, S. L., Olausson, P., & Taylor, J. R. (2006). Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. *Nat Neurosci*, *9*, 167-169.
- Veyrac, A., Besnard, A., Caboche, J., Davis, S., & Laroche, S. (2014). The transcription factor Zif268/Egr1, brain plasticity, and memory. *Prog Mol Biol Transl Sci*, *122*, 89-129.
- Wang, S. H., de Oliveira Alvares, L., & Nader, K. (2009). Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nat Neurosci*, *12*, 905-912.
- Wang, S. H., & Morris, R. G. (2010). Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation, and reconsolidation. *Annu Rev Psychol*, *61*, 49-79, C41-44.
- Weiskrantz, L. (1956). Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *J Comp Physiol Psychol*, *49*, 381-391.
- Winters, B. D., Tucci, M. C., & DaCosta-Furtado, M. (2009). Older and stronger object memories are selectively destabilized by reactivation in the presence of new information. *Learn Mem*, *16*, 545-553.
- Wolff, S. B., Grundemann, J., Tovote, P., Krabbe, S., Jacobson, G. A., Müller, C., Herry, C., Ehrlich, I., Friedrich, R. W., Letzkus, J. J., & Luthi, A. (2014). Amygdala interneuron subtypes control fear learning through disinhibition. *Nature*, *509*, 453-458.
- Worley, P. F., Christy, B. A., Nakabeppu, Y., Bhat, R. V., Cole, A. J., & Baraban, J. M. (1991). Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*, 5106-5110.
- Wu, I. T., Tang, T. H., Ko, M. C., Chiu, C. Y., & Lu, K. T. (2015). Amygdaloid zif268 participated in the D-cycloserine facilitation effect on the extinction of conditioned fear. *Psychopharmacology (Berl)*, *232*, 3809-3819.
- Yu, Y. J., Huang, C. H., Chang, C. H., & Gean, P. W. (2016). Involvement of protein phosphatases in the destabilization of methamphetamine-associated contextual memory. *Learn Mem*, *23*, 486-493.

PRODUCCION

CIENTIFICA

Artículos publicados a partir de los resultados de esta tesis

Stress-induced resistance to the fear memory labilization/reconsolidation process. Involvement of the basolateral amygdala complex.

Espejo PJ, Ortiz V, Martijena ID, Molina VA.

Neuropharmacology. 2016 Jul 1;109:349-356.

GABAergic signaling within the Basolateral Amygdala Complex modulates resistance to the labilization/reconsolidation process.

Espejo PJ, Ortiz V, Martijena ID, Molina VA.

Neurobiol Learn Mem. 2017. En revisión

Artículos en colaboración

Activation of the ERK 2 pathway in Basolateral amygdala underlies the promoting influence of stress on fear memory and anxiety: Influence of midazolam pretreatment.

Maldonado NM, **Espejo P**; Martijena ID, Molina VA.

Europ. Neuropsychopharmacology. 2014 Feb;24(2):262-70.

The effect of midazolam and propranolol on fear memory reconsolidation in ethanol-withdrawn rats: influence of d-cycloserine.

Ortiz V, Giachero M, **Espejo PJ**, Molina VA, Martijena ID.

Int J Neuropsychopharmacol. 2015 Jan 23;18(4).