



MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS IMPLICADOS EN LA EVOCACIÓN DE UNA MEMORIA DE MIEDO EN ANIMALES ABSTINENTES AL ETANOL

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Bioquímica Vanesa Ortiz

IFEC - CONICET
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
ARGENTINA
2016

COMISIÓN DE TESIS

Dra. Liliana Marina Cancela

Dra. María Ana Contín

Dr. Alfredo Lorenzo

Dra. Irene Delia Martijena
(Directora)

EVALUADOR EXTERNO

Dra. María Eugenia Pedreira

El presente trabajo de tesis ha sido realizado en el Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC) perteneciente al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, de acuerdo a la reglamentación vigente en dicha facultad para optar por el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Para la realización de este trabajo la autora contó con una beca de iniciación de doctorado de la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC; 2011-2015) y una beca de finalización de doctorado del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET; 2015-2017). Además contó con el apoyo financiero de subsidios otorgados por el CONICET, la Universidad Nacional de Córdoba, el Ministerio de Ciencia y Tecnología del Gobierno de Córdoba y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (FONCyT).

Se cumplimentó con los cursos requeridos y se realizaron actividades docentes en las asignaturas Anatomía, Fisiología y Fisiopatología Humanas I y II de la carrera de Farmacia, contando para ello con un cargo de Profesor Asistente (dedicación simple) obtenido por concurso.

“La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y ser ignorante”

Miguel de Unamuno

A mi familia,

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Irene Martijena por haber depositado su confianza en mí, por acompañarme con cariño y dedicación, estimularme y contenerme en cada momento. Porque además de ser mi jefa supo ser mi amiga y consejera.

A los miembros de la comisión de tesis, a la Dra. Cancela, a la Dra. Contín y al Dr. Lorenzo por sus valiosos aportes, críticas y sugerencias durante la realización de esta tesis doctoral.

A la Dra. Pedreira, por dedicar tiempo a la revisión de esta tesis como evaluador externo.

Al Departamento de Farmacología IFEC-CONICET, por brindarme el espacio y el equipamiento para el desarrollo de este trabajo de investigación.

A SECyT y CONICET, por el apoyo económico brindado.

A todos los profesores del Dpto de Farmacología, por formar un hermoso ambiente de trabajo y por el cariño brindado. Al Dr. Calfa y a la Dra. Scimonelli, por sus aportes a mi crecimiento científico y docente. Especialmente, al Dr. Víctor Molina, por enriquecer mi formación profesional con el debate científico, por sus valiosos consejos y su constante motivación.

A Marcelo y Noelia, por su ayuda en la realización de algunos experimentos de esta tesis. A Pato e Iva, por la colaboración desinteresada en responder a mis múltiples inquietudes científicas y técnicas. A Pablo, por ser un gran compañero de trabajo y por su ayuda incondicional.

A la Dra. Canavoso y la Dra. Leyria del Dpto de Bioquímica Clínica, por su ayuda en la realización del ensayo de actividad enzimática.

A Lorena y Estela, por su asistencia técnica y buena predisposición. A Silvia y María José, por la resolución de múltiples asuntos administrativos. A Yani, Nico y Javi, por su permanente colaboración en el bioterio. A todos ellos, por el cariño y la alegría que me brindaron.

A mis compañeros de laboratorio, Ale, Pato, Iva, Flor, Mara, Marisa, Lau Gabach, Coti García, Marcelo, Pablo, Coti Paz, Silvi, Beta, Mariana, Sami, Lau D, Noelia, Eve, Nati, Andre, Guada, Dai, Romi, Pau Avalos, Pau Albrecht, Luz, Maca, Martín, Emi, Vicky, Ceci P., Ceci G., porque en mayor o menor medida han sido parte de mi crecimiento profesional y personal durante esta tesis.

A Ale, Pato, Iva y Flor, por escucharme, ayudarme y acompañarme siempre. Por su complicidad y contención. Por su valiosa amistad.

A Mara, Marisa, Lau G y Monona por las charlas, los viajes y las risas compartidas, por tantos momentos inolvidables.

A Romi, Chaly, Caro, Guille, Noe, Lau, Flor y Sole, por estar conmigo siempre sin importar el tiempo ni la distancia, por su incondicionalidad.

A mis padres que me dieron todo para ser lo que soy, con un amor y una entrega inagotables, por alentarme ante cada meta, por enseñarme con su ejemplo que cualquier obstáculo se puede superar y que a través del esfuerzo todo es posible. A mis hermanas, por acompañarme y apoyarme en todos los momentos de mi vida, por su complicidad y aliento. A mis sobrinos, por traer luz y amor a mi vida. A mis abuelos Titi y Bato, por guiarme y acompañarme, por enseñarme a crear y a creer, a dar todo por cumplir mis sueños. A todos ellos, por ser mi motor, mi principal motivación.

A todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron o participaron en la realización de esta tesis, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

ABREVIATURAS

ABL: complejo basolateral de la amígdala

AC: adenilato ciclasa

AMC: péptido fluorogénico Suc-LLVY-AMC

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

ANOVA: análisis de varianza

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BA: brazos abiertos

BC: brazos cerrados

BSA: albúmina sérica bovina

BS3: bis(sulfosuccinidil)suberato

Ca²⁺: calcio

CaMKII: calcio-calmodulina kinasa II

CeA: núcleo central amigdalino

CM: condicionamiento de miedo

CMC: condicionamiento de miedo contextual

CON: animales controles

CRE: elemento que responde a AMPc

CREB: proteína de unión al elemento que responde a AMPc

CSA: cerveza sin alcohol

DCS: D-cicloserina

DPS: densidad post-sináptica

EC: estímulo condicionado

E.E.M: error estándar de la media

EI: estímulo incondicionado

ERK: proteínas kinasas reguladas por señales extracelulares

ETOH: animales abstinentes al etanol

GABA: ácido γ -amino butírico

GKAP: proteína asociada a guanilato kinasa

i.p: intraperitoneal

LEC: laberinto en cruz elevado

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos

MCP: memoria a corto plazo

MDZ: midazolam

MLP: memoria a largo plazo

mPFC: corteza prefrontal medial

m-TOR: diana de rapamicina en células de mamíferos

NF- κ B: factor nuclear kappa B

NIMO: nimodipina

NMDA: N-metil-D-aspartato

Npas4: proteína neuronal de dominio PAS 4

NR: no reactivado

NT: no tratadas con BS3

PKA: proteína kinasa A

PPubiq: proteínas poliubiquitinadas

PROP: propranolol

R: reactivado

RC: respuesta condicionada

RI: respuesta incondicionada

R-AMPA: receptor AMPA

R-GABA-A: receptor GABA-A

R-NMDA: receptor NMDA

R-NMDA(GluN2B): receptor NMDA que contiene la subunidad GluN2B

R- β A: receptor β -adrenérgico

SAL: solución salina estéril al 0,9%

s.c: subcutánea

SDS: dodecil sulfato sódico

SUP: sistema ubiquitina-proteosoma

T: tratadas con BS3

TTBS: solución tampón tris-salina-tween

VEH: vehículo

Zif-268 (Egr-1): factor de respuesta temprana al crecimiento 1

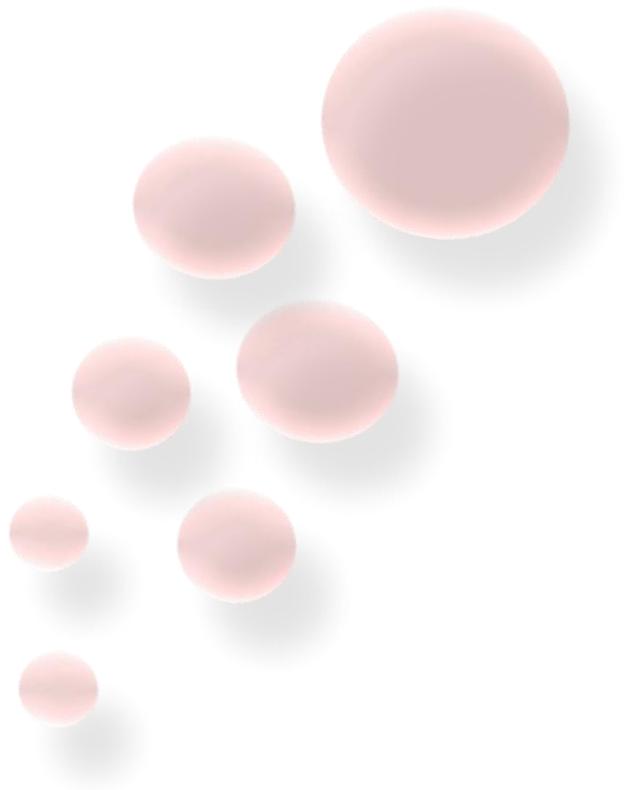
ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
ALCOHOLISMO	5
-Adicción.....	5
-Dependencia al alcohol.....	6
APRENDIZAJE Y MEMORIA.....	10
-Generalidades	10
-Fases de procesamiento de la memoria	11
-Memoria de miedo	13
-Condicionamiento de miedo clásico.....	14
ALCOHOLISMO Y MEMORIAS DE MIEDO.....	19
RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA.....	21
-Generalidades	21
-Estudio del proceso de reconsolidación	23
-Neurobiología del proceso de Labilización-Reconsolidación de una memoria de miedo.....	25
BLOQUEO DEL PROCESO DE RECONSOLIDACIÓN DE MEMORIAS MALADAPTATIVAS.....	30
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	34
HIPÓTESIS.....	35
OBJETIVO GENERAL	36

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
MATERIALES Y MÉTODOS	38
GENERALIDADES METODOLÓGICAS	39
Animales	39
Administración crónica de etanol	40
Determinación de la alcoholemia	40
Drogas.....	41
Cirugía estereotáxica y microinyección intracerebral.....	41
ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO ANIMAL.....	43
Condicionamiento de miedo contextual.....	43
Estímulo positivo	45
Laberinto en cruz elevado.....	46
Contexto novedoso	47
ESTUDIOS BIOQUÍMICOS	48
Disección	48
Preparación de la muestras.....	48
Western Blot	51
Estudio de la actividad catalítica del proteosoma	52
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	52

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
CAPÍTULO I: “Efecto de Midazolam, Propranolol y un estímulo positivo sobre la reconsolidación de una memoria de miedo en animales abstinentes al etanol”	56
CAPÍTULO II: “Participación del complejo basolateral de la amígdala en la reconsolidación de una memoria de miedo en animales abstinentes al etanol: efecto de midazolam y propranolol”	95
CAPÍTULO III: “ Efecto de la evocación de una memoria de miedo sobre la inducción de secuelas emocionales en animales abstinentes al etanol”	106
CAPÍTULO IV: “Efecto de la interferencia de la reconsolidación de una memoria de miedo sobre las potenciales secuelas emocionales inducidas por la evocación en animales abstinentes al etanol”	124
CAPÍTULO V: “Efecto de la evocación de una memoria de miedo contextual sobre la expresión de la subunidad GluN2B de los R-NMDA y de proteínas poliubiquitinadas, y la actividad proteosomal en el ABL en animales abstinentes al etanol”	133
CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN GENERAL	149
BIBLIOGRAFÍA	156
TRABAJOS CIENTÍFICOS	177
ANEXO	179

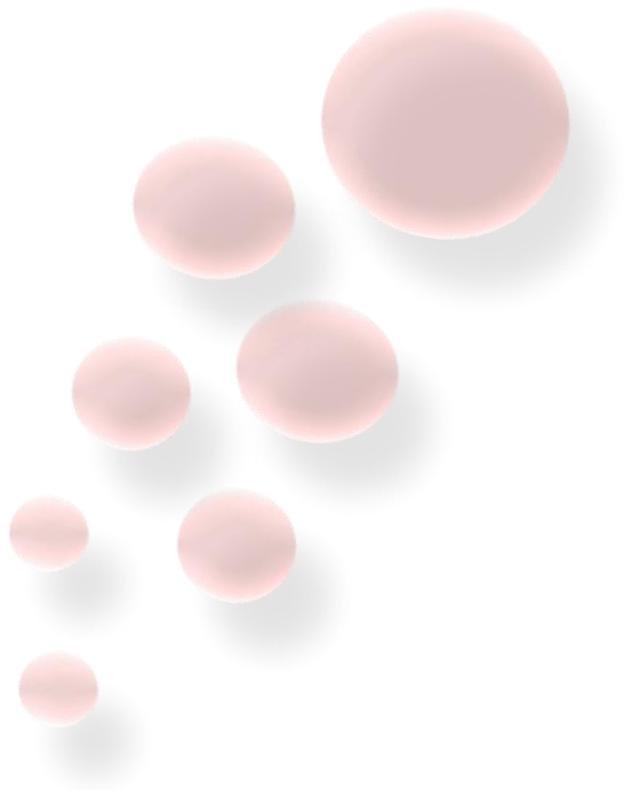
RESUMEN



El objetivo de la presente tesis consistió en estudiar la influencia de la abstinencia al etanol sobre la fase de desestabilización y la subsecuente reconsolidación (desestabilización-reconsolidación) de una memoria de miedo contextual, como así también el impacto “emocional” inducido por el recuerdo de dicha memoria en animales abstinentes al etanol. Nuestros resultados indican que la abstinencia al etanol induce la formación de una memoria de miedo contextual resistente a la interferencia de la reconsolidación por agentes farmacológicos (Propranolol, PROP; Midazolam, MDZ) y no farmacológicos (cerveza sin alcohol, CSA) postevocación. Es decir, dicha traza es resistente a la desestabilización después de su evocación. Considerando que el inicio de la fase de desestabilización es inducido por la activación de los receptores NMDA (R-NMDA), se evaluó la influencia de D-cicloserina (DCS, agonista parcial del R-NMDA) previa a la reactivación sobre el efecto interferente de PROP, MDZ y CSA. La administración de DCS facilitó la desestabilización de la traza, permitiendo que PROP y CSA bloqueen el proceso de reconsolidación de la memoria aversiva en las ratas abstinentes al etanol. Sin embargo, MDZ fue inefectivo en atenuar la respuesta de miedo en ratas dependientes tratadas con DCS. Dicha falta de efecto “amnésico” de MDZ fue asociada a una disminución en la expresión de la subunidad $\alpha 1$ de los receptores GABA-A en el complejo basolateral de la amígdala (ABL), inducida por la abstinencia al etanol. Además, la infusión de PROP intra-ABL redujo la respuesta de miedo en las ratas abstinentes pretratadas con DCS, indicando que el ABL participa del proceso de reconsolidación en los animales abstinentes al etanol. Respecto a las secuelas “emocionales” inducidas por la evocación de una memoria aversiva en animales dependientes, encontramos que los mismos manifestaron un incremento en el comportamiento tipo-ansiedad en el laberinto en cruz elevado (LCE) y una elevada respuesta de congelamiento en un contexto novedoso luego de la evocación de la memoria de miedo contextual. Además, se demostró que dicha sensibilización emocional está asociada a la resistencia al proceso de reconsolidación postevocación de la memoria de miedo que presentan los animales abstinentes. También se observó que la interferencia del proceso de reconsolidación de una memoria de miedo contextual

previene la respuesta tipo-ansiedad inducida por el recuerdo de dicha traza en los animales abstinentes. Por último, a diferencia de los animales controles, la evocación de la memoria aversiva no indujo un aumento en la expresión de la subunidad GluN2B de los R-NMDA ni de las proteínas poliubiquitinadas, como tampoco en la actividad catalítica del proteosoma en las ratas abstinentes al etanol. Por lo tanto, estos resultados representan un correlato molecular de la resistencia a la interferencia de la reconsolidación de una memoria de miedo que presentan los animales dependientes al etanol. En conjunto, los hallazgos de la presente tesis permiten sugerir que: 1) la abstinencia al etanol limita la capacidad dinámica de la traza mnésica original, impidiendo la ocurrencia del proceso de desestabilización-reconsolidación; 2) el recuerdo de una memoria de miedo robusta induce un estado interno de tipo aversivo en los animales abstinentes al etanol; 3) el proceso de labilización tiene un rol funcional en la evocación de una memoria aversiva robusta, como la generada durante la abstinencia al etanol; y 4) el bloqueo del proceso de reconsolidación de una memoria de miedo podría ser una herramienta terapéutica útil en el tratamiento del alcoholismo.

INTRODUCCIÓN



ALCOHOLISMO

GENERALIDADES

Adicción

La adicción a drogas es considerada una enfermedad del sistema nervioso central, definida como un desorden crónico recurrente que se caracteriza por la persistencia en la búsqueda y consumo compulsivos de la droga, a pesar de las consecuencias negativas que implica (Camí y Farré, 2003). Se ha conceptualizado como un trastorno que involucra elementos de la impulsividad y la compulsividad que dan lugar al ciclo de la adicción: consumo/intoxicación, abstinencia/afectividad negativa y preocupación/anticipación (“*craving*”) (Koob y Volkow, 2010). La base neurobiológica de tales respuestas está determinada por la administración repetida de la sustancia que conlleva a cambios adaptativos en los sistemas neuronales implicados en el circuito de recompensa, modificando la interpretación y la respuesta del individuo frente a un estímulo motivacional relevante (Kalivas y O’Brien, 2008).

El manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (Asociación Americana de Psiquiatría; DSM IV, 1994) define a la "dependencia a sustancias" como un síndrome básicamente equivalente a la drogadicción, y los criterios diagnósticos utilizados para describir los síntomas de la dependencia a sustancias, en gran medida definen la compulsión y la pérdida de control de la ingesta (Koob, 2000). El término “Dependencia” hace referencia a los cambios neuroadaptativos inducidos por el consumo crónico de la droga, los cuales se traducen en una serie de respuestas conductuales y fisiológicas cuando se interrumpe su administración (Abstinencia). Durante el período de abstinencia se manifiestan diversas alteraciones somáticas (dependientes de cada droga) y la emergencia de un estado afectivo negativo. La abstinencia no es un estadio pasivo en el

proceso de la adicción, sino que representa una fase clave durante la cual ocurre la instalación de los fenómenos conductuales responsables del mantenimiento de la adicción.

Dependencia al alcohol

El alcohol ha sido una de las principales drogas ingeridas a lo largo de la historia. Desde tiempos muy remotos, el hombre aprendió a fermentar granos y jugos para obtener una sustancia que le provocaba un estado especial. Los primeros escritos sobre el uso de la cerveza, el vino y otras bebidas alcohólicas se remontan a más de 5.000 años (Spanagel y col., 2009). En la actualidad, debido a la gran variedad de bebidas que se ofrecen en el mercado, el fácil acceso y la poderosa publicidad que recibe, el alcohol representa una de las sustancias psicoactivas más ampliamente utilizada en el mundo.

El alcohol presente en las bebidas es el alcohol etílico o etanol, un líquido transparente e incoloro obtenido por fermentación de carbohidratos vegetales. Pertenece a la familia de las drogas hipnótico-sedativas cuyos efectos depresores sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) son dependientes de la dosis. A dosis bajas induce euforia, ansiolisis y desinhibición conductual, mientras que, a dosis altas induce sedación y somnolencia con elevada pérdida de la función psicomotora (Holdstock y de Wit, 1998). Si bien se considera que el consumo de alcohol dentro de los "límites socialmente aceptables" no es perjudicial para la salud e incluso podría tener efectos beneficiosos, el consumo excesivo de alcohol resulta en una problemática social contundente. De hecho, dentro de los principales factores de riesgo de muerte e incapacitantes, el uso de etanol ocupa la tercera posición, por debajo de la hipertensión y el tabaquismo (Lim y col., 2012; Holmes y col., 2013). Además, el excesivo uso de alcohol en conjunto con distintos factores psicosociales, genéticos y ambientales, pueden alterar la capacidad de controlar el consumo desencadenando dependencia a la droga o alcoholismo (Cappell y Herman, 1972; Lorenzo

y col., 1998). La Organización Mundial de la Salud estima que alrededor de 2 mil millones de personas beben regularmente bebidas alcohólicas; de las cuales el 4% poseen trastornos por consumo de alcohol diagnosticados. El alcoholismo es un problema social de primer orden en todo el mundo, que supone un costo personal, socio-económico y sanitario muy elevado (World Health Organization, 2004). Sin embargo, sólo unos pocos tratamientos farmacológicos contra la dependencia del alcohol están disponibles, y su eficacia es limitada (Anton y col., 2006). Por lo tanto, el desarrollo de estrategias más efectivas contra el alcoholismo es un gran desafío que afronta el mundo en la actualidad.

La interrupción del consumo crónico de etanol induce la aparición de una serie de síntomas y signos que en conjunto conforman el síndrome de abstinencia al etanol, el cual ha sido demostrado tanto en animales como en humanos y constituye la prueba evidente del desarrollo de dependencia o alcoholismo (Koob y Le Moal, 2001).

Los principales síntomas físicos o somáticos que definen el síndrome de abstinencia al etanol en humanos incluyen: a) hiperactividad del sistema nervioso autónomo, que se refleja en taquicardia, hipertensión, temblores, sudoración y agitación, b) incremento de la excitabilidad neuronal que puede inducir convulsiones y c) alteraciones en la percepción y sensibilidad que se pueden manifestar por alucinaciones, disturbios del sueño y en casos extremos por delirium (Sellers y Kalant, 1976, Castaneda y Cushman, 1989; Metten y Crabbe, 1996). En animales, el síndrome de abstinencia al etanol está caracterizado por temblores, agitación, rigidez general, convulsiones y pérdida de peso (Pohorecky y Brick, 1990).

Paralelamente, la abstinencia al alcohol promueve la instauración de un estado afectivo negativo que se manifiesta en disforia, anhedonia, depresión, irritabilidad y ansiedad (Markou y col., 1998; De Witte y col., 2003). En relación a ello, se ha demostrado que los sujetos dependientes presentan respuestas defensivas exageradas o estados emocionales

negativos ante la percepción de estímulos amenazantes, aún aquellos de muy baja intensidad o no relevantes emocionalmente, proceso conocido como sensibilización emocional. En esta línea, estudios preclínicos han documentado un aumento en el comportamiento tipo-ansiedad, una exagerada respuesta a estímulos estresantes y un incremento en el consumo de etanol durante las fases temprana y tardía de la abstinencia al etanol (Heilig y col., 2010). En humanos, las alteraciones emocionales negativas tales como la depresión, anhedonia, desórdenes de ansiedad, disforia y malestar psicológico (Koob, 1995; Markou y col., 1998) luego de un período prolongado de abstinencia, han sido correlacionadas positivamente con la reincidencia al consumo (Mossberg y col., 1985; Cloninger, 1987; De Soto y col., 1989; Miller y Harris, 2000). Si bien los síntomas somáticos de la abstinencia se disipan de manera temprana, las alteraciones en la emocionalidad pueden persistir durante períodos prolongados de tiempo. Por lo tanto, se ha propuesto que las alteraciones emocionales, tales como la ansiedad y el miedo, constituyen uno de los factores motivacionales más importantes en promover la recaída al consumo de alcohol, en un intento por atenuar las consecuencias aversivas de la abstinencia (DSM IV, 1994; Aufrere y col., 1997; Martijena y col., 2001, Nestler y col., 2001). En otras palabras, se puede inferir que el estado emocional negativo, inducido por la interrupción del consumo crónico de etanol, juega un rol primordial en el mantenimiento de la adicción al alcohol.

La exposición crónica al alcohol induce cambios en los circuitos neurales que controlan los procesos de motivación, incluyendo la recompensa y el estrés. El etanol afecta múltiples sistemas de neurotransmisión, principalmente a nivel dopaminérgico, glutamatérgico, GABAérgico y serotoninérgico; así como también sistemas cerebrales que modulan la respuesta al estrés (Gilpin y Koob, 2008). A grandes rasgos, el consumo crónico de alcohol se caracteriza por alterar el delicado balance entre la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria. Estas neuroadaptaciones producen cambios en la sensibilidad a los efectos del

alcohol después de la exposición repetida (sensibilización y tolerancia) y un estado de abstinencia tras la interrupción del consumo de la droga (Gilpin y Koob, 2008).

Por otro lado, una gran cantidad de reportes han demostrado que las drogas de abuso además de modificar la plasticidad neuronal de los circuitos de recompensa y estrés, tienen la capacidad de modificar mecanismos celulares y moleculares implicados en los circuitos clásicos del aprendizaje y la memoria (Tipps y col., 2014). Si bien en numerosos trabajos se ha asociado al alcoholismo con un déficit cognitivo (Benardin y col., 2014), el aprendizaje emocional parece estar potenciado. En relación a ello, algunos estudios sugieren que la administración crónica de etanol y la abstinencia al mismo (administración crónica/abstinencia al etanol) facilitan la formación de una memoria de miedo robusta y persistente. Además, se ha demostrado que el recuerdo de una memoria aversiva induce un aumento del consumo de alcohol en animales abstinentes (Bertotto y col., 2010). Por lo tanto, se puede inferir que el estado provocado por la evocación de una memoria aversiva afecta la motivación por el etanol en los animales abstinentes, facilitando el consumo subsecuente. *A partir de dichos hallazgos, el estudio de la neurobiología de una memoria de miedo en sujetos dependientes, cobra importancia en el contexto del alcoholismo.*

APRENDIZAJE Y MEMORIA

GENERALIDADES

Los procesos de aprendizaje y memoria juegan un rol crítico en la adaptación de los organismos frente a los cambios continuos de su entorno. Esta capacidad para procesar y almacenar información relevante permite a los organismos resolver situaciones nuevas en base a una experiencia previa, a fin de favorecer su bienestar y supervivencia.

Se define al aprendizaje como el proceso de adquisición de información nueva del entorno durante una experiencia, manifestándose a través de cambios adaptativos en el comportamiento del individuo (Thorpe, 1963). La memoria es la capacidad de retener dicha información en el tiempo, manteniéndola disponible para eventualmente ser recuperada (evocada), pudiendo guiar el comportamiento (Kandel y col., 2001; Dudai, 2002).

En términos neurobiológicos, la memoria es una representación interna de una experiencia, que se halla codificada espacio-temporalmente en circuitos neuronales, mediante cambios en las propiedades reactivas de las neuronas (Maldonado, 2008). El almacenamiento en el tiempo de la información adquirida, es decir la memoria, en forma de representaciones internas dependientes de la experiencia, puede guiar el comportamiento en eventos ulteriores más allá del presente perceptivo o cognitivo, gracias a la potencial capacidad de reactivar tales representaciones (Dudai, 2002). Por definición, no obstante, no todas las representaciones internas que guían el comportamiento son memorias. Las construcciones innatas, codificadas genéticamente y establecidas en el desarrollo, pueden ser también representaciones internas. Por lo tanto, la memoria implica sólo aquellas representaciones internas resultantes del aprendizaje (Dudai, 2002).

FASES DE PROCESAMIENTO DE LA MEMORIA

Las memorias pueden durar desde segundos a días o toda la vida, dependiendo de la relevancia de la información que codifican y de la fuerza de la experiencia que les dio origen. Un evento transcendental será almacenado de manera estable para poder utilizar dicha información adquirida en el tiempo. La formación de memorias a largo plazo implica el desarrollo de una serie de fases (procesos) secuenciales, con una determinada dinámica temporal. La Fig. A muestra un esquema de las fases de procesamiento de la memoria.

Ante una experiencia, se desencadena la fase de **adquisición** de la memoria donde se produce la codificación de la información sensorial, almacenándose de manera temporal e inestable (memoria a corto plazo, MCP). Inicialmente la memoria se encuentra en un estado frágil, siendo vulnerable a la interferencia por diversas manipulaciones. Esta nueva representación interna se estabiliza y perdura en el tiempo a través del proceso de **consolidación** de la memoria. Dicho proceso abarca dos niveles de análisis: consolidación sináptica y consolidación sistémica. La consolidación sináptica se desarrolla durante una ventana temporal acotada postadquisición, involucrando eventos celulares y moleculares a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional, es decir, es un proceso dependiente de la síntesis proteica *de novo*. Mientras que la consolidación sistémica implica la reorganización a través del tiempo de circuitos neuronales y áreas cerebrales que procesan y almacenan la información. El proceso de consolidación de la memoria tiene como finalidad entonces, la generación de una memoria a largo plazo (MLP), con el objeto de permitir la utilización de la información adquirida en el tiempo (McGaugh, 2000; Kandel, 2001; Dudai, 2002).

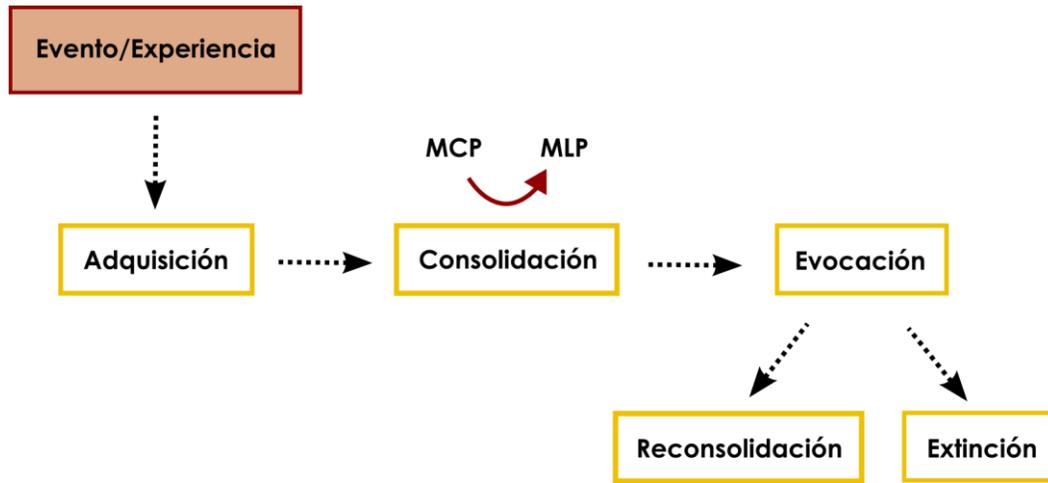


Figura A. Fases de procesamiento de una memoria a largo plazo. MCP: memoria a corto plazo. MLP: memoria a largo plazo.

El proceso que permite la recuperación y utilización de la información almacenada se denomina **evocación**. Esta fase implica el recuerdo consciente o inconsciente de la experiencia, que permite guiar el comportamiento subsecuente. La evocación de la memoria es desencadenada por la presentación de una clave asociada a la experiencia original (recordatorio) (James, 1980; Dudai, 2002; Sara y Hars, 2006; Ben-Yakov y col., 2015). Dependiendo de las características del recordatorio, pueden ocurrir a su vez dos procesos con función comportamental adaptativa opuesta: si la presentación del recordatorio es breve puede ocurrir el fenómeno de reconsolidación de la memoria, mientras que si es prolongada y repetida, puede desencadenarse la extinción de la memoria (Pedreira y Maldonado, 2003; Suzuki y col., 2004). La importancia biológica-funcional de la **reconsolidación** radica en permitir fortalecer o actualizar la memoria original (Tronson y Taylor, 2007), mientras que la **extinción** implica la generación de una nueva memoria, cuya expresión conduce a la supresión temporaria de la expresión de la memoria original (Myers y Davis 2002; Milad y Quirk, 2012).

MEMORIA DE MIEDO

El miedo es una respuesta emocional de gran connotación para la supervivencia de los organismos que implica respuestas fisiológicas y comportamentales frente a una situación amenazante. En otras palabras, el miedo representa el mecanismo primordial de defensa. Para poder detectar, anticipar y evitar estímulos potencialmente peligrosos en futuros eventos resulta sumamente relevante almacenar la información obtenida durante una experiencia aversiva, es decir formar memorias de miedo. Así como el humano recuerda fácilmente los detalles de situaciones donde presenciaron un accidente o sufrieron un asalto, las ratas recuerdan el lugar donde se encontraron con un depredador o donde recibieron una descarga eléctrica en sus patas. Estratégicamente entonces, las experiencias emocionalmente significativas generan memorias de larga duración, que son más propensas a ser recordadas que los eventos emocionalmente neutros (Roosendaal y col., 2009).

Los patrones generales de respuestas conductuales y fisiológicas del miedo, como también los mecanismos neuronales implicados, son altamente conservados entre las especies. Dentro de las respuestas desencadenadas por un estímulo amenazante se describen la respuesta de congelamiento, la reacción de sobresalto, la analgesia, la taquicardia, el aumento de la presión arterial y de la frecuencia respiratoria, y el incremento en la liberación de determinadas hormonas (Iwata y col., 1986; Blanchard y Blanchard, 1989; Davis, 1997; Stiedl y Spiess, 1997). Las mismas son el resultado de la activación de la respuesta al estrés, mediada por mecanismos autonómicos y neuroendócrinos (Sapolsky y col., 2000; McEwen, 2003). La activación de estos mecanismos, además, impacta en el cerebro alterando la forma en que los circuitos emocionales y cognitivos procesan la información, generando un eficiente y seguro almacenamiento de la misma (“memoria de miedo”). Sin embargo, frente a condiciones de estrés severo se desencadena la formación de memorias de miedo que impactan

negativamente en la supervivencia y el bienestar del individuo. Dichas memorias “maladaptativas” están involucradas en la inducción y el mantenimiento de diversos desórdenes psiquiátricos. La elucidación de los mecanismos que están implicados en la generación de dichas memorias, podría brindar herramientas para la prevención y tratamiento de los trastornos afectivos.

El modelo experimental más ampliamente utilizado para estudiar las memorias de miedo es el condicionamiento de miedo clásico o Pavloviano.

CONDICIONAMIENTO DE MIEDO

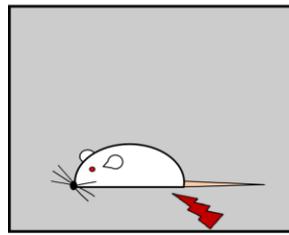
El condicionamiento de miedo clásico o Pavloviano es un aprendizaje de tipo asociativo, en el cual un estímulo emocionalmente neutro (estímulo condicionado, EC) es apareado de manera contingente con un estímulo innatamente aversivo para el individuo (estímulo incondicionado, EI). Dada su relevancia emocional, el EI puede producir en el individuo una respuesta espontánea o respuesta incondicionada (RI), mientras que el EC por sí solo no produce respuesta. Luego del aprendizaje, el EC adquiere un valor predictivo de la llegada del EI, de tal modo que la sola presentación del EC produce las respuestas fisiológicas y comportamentales de miedo innatas (respuesta condicionada, RC). Este paradigma comportamental asociativo ha sido reportado en diversas especies, tales como en peces, ranas, serpientes, palomas, ratas, conejos, perros, monos y humanos (Blanchard y Blanchard, 1989; Fanselow, 1998; LeDoux, 2000). El condicionamiento de miedo es un modelo experimental muy utilizado debido que es un aprendizaje simple, de rápida adquisición y de larga duración (Davis, 1997; Maren, 2001).

En el condicionamiento de miedo (CM) experimental en roedores usualmente un sonido, una luz, un olor o el contexto de la caja de condicionamiento son empleados como EC; mientras que una descarga eléctrica leve en las patas del animal representa el EI. Según el

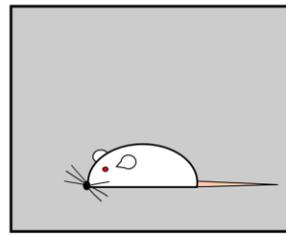
tipo de estímulo condicionado empleado se distinguen distintos tipos de CM: si utiliza un sonido como EC se denomina CM auditivo (CM a una clave discreta), mientras que si el EC está dado por el contexto de condicionamiento se refiere como CM contextual (Fig. B). La evaluación del condicionamiento involucra la medida de las RC producidas por el EC en ausencia del EI durante un test de memoria. La respuesta de congelamiento es utilizada comúnmente como un índice de miedo en roedores y es definida como la adopción de una postura de inmovilidad total durante la cual el animal sólo realiza los movimientos necesarios para respirar (Blanchard y Blanchard, 1989). La expresión de este tipo de respuestas se utiliza como una medida de la memoria de miedo generada durante el aprendizaje y su magnitud depende de la relevancia biológica del estímulo (Maren, 2001). El paradigma utilizado en la presente tesis fue el CM contextual (CMC).

Circuitos neuronales implicados en el condicionamiento de miedo contextual.

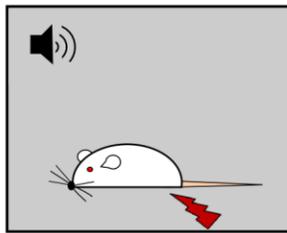
La naturaleza afectiva de los estímulos sensoriales está mediada por un circuito integral en el cerebro que comanda las respuestas defensivas y elabora estados motivacionales y emocionales aversivos denominado en su conjunto sistema límbico, también conocido como “cerebro emocional” (Crawford, 1978; LeDoux, 1993). Este circuito está conformado por estructuras subcorticales, evolutivamente muy antiguas, que incluyen el hipocampo, el septum, el hipotálamo, la amígdala, los núcleos del lecho de la estría terminal, el estriado, el locus coeruleus, los núcleos del rafe y la sustancia gris periacueductal (Charney y col. 1998, Lopez y col., 1999; Nestler y col., 2001). Las estructuras límbicas en conjunto con determinadas áreas corticales de asociación participan en los procesos de evaluación cognitiva y emocional. Dentro de este circuito, la amígdala es reconocida como una estructura esencial para el aprendizaje aversivo de tipo asociativo (Davis y col., 1994; LeDoux, 1995; Schafe y col., 2001; Maren 2005), necesaria tanto para la formación como para el almacenamiento de memorias de aversivas (Fent y Fanselow, 1999; LeDoux, 2000; Davis y Whalen, 2001; Maren, 2001).

A) Condicionamiento de miedo contextual

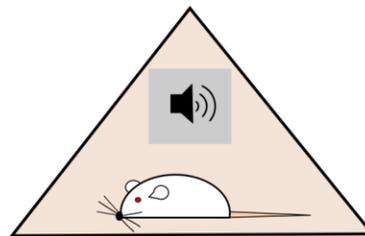
Entrenamiento



Test

B) Condicionamiento de miedo auditivo

Entrenamiento



Test

Figura B. Procedimiento de condicionamiento clásico de miedo en roedores. Esquema representativo de un condicionamiento de miedo clásico asociado a un contexto en A y a una clave discreta en B. Esta imagen fue adaptada de Sweatt, 2009.

La amígdala es una estructura localizada en la profundidad del lóbulo temporal cerebral, cuyo nombre deriva del griego “forma de almendra” debido a su forma anatómica. Está constituida por aproximadamente 20 subnúcleos agrupados en dos grandes subáreas: la región cortico-medial (evolutivamente primitiva, asociada al bulbo olfatorio) y la región o complejo basolateral (ABL; evolutivamente más reciente, asociada a la neocorteza). La región cortico-medial incluye los núcleos cortical, medial y central (CeA); mientras que la región basolateral incluye los núcleos lateral, basal y accesorio basal. Cada núcleo a su vez se divide en subnúcleos (LeDoux, 2007; Fig. C).

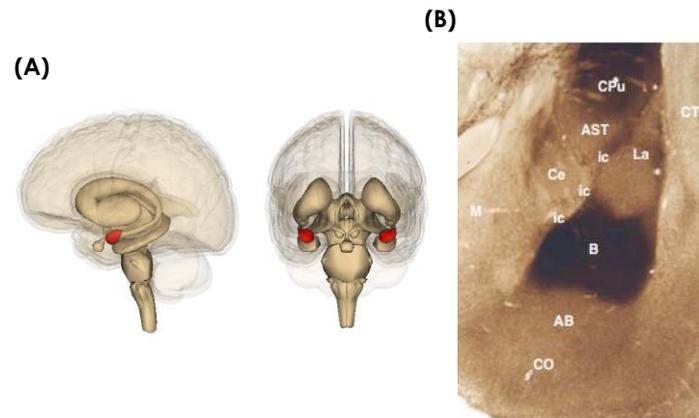


Figura C. La amígdala. A- ubicación de la amígdala en el lóbulo temporal medial (rojo; cerebro humano). B- Principales áreas de la amígdala (cerebro de rata; tinción de acetilcolinesterasa). Los mismos núcleos están presentes en los primates, incluyendo los humanos. Núcleos de la amígdala: complejo basolateral (La, núcleo lateral; B, núcleo basal; AB, núcleo accesorio basal); Ce, núcleo central; itc, células intercaladas; M, núcleo medial; CO, núcleo cortical. Otras áreas: AST, área de transición amígdalo-estriatal; CPu, caudado putamen; CTX, corteza. Adaptado de LeDoux 2007.

Si bien toda la estructura se comunica con diversas áreas cerebrales, el ABL ha sido definido como el centro receptor de información proveniente de los sistemas sensoriales, y se encarga del procesamiento de la información que a él arriba. Esta región otorga el significado emocional a la experiencia y dispara la respuesta adaptativa subsecuente; es decir, es una estructura central en el procesamiento de las emociones (LeDoux, 2000). Por otro lado, el núcleo central (CeA) representa la región eferente amigdalina, dado que envía proyecciones al sistema nervioso autónomo, al sistema motor somático y al eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal, a fin de guiar las reacciones autonómicas y conductuales que median la respuesta adaptativa (Maren, 1999; Paré y col., 2004).

Durante el condicionamiento de miedo contextual (Fig. D), el complejo ABL recibe información somatosensorial proveniente del tálamo y de zonas corticales, y al mismo tiempo, a él llegan aferencias hipocámpales con información contextual que definen el tiempo y espacio de la experiencia aversiva (LeDoux y col., 1990; O'Reilly y Rudy, 2001;

Sanders y col., 2003; Paré y col., 2004). Por lo tanto, dicha área cerebral representa el sitio de convergencia y asociación de los estímulos EC-EI durante el aprendizaje. Subsecuentemente, la información procesada por el ABL modula la actividad del núcleo CeA, el cual influye sobre áreas del tallo encefálico implicadas en la expresión de las respuestas fisiológicas y conductuales de miedo (Davis, 1992; Kapp y col., 1992).

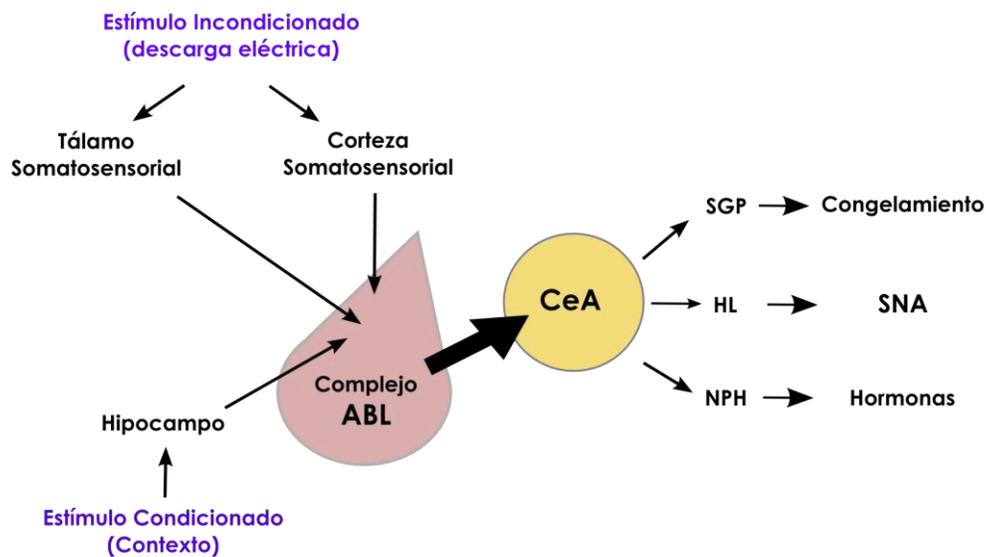


Figura D. Condicionamiento de miedo contextual: circuitos neuronales implicados. ABL: complejo basolateral amigdalino; CeA: núcleo central amigdalino. SPG: sustancia gris periacueductal. HL: hipotálamo lateral. SNA: sistema nervioso autónomo. NPH: núcleo paraventricular hipotalámico. Adaptado de LeDoux, 2007.

ALCOHOLISMO Y MEMORIAS DE MIEDO

Un estudio preclínico ha demostrado que los animales tratados crónicamente con etanol a concentraciones moderadas (2,5-5% v/v) muestran una mayor latencia para ingresar al compartimento donde recibieron una descarga eléctrica, indicando así que el consumo crónico de etanol facilita la generación de una memoria aversiva en el paradigma de evitación inhibitoria (Kalev-Zylinska y col., 2007). Recientemente, ha sido demostrado que la exposición repetida de etanol potencia la expresión de memorias de miedo auditivas en ratas, tanto de memorias preexistentes como aquellas generadas postexposición a la droga. En dicho trabajo, se encontró además, que la administración repetida de alcohol induce un incremento en la expresión de c-Fos en la corteza prefrontal prelímbica, tálamo paraventricular, y los núcleos central y basolateral amigdalinos; indicando así un aumento en la actividad de áreas cerebrales implicadas en la evocación de una memoria aversiva (Quiñones-Larracunte y col., 2015).

Por otro lado, Holmes y col. (2012) reportaron que la administración crónica intermitente de etanol induce la generación de una memoria de miedo auditiva resistente a la extinción; lo cual fue asociado con alteraciones en la morfología de las espinas dendríticas de las neuronas de la corteza prefrontal medial (mPFC). Dichos autores sugieren que el consumo de etanol crónico podría incrementar el riesgo a desarrollar desórdenes de ansiedad relacionados a eventos traumáticos al dificultar la extinción del miedo condicionado mediado por la mPFC. Además, se ha observado que los animales expuestos crónicamente a etanol durante la adolescencia media o la adultez muestran un retardo para extinguir una memoria de miedo contextual (Broadwater y col., 2013).

En nuestro laboratorio, hallazgos en ratas han indicado que la abstinencia al etanol facilita la formación de una memoria de miedo contextual robusta, persistente y resistente a la extinción (Bertotto y col., 2006). Respecto al correlato molecular de tal respuesta

emocional exagerada, se encontró que la dependencia al alcohol induce cambios neuroadaptativos en las propiedades o funcionamiento de los receptores NMDA, en la activación de las proteínas quinasas ERK y en la expresión de c-Fos en estructuras cerebrales involucradas en la modulación de respuestas emocionales y en aprendizajes de tipo asociativo (Bertotto y col., 2010, 2011). En el mismo sentido, otras evidencias de nuestro laboratorio indicaron que la abstinencia al etanol induce una reducción de la transmisión GABAérgica en el ABL (Isoardi y col., 2007). Dicha atenuación de la transmisión inhibitoria resultaría en una hiperexcitabilidad en el ABL, favoreciendo la formación de memorias de miedo en los animales abstinentes (Bertotto y col., 2006; Isoardi y col., 2007).

Por otro lado, Bertotto y col. (2010) demostraron que la evocación de una memoria de miedo contextual induce un incremento selectivo en el consumo de alcohol únicamente en animales con una historia de dependencia previa; sin embargo, dicho efecto no se observó luego de la evocación de una memoria de miedo extinguida. A nivel molecular, la evocación de la memoria aversiva potenció la expresión de c-Fos en áreas implicadas en la modulación emocional, tales como el ABL. Esto sugiere que la evocación de una memoria de miedo podría potenciar el estado afectivo negativo instaurado durante la abstinencia al etanol, promoviendo un incremento en el consumo de alcohol a fin de intentar atenuar y afrontar dichas alteraciones emocionales. Así, se puede inferir que el estado provocado por la evocación de una memoria aversiva afecta la motivación por el etanol en los animales abstinentes, facilitando el consumo subsecuente. Por lo tanto, *el diseño de estrategias tendientes a atenuar el impacto de la evocación de memorias de miedo, adquiere relevancia en la terapéutica contra la adicción al alcohol.*

La generación de una memoria de extinción y el bloqueo del proceso de reconsolidación de una memoria, son estrategias válidas para debilitar e interferir memorias. Si bien el proceso de extinción representa una herramienta útil en la práctica clínica, presenta la

desventaja que la memoria original permanece latente; por lo cual el miedo puede volver a expresarse con el paso del tiempo. Por lo tanto, en la terapéutica comportamental contra los desórdenes psiquiátricos y la adicción a drogas, el bloqueo del proceso de reconsolidación de la memoria adquiere un rol primordial al permitir interferir la memoria original. Consecuentemente, el actual trabajo de tesis se enfocó en el estudio de la reconsolidación de una memoria de miedo contextual en animales dependientes al etanol.

RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA

Durante varias décadas, se pensó que el único período de procesamiento de la memoria era la fase de consolidación: luego del aprendizaje, una nueva memoria requiere de la expresión génica durante una ventana temporal acotada, después de la cual se vuelve estable y resiliente a la disrupción (McGaugh, 2000). Sin embargo, estudios realizados durante la década pasada, extendiendo resultados reportados con anterioridad (Misanin y col., 1968; Lewis y col., 1972), demostraron que una memoria consolidada al ser evocada puede retornar a un estado activo, siendo una vez más, temporalmente lábil y por ende, susceptible al efecto de diversos agentes. Es decir, la evocación posee la capacidad potencial para inducir la desestabilización (labilización) de una memoria consolidada, brindando una oportunidad para modificar la traza original. Con el tiempo, las memorias reactivadas regresan a un estado inactivo y estable, a fin de favorecer el almacenamiento a largo plazo de la traza. El proceso activo dependiente de la síntesis de proteínas, que permite la reestabilización de memorias pre-existentes que fueron desestabilizadas producto de su evocación, se denomina reconsolidación (Ver Fig. E; Lewis, 1979; Nader y col., 2000; Sara, 2000; Dudai y Eisenberg, 2004; Alberini, 2005). Dicho fenómeno ha sido demostrado en una gran variedad de especies, desde *Caenorhabditis elegans* al humano, y en diferentes tipos de memorias; sugiriendo que es una fase fundamental en el proceso de almacenamiento de la memoria (Dudai y Eisenberg, 2004; Nader y Hardt, 2009).

A pesar de su denominación y su función como proceso de estabilización de la memoria, la reconsolidación no representa una recapitulación idéntica de la consolidación. Aunque algunos eventos celulares y moleculares son compartidos por ambos procesos, diversos estudios han demostrado la existencia de mecanismos específicos para cada uno de ellos; por ejemplo, a nivel del patrón de activación de factores de transcripción (Lee y col., 2004; Tronel y col., 2005; Lee y Hynds, 2013). Si bien aún permanece en discusión el término “reconsolidación”, una vasta evidencia soporta la noción de la existencia de una ventana temporal de fragilidad readquirida, inducida por la reactivación de la memoria. Esta fase de labilización postevocación brinda una oportunidad para fortalecer, actualizar o interferir la memoria original.

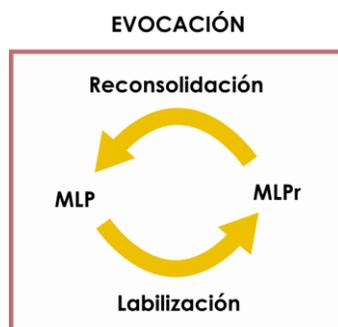


Figura E. Proceso de labilización-reconsolidación luego de la evocación de una memoria. MLP: memoria a largo plazo. MLPr: memoria a largo plazo reactiva.

Cabe resaltar que no todas las memorias evocadas reconsolidan: las características del aprendizaje y de las condiciones en las cuales la memoria previamente consolidada es evocada, pueden dificultar la ocurrencia del proceso de labilización-reconsolidación. Dichas condiciones limitantes incluyen: la edad de la memoria (Milekic y Alberini, 2002; Eiserberg y Dudai, 2004; Frankland y col., 2006; Baratti y col., 2008; Bustos y col., 2009;), la fuerza de la memoria (Eisenberg, 2003; Suzuki, 2004; Wang y col., 2009) y la duración de la sesión de reactivación (Suzuki y col., 2004; Bustos y col., 2009). Así, por ejemplo, las memorias remotas o generadas bajo condiciones de entrenamiento intenso tienden a ser muy estables y más resistentes al desarrollo del proceso de desestabilización-

reconsolidación, aún después de sesiones de reactivación prolongadas (Bustos y col., 2009; Wang y col., 2009). Otra condición limitante fue definida en función de la disponibilidad de nueva información durante la reactivación de la memoria (Tronson y Taylor, 2007; Besnard y col., 2012; Finnie y Nader, 2012). La discrepancia entre lo que se espera (información previamente almacenada) y lo que ocurre durante la reactivación promovería al inicio de la desestabilización-reconsolidación de la memoria con el objetivo de incorporar nueva información (Pedreira y col., 2004; Rodríguez-Ortiz y col., 2005; Morris y col., 2006; Díaz-Mataix y col., 2013). Si la reactivación por sí misma fuera suficiente para labilizar la traza, la memoria sería muy maleable. De modo que, la incorporación de nueva información durante la reactivación tendría un propósito funcional y adaptativo (Sevenster y col., 2013). En resumen, la ocurrencia de la fase de labilización-reconsolidación inducida por la evocación de la memoria es definida en función de la interrelación entre los factores descriptos.

Estudio del proceso de reconsolidación

Para demostrar experimentalmente la reconsolidación, una memoria primero debe consolidarse y luego evocarse de forma contigua con algún tipo de manipulación. Por último, debe observarse modificación de la expresión de la memoria.

En el estudio de una memoria de miedo, empleando el modelo de condicionamiento de miedo contextual, la formación de la memoria está dada por la asociación entre el contexto (EC) y la descarga eléctrica (EI). La fase de recuperación de la memoria ocurre en una sesión de reactivación (evocación), la cual se produce al menos 24 h postcondicionamiento y consiste en la reexposición del animal al contexto de entrenamiento en ausencia de la descarga eléctrica. Inmediatamente antes o después se aplica la manipulación (farmacológica o no farmacológica). La sesión de reactivación permite que la memoria regrese a un estado activo y, al mismo tiempo, representa una

prueba inicial de la fuerza de la memoria. Finalmente, al menos 24 horas después de la sesión de reactivación, se realizan pruebas de retención de la memoria, donde se reexponen los animales al contexto en ausencia de la descarga eléctrica, y se mide la respuesta de congelamiento (RC). Dicho procedimiento experimental se muestra en la Figura F.



Figura F. Esquema experimental para el estudio del proceso de reconsolidación de una memoria. Adaptado de Taylor y Torregosa, 2015.

La modificación de la expresión de una memoria consolidada producto de una intervención después de su reactivación, no es suficiente para demostrar el proceso de reconsolidación. Además se requiere (Tronson y Taylor, 2007; Sorg, 2012):

- ✓ demostrar que en ausencia de la recuperación de la información, la memoria no se modifica por la manipulación experimental; es decir, que los efectos observados son dependientes de la sesión de reactivación. Para ello, el diseño debe incluir grupos de animales no sometidos a la sesión de reactivación.
- ✓ evidenciar la persistencia de la modificación de la memoria en el tiempo. En este caso, se requiere realizar subsecuentes tests de retención de la memoria, a distintos intervalos de tiempo después de la primera prueba.
- ✓ verificar la ventana temporal luego de la reactivación durante la cual la memoria permanece lábil. Para esto, se debe realizar la manipulación a distintos intervalos de tiempo después de la reactivación de la memoria.

✓ en caso de protocolos que bloqueen el proceso de reconsolidación, descartar explicaciones alternativas al déficit de la memoria, como por ejemplo la generación de una memoria de extinción. Como se mencionó anteriormente, el proceso de extinción se puede desencadenar por un evento de evocación, e implica la generación de una memoria nueva que compite con la memoria original. La persistencia de la memoria original puede evidenciarse por distintos fenómenos comportamentales, considerados características diagnósticas inherentes a la extinción (Bouton 2002; Myers y Davis 2002), tales como la:

(a) Recuperación espontánea: implica la recuperación de la respuesta condicionada original pasado un período de tiempo relativamente prolongado desde que la extinción tuvo lugar, sin ningún entrenamiento adicional.

(b) Readquisición: se refiere a la recuperación de la respuesta condicionada como resultado de un reaprendizaje facilitado, debido a la persistencia en el sistema de la memoria original tras la extinción.

(c) Reinstalación: hace referencia a la recuperación de la respuesta condicionada cuando al sujeto se le presenta el *EI* de manera no predecible.

Por lo tanto, para definir si la atenuación de la memoria está dada por el bloqueo de la reconsolidación o la facilitación de la extinción, en el diseño experimental debe incluirse al menos uno de los fenómenos recientemente descritos.

Neurobiología del proceso de labilización-reconsolidación de una memoria de miedo

-Neuroanatomía

La Amígdala, más específicamente su complejo ABL, además de participar en la adquisición, consolidación y evocación de una memoria de miedo, es una estructura esencial en el proceso de desestabilización-reconsolidación. En esta línea, ensayos farmacológicos preclínicos han demostrado que diversos sistemas de neurotransmisión amigdalinos son esenciales para la ocurrencia de esta fase de de la memoria. Así, el

bloqueo de receptores para glutamato, noradrenalina y glucocorticoides intra-ABL después de la evocación, interfieren la memoria de miedo original (Baldi y col., 2015). También se ha demostrado que la participación de ciertas cascadas de señalización intracelular y sustratos moleculares en el ABL, juegan un rol crítico en el procesamiento de la memoria después de su evocación. En este sentido, se ha observado que un incremento de la degradación proteica en el complejo ABL está asociado a la desestabilización de una memoria aversiva luego de su recuerdo (Jarome y col., 2011). Al mismo tiempo, se ha propuesto que la vía PI-3K-AKT/PKB-mTOR, la activación de las enzimas PKA y MAPK, y la activación y expresión de los factores de transcripción CREB y Zif-268 en ABL, son claves para en el proceso de reconsolidación de una memoria de miedo (Hall y col., 2001; Duvarci y col., 2005; Doyere y col., 2007; Kritman y Maroun, 2013; Díaz-Mataix y col., 2011; Maddox y col., 2011; Espejo y col., 2016). Del mismo modo, varios autores han indicado que esta fase de la memoria requiere de la síntesis proteica *de novo*, de modulación epigenética, como también de un rearrreglo del citoesqueleto de actina en el complejo ABL (Nader y col., 2000; Duvarci y col., 2005; Debiec y col., 2006; Mamiya y col., 2009; Wang y col., 2009; Rehberg y col., 2010; Jarome y col., 2012; Motanis y Maroun, 2012; Maddox y col., 2013).

En concordancia con dichos hallazgos en modelos animales, un ensayo en humanos mediante análisis de imágenes, ha reportado una falta de activación de la amígdala luego de la interrupción de la reconsolidación de una memoria de miedo (Agren y col., 2012). En conjunto, estas evidencias soportan contundentemente la participación del ABL en la desestabilización-reestabilización de una memoria de miedo luego de su recuerdo.

Además de la amígdala, un gran número de evidencias han demostrado que la corteza prefrontal y el hipocampo son también áreas cerebrales relevantes en el proceso de reconsolidación de una memoria de miedo (Schwabe y col., 2011; Schiller y col. 2013; Baldi y col., 2015).

-Mecanismos moleculares involucrados

En lenguaje neurobiológico, el hecho de que la evocación de la memoria permita acceder a la traza mnésica original bajo ciertas condiciones, significa que la evocación debe inducir *neuroplasticidad* para que ocurran la labilización y la subsecuente reconsolidación de la memoria. La neuroplasticidad hace referencia al mecanismo de adaptación neuronal en respuesta a un estímulo, manifestado por cambios en los circuitos neuronales (Pittenger y Duman, 2008). Este fenómeno implica diversos eventos moleculares pre y postsinápticos, que darán como resultado modificaciones funcionales (Plasticidad Sináptica) y/o estructurales (Plasticidad Estructural), promoviendo así a cambios en la comunicación neuronal.

Modelo molecular del proceso de desestabilización de una memoria de miedo

Se ha propuesto que la ocurrencia de la fase de labilización de la memoria inducida por la reactivación, es dependiente de la activación de los receptores NMDA (R-NMDA) que contienen la subunidad GluN2B (R-NMDA(GluN2B)); Ben Mamou y col., 2006; Milton y col., 2013). Este evento celular, desencadena cascadas de señalización intracelulares que concluyen en un aumento en la degradación proteica, lo cual define en términos moleculares a dicha fase de inestabilidad de la memoria después de su evocación (Fig. G).

La activación de los R-NMDA(GluN2B) dispara un incremento en la poliubiquitinación de proteínas, es decir induce un mayor número de proteínas “marcadas” molecularmente para su posterior reconocimiento por el proteosoma y subsecuente degradación. Al mismo tiempo, la entrada de Ca^{2+} a la célula promovida por la activación de tales receptores, activa a CamKII (Calcio-calmodulin Quinasa II). Dicha enzima media la fosforilación de la subunidad 19S (Rpt6 en la serina-120) del proteosoma, induciendo un aumento de la actividad del mismo. En conjunto, tales eventos celulares inducen una

mayor actividad del sistema ubiquitina-proteosoma (SUP), dando como resultado un aumento en la degradación de proteínas, tales como Shank y GKAP (proteínas de andamiaje presentes en la densidad postsináptica, DPS). Ello daría inicio al remodelado de la DPS y favorecería la endocitosis de los receptores AMPA (impermeables a calcio) en la superficie celular, necesarios para el procesamiento de la memoria luego de su evocación (Lee y col., 2006; Jarome y col., 2011; Jarome y Helmstetter, 2013; Hong y col., 2013; Fustiña y col., 2014; Bonin y col., 2015; Jarome y col., 2016).

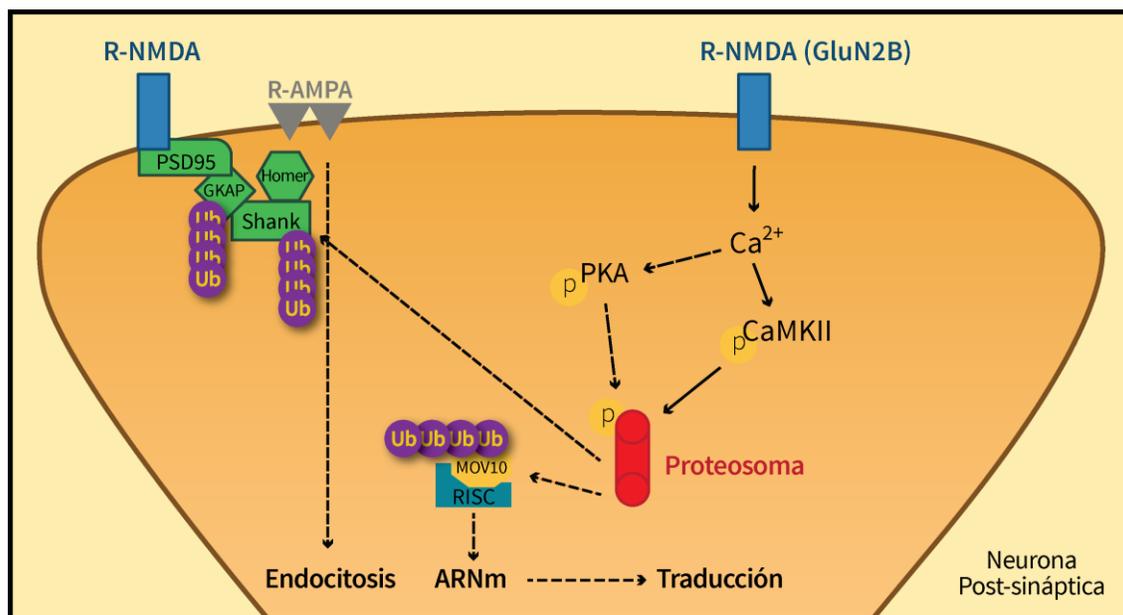


Figura G. Modelo molecular de la fase de labilización inducida por la evocación de una memoria de miedo. Abreviaturas: R-AMPA: receptor AMPA; R-NMDA: receptor NMDA; R-NMDA(GluN2B): receptor NMDA que contiene la subunidad GluN2B; Ca^{2+} : calcio; PKA: proteína quinasa A; CAMKII: calcio-calmodulina quinasa II; Ub: ubiquitina; PSD95: proteína de la densidad postsináptica; GKAP: proteína asociada a guanilato quinasa; Homer y Shank: proteínas de andamiaje; MOV10-RISC: complejo ARN helicasa; ARNm: ácido ribonucleico mensajero; (p): sustratos fosforilados. Adaptado de Jarome 2013.

Modelo molecular del proceso de reconsolidación de una memoria de miedo

Mediante diversos estudios farmacológicos y moleculares, se ha establecido que durante la reestabilización de la memoria después de su evocación intervienen múltiples sustratos moleculares que tienen como finalidad promover la síntesis proteica *de novo*, de manera dependiente de la activación de los R-NMDA y los receptores β -adrenérgicos (R- β A) (Fig. H).

Si bien ha sido demostrado que la reestabilización de la memoria luego de su evocación es selectivamente dependiente de la activación de los R-NMDA que contienen la subunidad GluN2A (Milton y col., 2013), se ha propuesto que la vía R-NMDA(GluN2B)/CaMKII/SUP también está implicada en el inicio de esta etapa (Jarome, 2013). Indirectamente, la inducción de degradación de proteínas de la DPS promovería la síntesis de proteínas necesarias para el rearrreglo sináptico y a su vez, permitiría la inserción de los receptores AMPA (permeables a calcio; Hong y col., 2013) implicados en la reconsolidación. De manera directa, la activación del SUP favorece la etapa de reconsolidación, al degradar inhibidores de la transcripción, como ser el MOV 10 (Jarome y col., 2011; Fig. G).

La activación de los R-NMDA y de los R- β A desencadena la activación de distintas vías de control transcripcional y traduccional, incluyendo la activación de la proteína quinasa A (PKA), ERK/MAP quinasa, CaMKII y m-TOR (Duvarci y col., 2005; Tronson y col., 2006; Stoica y col., 2011; Li y col., 2013). De esta manera se promueve el aumento en la expresión y activación de factores de transcripción tales como CREB, NF- κ B, Zif268 (Egr-1) y Npas4 (Merlo y col., 2005; Boccia y col., 2007; Lee y col., 2010; Ploski y col., 2011; Tronson y col., 2012). La puesta en marcha de toda esta maquinaria celular, da como resultado un incremento en la síntesis proteica *de novo* implicada en los cambios morfológicos (Vettere y col., 2013) y funcionales (Bonin y col., 2015) que permiten

reestabilizar la traza de memoria luego de la evocación, a fin de preservar dicha información en el tiempo.

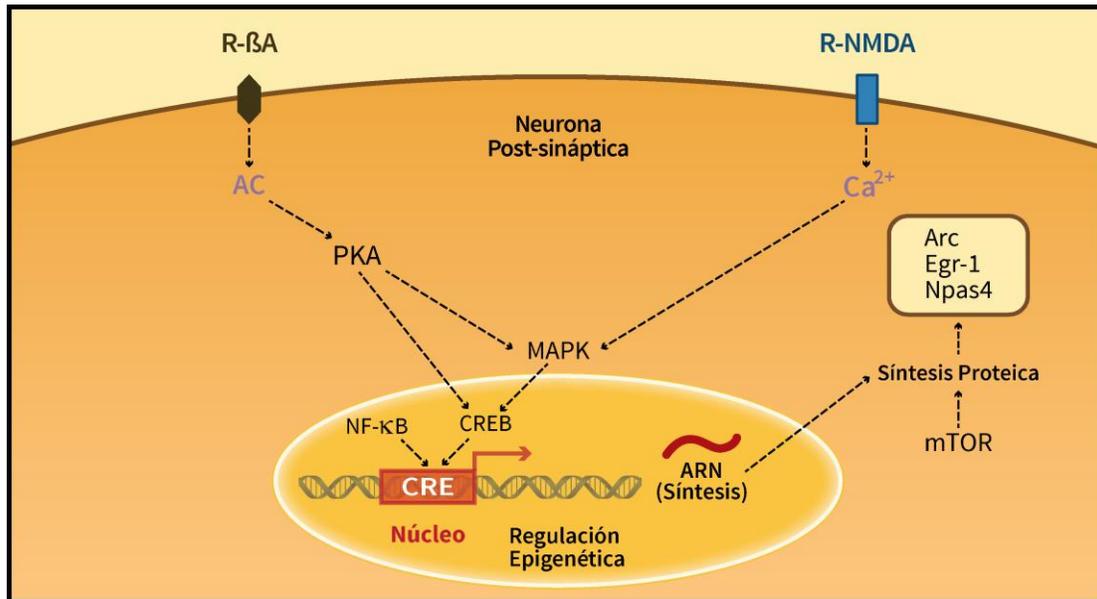


Figura H. Modelo molecular de la fase de reestabilización de una memoria de miedo luego de su evocación. Abreviaturas: R-NMDA: receptor NMDA; Ca²⁺: calcio; R-βA: receptor β-adrenérgico; AC: adenilato ciclasa; PKA: proteína quinasa A; MAPK: proteínas quininas activadas por mitógenos; CREB: proteína de unión al elemento que responde a AMPc; CRE: elemento que responde a AMPc; NF-κB: factor nuclear kappa B; ARN: ácido ribonucleico; m-TOR: diana de rapamicina en células de mamíferos; Egr-1 (Zif-268): factor de respuesta temprana al crecimiento 1; Npas4: *proteína neuronal de dominio PAS 4*; Arc: *proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad*. Adaptado de Johansen y col., 2011.

BLOQUEO DEL PROCESO DE RECONSOLIDACIÓN DE MEMORIAS MALADAPTATIVAS

Los eventos emocionalmente relevantes, como la exposición a experiencias estresantes, o bien el consumo repetido de drogas de abuso y/o la abstinencia a éstas, tienen la capacidad potencial de producir modificaciones en los circuitos cerebrales del aprendizaje y la memoria; generando memorias robustas y persistentes que estarían implicadas en la inducción y mantenimiento de desórdenes psiquiátricos y adicción a drogas. Dichas

memorias denominadas “maladaptativas”, disparan respuestas cognitivas y emocionales alteradas que potencialmente pueden perjudicar la calidad de vida del individuo (Roosendal y col., 2009; Milton y Everitt, 2012). Las memorias “maladaptativas” se caracterizan por la pérdida de la flexibilidad cognitiva-comportamental, alteraciones en los procesos plásticos, generalización de las respuestas y resistencia al proceso de extinción (Taylor y Torregosa, 2015).

En los últimos años, dado su gran potencial terapéutico, ha sido ampliamente estudiado el bloqueo del proceso de reconsolidación de memorias “maladaptativas”. Sin embargo, los resultados hallados son controversiales.

Respecto a las memorias asociadas a drogas de abuso, se ha encontrado que la administración de propranolol (PROP, antagonista de los R- β A) previo a una única sesión de reactivación, interfiere la reconsolidación de una memoria de palabras relacionadas a heroína en sujetos adictos-abstinentes a dicha droga; pero no se analizó si dicha manipulación reduce el consumo de la misma (Zhao y col., 2011). Un estudio en humanos dependientes, indicó que la administración de PROP postevocación de una memoria asociada a cocaína redujo el “*craving*” (deseo-búsqueda compulsiva de la droga) a este psicoestimulante, un día pero no 7 días postmanipulación (Saladin y col., 2013). En otro estudio clínico, Das y col., (2015) han demostrado que el consumo nocivo de alcohol (el cual aumenta los riesgos de daños a la salud) generó una memoria motivacional maladaptativa asociada a alcohol resistente a modificaciones después de su recuerdo. Sin embargo, cuando se favoreció la desestabilización de dicha traza al maximizar el error de predicción, el desarrollo de un contracondicionamiento postevocación redujo el impacto motivacional de estímulos relacionados al alcohol (Das y col., 2015). Además, se ha informado que la administración de PROP o de MK-801 (antagonista no competitivo de los R-NMDA) después de sesiones repetidas de reactivación interfiere la reconsolidación de la memoria asociada a etanol en un paradigma de autoadministración en ratas (Wouda y

col., 2010). Sin embargo, dicho efecto no se observó luego de una única sesión de evocación (Wouda y col., 2010). Otro estudio preclínico reportó una falta de efecto de PROP como interferente de la reconsolidación en el paradigma de condicionamiento de preferencia a un lugar (CPP) asociado a etanol en ratones (Font y Cunningham, 2012). Utilizando el mismo modelo de condicionamiento, se ha observado una resistencia al efecto interferente de PROP y de midazolam (MDZ, modulador alostérico positivo de los receptores GABA-A) postreactivación de una memoria asociada a morfina en ratas dependientes a la misma (Robinson y col., 2011).

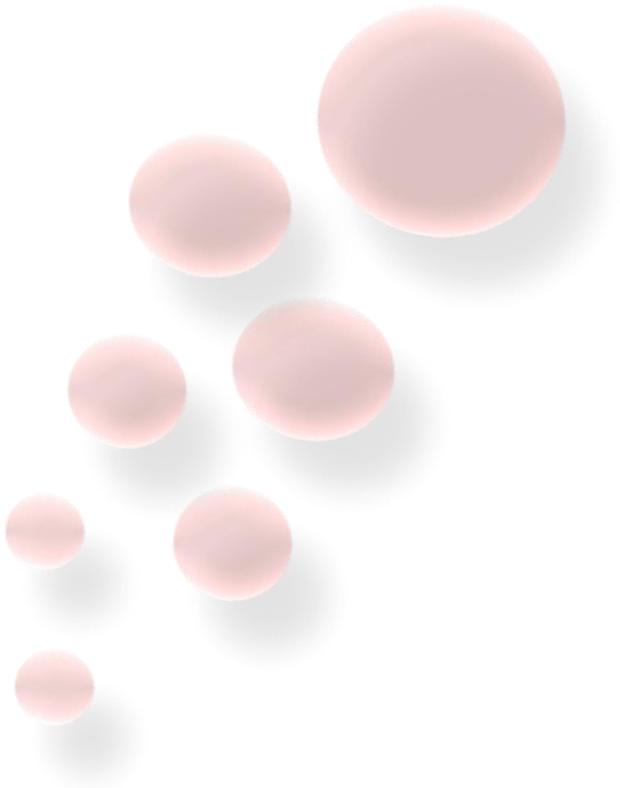
En cuanto al bloqueo de la reconsolidación de memorias traumáticas, investigaciones en pacientes con PTSD (del inglés, desorden de estrés postraumático) revelaron que la administración de PROP después de describir un evento traumático asociado a su patología, disminuyó las respuestas fisiológicas de miedo durante un test subsecuente (Brunet y col., 2008). En un estudio posterior, los mismos autores encontraron que tanto los hombres como las mujeres, debieron recibir 6 sesiones de reactivación en combinación con la administración de PROP antes de la evocación, para mostrar una marcada reducción de los síntomas de PTSD (Brunet y col., 2011). Sin embargo, una investigación reciente ha indicado que la administración de PROP o Mifeprestone (antiprogéstágeno) previa a la reactivación no interfiere la memoria traumática en sujetos con PTSD (Wood y col., 2015), contradiciéndose con los hallazgos de Brunet y colaboradores. Además, se ha reportado que una sesión de reactivación en conjunto con la administración de PROP no fue suficiente para atenuar la expresión de una memoria de miedo previamente formada en individuos vulnerables al desarrollo de desórdenes de ansiedad (Soeter y Kindt, 2013). En un estudio preclínico, Gazarini y col. (2014) mimetizaron el aumento en la actividad noradrenérgica reportada en pacientes con PTSD, mediante la administración de yohimbina después del condicionamiento de miedo contextual, observándose la generación de una memoria aversiva no susceptible al efecto interferente de clonidina (agonista de los receptores α_2 -adrenérgicos) o del cannabidiol

(componente principal de *Cannabis Sativa*, carente de efecto psicoactivo que potencia indirectamente la transmisión mediada por los receptores cannabinoides tipo I) sobre el proceso de reconsolidación. Además, se ha observado que una memoria de miedo robusta, resultante de un entrenamiento con elevada intensidad de descarga eléctrica o por efecto de estrés crónico, es resistente al efecto deletéreo de anisomicina (inhibidor de la síntesis proteica) postreactivación sobre la memoria de miedo (Wang y col. 2009; Hoffman y col., 2015). De manera similar, en nuestro laboratorio se ha encontrado que la exposición a un evento de estrés agudo previo al condicionamiento de miedo, favorece la generación de una memoria aversiva resistente a la interferencia de MDZ luego de su evocación, sugiriéndose una resistencia a la labilización de la memoria en dichos animales estresados (Bustos y col., 2010).

A partir de los estudios descritos, se puede inferir que las memorias “maladaptativas” son menos vulnerables a la interferencia después de su reactivación, y por ende, podría sugerirse que presentan cierta resistencia a la ocurrencia del proceso de labilización-reconsolidación.

Cabe mencionar que, el estudio del proceso de reconsolidación de una memoria de miedo en sujetos dependientes al alcohol es prácticamente inexistente. Como se señaló anteriormente, la memoria de miedo en animales dependientes al etanol es robusta, persistente y resistente a la extinción; por lo que podría considerarse que el consumo crónico/abstinencia al alcohol facilita la formación de una memoria de miedo “maladaptativa”. Sin embargo, resta elucidar si dicha memoria es susceptible a la interferencia luego de su evocación.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



HIPÓTESIS

La ocurrencia de un estado emocional negativo, inducido por una experiencia de estrés inescapable o la abstinencia al etanol, induce una hiperexcitabilidad del complejo ABL, asociada a una disminución en la neurotransmisión GABAérgica (Isoardi y col., 2007). Considerando la participación de dicha estructura cerebral en la adquisición y consolidación de memorias emocionales aversivas, la mayor excitabilidad de las neuronas piramidales amigdalinas podría explicar, al menos en parte, la facilitación para generar memorias de miedo robustas y persistentes que presentan los animales sometidos a una experiencia estresante y los abstinentes al etanol (Bertotto y col., 2006; Bustos y col., 2010). Por lo tanto, la abstinencia al etanol y la ocurrencia de un evento estresante inducen alteraciones similares en la funcionalidad del complejo ABL, que se asocian con la formación de memorias traumáticas. A partir de dichos antecedentes y el hecho de que la memoria aversiva en ratas previamente expuestas a estrés agudo es resistente a la interferencia del proceso de reconsolidación, hipotetizamos que ***la abstinencia al etanol favorece la generación de una memoria de miedo resistente a la interferencia luego de su evocación, resultante de alteraciones en los mecanismos neurobiológicos implicados en el proceso de desestabilización-reconsolidación de la memoria en el ABL.***

Teniendo en cuenta que el recuerdo de una memoria aversiva representa un factor crítico en la vulnerabilidad a la recaída al consumo en animales dependientes al alcohol (Bertotto y col., 2010), y que la estrategia comportamental adoptada por un organismo frente a una situación amenazante está influenciada por el estado interno del individuo (Mc Gaugh, 1983), proponemos que ***el recuerdo de una memoria "traumática" promueve un estado interno de tipo aversivo en animales dependientes al alcohol, asociado a la recaída al consumo.*** Por último, dado los potenciales efectos terapéuticos del bloqueo del proceso de reconsolidación de una memoria aversiva, hipotetizamos que ***las consecuencias***

emocionales inducidas por el recuerdo de miedo en animales abstinentes, pueden ser revertidas al interferir dicho proceso.

OBJETIVO GENERAL

Determinar, mediante estudios comportamentales y moleculares, la influencia de la abstinencia al etanol sobre la generación de una traza mnésica aversiva resistente al proceso de labilización-reconsolidación, como así también el impacto emocional inducido por la evocación de dicha memoria.

De esta manera, se podrá contribuir al conocimiento de los factores implicados en el mantenimiento de la adicción al alcohol, permitiendo la evaluación de diversas manipulaciones capaces de revertir las alteraciones emocionales asociadas a la recaída al consumo de alcohol. Así, se podrán brindar potenciales herramientas terapéuticas para el tratamiento del alcoholismo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I- Investigar el efecto de Midazolam, Propranolol y un estímulo positivo sobre la reconsolidación de una memoria de miedo contextual en animales abstinentes al etanol.

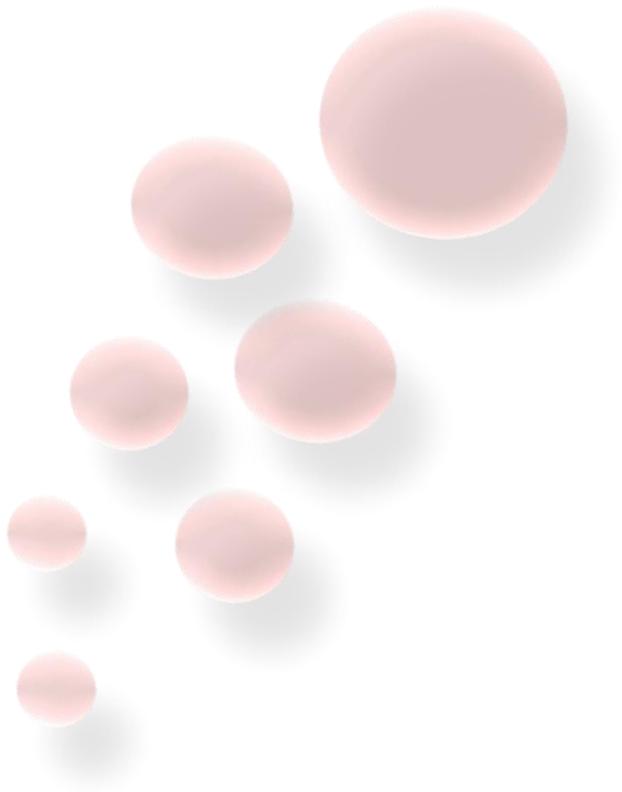
II- Examinar la participación del ABL en la reconsolidación de una memoria de miedo contextual en animales abstinentes al etanol: efecto de Midazolam y de Propranolol.

III- Determinar si la evocación de una memoria de miedo contextual induce secuelas emocionales negativas en animales abstinentes al etanol.

IV- *Evaluar el efecto de la interferencia de la reconsolidación de una memoria de miedo sobre las potenciales secuelas emocionales inducidas por la evocación en animales abstinentes al etanol.*

V- *Evaluar el efecto de la evocación de una memoria de miedo contextual sobre la expresión de la subunidad GluN2B de los R-NMDA y de proteínas poliubiquitinadas, y la actividad proteosomal en el ABL en animales abstinentes al etanol.*

MATERIALES Y MÉTODOS



GENERALIDADES METODOLÓGICAS

ANIMALES

Se utilizaron ratas machos adultas de la cepa Wistar (250-300 g), criadas en el bioterio del IFEC-CONICET, Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Los animales se alojaron en grupos de 3 o 4 individuos por caja estándar de laboratorio (Plexiglas) con libre acceso al agua de bebida y al alimento balanceado (GEP SA Feeds); excepto lo detallado durante el tratamiento crónico con etanol. Los animales fueron albergados en salas con ciclos de luz-oscuridad de 12 h (periodo de luz de 07:00 a 19:00 hs) y con una temperatura ambiente constante de $22 \pm 2^\circ$ C. Todas las manipulaciones y procedimientos experimentales se realizaron entre las 9 y las 17 h. En todos los experimentos, los animales fueron habituados al contacto con el experimentador; para ello fueron trasladados a otra habitación, retirados de sus cajas, manipulados, marcados, pesados y luego retornados a sus cajas y a la habitación de alojamiento común. Este procedimiento se repitió los 5 días previos al inicio de los tratamientos experimentales. Las ratas fueron asignadas al azar a los distintos grupos experimentales. Todos los procedimientos experimentales desarrollados a lo largo de este trabajo cumplen con los estándares para el cuidado de animales indicados en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio elaborada por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH), aprobada por el comité de cuidado y uso de animales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Además, se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento y reducir el número de animales utilizados.

ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE ETANOL

Con el fin de inducir dependencia al etanol, los animales tuvieron libre acceso a una dieta líquida preparada con el suplemento dietario ENSURE, sabor chocolate de laboratorios Abbot (Abbott Laboratories B.V., Zwolle, The Netherlands), como única fuente de alimento. Los animales fueron habituados a la ingesta de dieta líquida durante 2 días y luego asignados al azar a dos grupos: Control, que recibió la dieta líquida control (sin alcohol, CON), y el grupo Etanol (ETOH), que recibió dieta líquida con etanol 6 % (v/v; 1,3 Kcal/ml; alcohol etílico tridestilado 96% vol., Porta Hnos, Argentina) durante 14 días. Se registró diariamente el volumen de dieta líquida consumida y con el propósito de mantener la dieta de ambos grupos isocalórica, el contenido de alcohol fue sustituido con sacarosa en el grupo Control. El agua de bebida estuvo siempre disponible. A partir de la ausencia de etanol en la dieta se inició el período de abstinencia. Reportes previos y de nuestro laboratorio han demostrado que este método de administración de etanol es efectivo para inducir dependencia (Baldwin y col., 1991; Weiss y col., 1996; Devaud y col., 1996; Valdez y col., 2003; Bertotto y col., 2006). Todas las ratas ganaron peso durante el tratamiento con la dieta líquida y no hubo diferencia significativa en el peso corporal entre los grupos tratados con dieta control o etanol al finalizar el tratamiento.

DETERMINACIÓN DE LA ALCOHOLEMIA

Los animales fueron anestesiados y la sangre se obtuvo por punción cardiaca (1 ml). Luego se centrifugaron las muestras a 1.500 x g durante 3 min. Se extrajo el suero y los niveles de alcohol (mg %) se determinaron utilizando un método basado en la oxidación del alcohol a acetaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa (Kit RANDOX, USA). Se determinó la alcoholemia el día 14 de tratamiento obteniéndose una ingesta de etanol que varía de 8,4 a 10,4 g/kg/día, y una alcoholemia que varió desde $80,3 \pm 7,5$ a $132,0 \pm$

5,9 mg/dl; valores suficientes para inducir dependencia al etanol en ratas Wistar (Weiss y col., 1996; Valdez y col., 2003).

DROGAS

Midazolam (MDZ; GobbiNovag S.A) fue diluido en solución salina al 0,9% (SAL) e inyectado intraperitonealmente (i.p) a una dosis de 3mg/kg (Bustos y col., 2010). Para las infusiones en el complejo basolateral de la amígdala (intra-ABL), MDZ fue diluido en SAL a una dosis final de 4 µg/ul, e infundido a 2 µg/lado. Propranolol (PROP, Sigma Aldrich) fue disuelto en SAL e inyectado i.p a una dosis de 10mg/kg (Debiec and LeDoux 2004). Para las infusiones intra-ABL, PROP fue disuelto en SAL a una dosis final de 5 µg/ul e infundido a 1.25 µg/lado (Debiec and LeDoux, 2004). D-cicloserina (DCS; Sigma Aldrich) fue disuelta en SAL e inyectada i.p a una dosis de 5mg/kg (Bertotto y col., 2006). Nimodipina (NIMO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) fue disuelta en SAL con dimetil-sulfóxido (DMSO, 8 %) y administrada por inyección subcutánea (s.c) a una concentración de 16 mg/ml (Haubrich y col., 2015). En todos los experimentos se utilizó SAL o vehículo (VEH, salina con 8 % de DMSO) como inyección control. Para las inyecciones sistémicas, el volumen total de droga o una cantidad equivalente de solución control o vehículo fue de 1 ml/kg.

CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA Y MICROINYECCIÓN INTRACEREBRAL

Implantación de cánulas

Los animales fueron implantados bilateralmente con cánulas guías en el complejo basolateral de la Amígdala (ABL) mediante técnicas estereotáxicas. Cada animal fue anestesiado con una mezcla de anestésico miorelajante compuesta de Ketamina (55 mg/kg) y Xilazina (11 mg/Kg) mediante una inyección i.p. y colocado en un aparato estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, IL) con la barra de incisivos a -3,3 mm. Se realizó un

corte en el cuero cabelludo, se dejó el cráneo expuesto y se tomaron las coordenadas según la posición del Bregma. Se realizaron dos orificios en el cráneo para implantar las cánulas guías de acero inoxidable (22 gauge) de 12 mm longitud. Las cánulas fueron fijadas al cráneo con un tornillo y acrílico dental. Las coordenadas para el ABL se tomaron del atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2009) y fueron las siguientes: antero posterior (AP) -3 mm; lateral \pm 5.0 mm; dorso ventral -6.1 mm. Los animales fueron retirados del estereotáxico y colocados en una caja separada con calor (lámpara) y supervisión constante hasta su recuperación. Después de la cirugía los animales recibieron una inyección subcutánea de una suspensión de estreptomina y penicilina a fin de reducir el riesgo de infecciones. Los días posteriores a la cirugía, los animales fueron manipulados y se simuló la microinyección con el fin de minimizar las respuestas no específicas a este procedimiento durante el experimento. Los animales se dejaron recuperar alrededor de 5 días antes de iniciar los experimentos.

Infusiones intra-ABL

Para la realización de la microinyección, los animales fueron cubiertos con un paño, suavemente sujetados y se introdujeron los inyectores. Se utilizaron como inyectores agujas de acero inoxidable (30 gauge) de 14 mm de longitud que sobrepasaban la cánula guía en 2 mm. La microinyección fue realizada mediante la conexión del inyector a través de un tubo de polietileno (PE 10, Becton Dickinson, MD) a una jeringa de 10 μ l (Hamilton, Reno, NV) montada en una bomba de microinyección (Stoelting, Illinois, USA). Cada rata fue inyectada bilateralmente con una velocidad de flujo de 0,25 μ l/min para el experimento que evalúa el efecto de PROP y 0,5 μ l/min para aquel que examina el efecto de MDZ. Después de completado el volumen de inyección, los inyectores permanecieron en las cánulas guías durante 60 seg adicionales para permitir la difusión de la droga.

Histología

Al finalizar los experimentos conductuales, los animales fueron sacrificados con hidrato de cloral 16 % (400 mg/Kg) o en una cámara de CO₂. Los cerebros fueron extraídos y luego fijados por inmersión en una solución de formaldehído al 4 % al menos por 3 días. Posteriormente, se realizaron cortes coronales de 60 μm de espesor mediante un crióstato (Leica, Nussloch, Alemania) en los que se examinó el sitio de infusión y la presencia/ausencia de hemorragia y necrosis utilizando una lupa binocular (Arcano). Únicamente aquellos animales con una localización correcta del sitio de infusión y el tejido en óptimas condiciones, fueron considerados en el análisis estadístico.

ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO ANIMAL

CONDICIONAMIENTO DE MIEDO CONTEXTUAL

Aparato

El contexto de condicionamiento utilizado fue una caja de acrílico blanco (20 x 20 x 20 cm) con cubierta superior de acrílico transparente. La base de la caja está formada por una grilla de acero inoxidable que consta de 10 barras paralelas de 4 mm de diámetro y 1,5 cm de espaciamiento (de centro a centro) conectada a un generador para la administración de descargas eléctricas en las patas del animal (Ugo Basile, Italia). La caja fue limpiada antes y después de cada sesión experimental con solución de ácido acético al 0,5%. Este equipo se halla en una habitación aislada acústicamente con iluminación (tubo de luz blanca de 30 W) y climatización constante (22 ± 2° C).

Protocolo de Condicionamiento

El día del condicionamiento, cada animal fue individualmente trasladado en una caja especial a la habitación experimental y colocado en la caja de condicionamiento. Después de 3 min de habituación (período pre descarga eléctrica) se procedió al entrenamiento de condicionamiento contextual que consistió en 3 descargas eléctricas (0,5 mA, durante 3 s, con 30 s de intervalo entre las descargas eléctricas). Los animales permanecieron en el contexto asociado con la descarga por 50 seg adicionales (período post descarga eléctrica), luego de los cuales retornaron a sus cajas de alojamiento. Para el experimento de infusiones intra-ABL, las ratas canuladas fueron entrenadas con 3 descargas de 0,65 mA para inducir niveles de respuesta de miedo similares al que muestran los animales no canulados, debido que la canulación crónica en el ABL tiende a atenuar la expresión de la respuesta de congelamiento (Fendt, 2001). *El protocolo de condicionamiento de miedo empleado induce una respuesta de miedo similar en los animales de grupos CON y ETOH. De esta manera, descartamos la posibilidad que las potenciales diferencias obtenidas en los subsecuentes experimentos sean dependientes de los niveles de expresión de miedo condicionado.*

Sesión de reactivación

Consistió en la reexposición de los animales al contexto de condicionamiento en ausencia de la descarga eléctrica durante 3 ó 5 min, según el experimento.

Test de retención de la memoria de miedo

Consistió en la reexposición de los animales al contexto de condicionamiento en ausencia de la descarga eléctrica durante 5 ó 10 min a las 24 horas (Test 1) y a los 8 días (Test 2,

para evaluar los efectos a largo plazo) post-reactivación; con el fin de evaluar la retención de la memoria de miedo.

Evaluación del miedo condicionado

El parámetro empleado como índice de miedo fue la respuesta de congelamiento o “freezing”. La cual se define como la ausencia total de movimiento del cuerpo o de la cabeza, excepto aquellos asociados a la respiración del animal (Blanchard y Blanchard, 1969; Bolles y Collier, 1976). La respuesta de congelamiento de cada animal fue registrada durante los períodos de pre y post descarga eléctrica, como también durante la sesión de reactivación y tests. El tiempo total de permanencia en congelamiento fue cuantificado en segundos usando un cronómetro, y registrado por una persona sin conocimiento de la condición experimental de cada animal.

***Aclaración:** a los fines de facilitar la lectura de esta tesis, se consideraron como sinónimos los siguientes términos: reexposición, evocación y recuerdo. A su vez, dado que la sesión de reactivación y los tests de retención de la memoria son reexposiciones al contexto de condicionamiento, también se los refiere como evocación o recuerdo.*

ESTÍMULO POSITIVO

Cerveza sin alcohol

Se utilizó como estímulo apetitivo la cerveza sin alcohol dado que resulta ser altamente palatable para los roedores, quienes muestran una marcada preferencia por esta bebida en comparación con el agua (Cox y Mertz, 1985). La cerveza sin alcohol (NB, Lieber, Quilmes, Argentina, 0.4% alcohol/volumen, 45.9 Kcal/100 ml) fue decarbonatada por vigorosa agitación durante al menos 2 hs, y presentada en probetas graduadas (50 ml)

con picos de vidrio a temperatura ambiente. Dicha agitación fue también necesaria para la evaporación del bajo contenido de alcohol que presenta la cerveza “Lieber” (Orru y col., 2007).

Presentación del estímulo positivo

Los animales fueron colocados individualmente en una caja, la cual presentó características semejantes a de las cajas alojamiento y fue ubicada en la misma habitación que éstas. Las ratas tuvieron acceso a probetas graduadas con cerveza sin alcohol o agua (según el experimento) por 2 h durante 3 días (fase de habituación) y a diferentes intervalos de tiempo después de la sesión de reactivación de la memoria. Cabe resaltar que los animales no fueron sujetos a privación de comida ni agua. La cantidad de bebida consumida fue registrada y expresada en ml/kg.

LABERINTO EN CRUZ ELEVADO

El laberinto en cruz elevado es un modelo que evalúa el comportamiento tipo-ansiedad en roedores, y ha sido extensamente validado usando criterios conductuales, fisiológicos y farmacológicos (Pellow y File, 1986; Rodgers y Cole, 1994). La prueba se basa en la respuesta incondicionada del animal frente a un nuevo ambiente que representa un conflicto de aproximación-evitación para el mismo, al presentar dos zonas diferentes: una potencialmente peligrosa y otra segura. El movimiento del animal puede ser explicado como el resultado de una ponderación entre la motivación de explorar y la aversión que experimenta en una determinada posición del laberinto.

El aparato está construido en acrílico negro y consta de dos brazos abiertos con bordes de 0,5 cm y dos brazos cerrados opuestos conectados por un cuadrado central de 10 x 10 cm formando una figura tipo X. Las dimensiones de cada brazo son 50 x 10 cm. Los brazos

cerrados carecen de cubierta superior y tienen una pared de 40 cm de altura. El laberinto está elevado a una altura de 50 cm con respecto al nivel del piso. En su estado natural la rata elige estar cerca de superficies verticales, preferiblemente rincones y lugares con poca iluminación, los campos abiertos y las alturas le causan aversión, lo que explica que la rata permanezca más tiempo en los brazos cerrados que en los brazos abiertos. De esta manera, una respuesta de ansiedad incrementada se manifiesta tanto por la disminución del porcentaje de tiempo en los brazos abiertos como del número de entradas en los mismos (Handley y Mc Blane, 1993; Rodger y Cole, 1994). El número absoluto de entradas en los brazos cerrados refleja la actividad motora general (Cruz y col., 1994).

Las pruebas de comportamiento se realizaron en una sala de experimentación bajo condiciones de luz tenue-débil (100 luxes). Los animales fueron habituados a este ambiente durante al menos 30 minutos antes de comenzar las pruebas. Las ratas se colocaron en el cuadrado central del laberinto enfrentando hacia un brazo cerrado y se registraron durante 5 minutos: el número de entradas en los brazos abiertos y cerrados, y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos, el cual se expresó como: $[(\text{tiempo de permanencia en los brazos abiertos} / \text{tiempo de permanencia en los brazos abiertos} + \text{tiempo de permanencia en los brazos cerrados}) \times 100]$.

CONTEXTO NOVEDOSO

A fin de evaluar la respuesta de miedo en un contexto nuevo (con características diferentes a la caja de condicionamiento de miedo), las ratas fueron colocadas en una caja de madera negra (33 x 25 x 33 cm) con piso cubierto con una goma negra texturada, en una habitación totalmente desconocida para el animal. La respuesta de congelamiento en dicho contexto novedoso fue registrada durante 5 min mediante el uso de un cronómetro.

ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

DISECCIÓN

Para el desarrollo de los estudios moleculares, los animales fueron transferidos individualmente a una sala e inmediatamente sacrificados por decapitación. Los cerebros fueron removidos rápidamente y colocados en una matriz de acrílico (Stoelting CO, USA) sobre hielo. Se realizaron cortes coronales del cerebro de 2 mm de espesor a partir de los cuales se realizó la disección de amígdala basolateral (ABL; Paxinos y Watson, 2009).

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Proteínas totales: Western Blot y Actividad Enzimática del Proteosoma

Para realizar la extracción de proteínas totales, el tejido obtenido fue homogeneizado mediante sonicador (40% amplitud; 5 pulsos/ 3 seg/ 10 seg intervalo) en buffer de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Hepes 0,025 M; NaCl 0,25 M; EDTA 0,002 M; DTT 0,001; 0,1% de NP40; 10 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina; 1 µg/ml pepstatina A; 100 µg/ml fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 1 mM de ortovanadato de sodio (Na₃VO₄)) en hielo. Luego las muestras fueron centrifugadas a 20.000 × g durante 3 min a 4 °C. Los sobrenadantes fueron almacenados a -70 °C hasta su uso.

Previo al ensayo de Western Blot, las muestras fueron descongeladas, una alícuota fue utilizada para la cuantificación de proteínas y al resto se le agregó buffer muestra 4X (un tercio del volumen total; 4 % SDS, DTT 400 mM; 50 % glicerol, 125 mM Tris pH 6,8, 0.02 % azul de bromofenol). Posteriormente, fueron hervidas durante 5 min a 100 °C. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bio-Rad Bradford Protein Assay Kit; Hercules, CA). La expresión proteica de la subunidad GluN2B del R-

NMDA y de las proteínas poliubiquitinadas fueron determinadas utilizando extractos de proteínas totales.

Para el ensayo de la actividad catalítica del proteosoma, las muestras que contienen proteínas totales fueron descongeladas, una alícuota fue utilizada para la cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford (Bio-Rad Bradford Protein Assay Kit; Hercules, CA) y el resto fue utilizado para el análisis enzimático.

Proteínas de superficie: Entrecruzamiento con bis(sulfosuccinidil)suberato (BS3)

Para el estudio de la expresión de proteínas en superficie se utilizó la técnica de entrecruzamiento proteico, conocido como "*Crosslinking*", utilizando como reactivo principal el bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS3) (Boudreau y col., 2012). Los animales fueron sacrificados y se realizó la disección del ABL como se detalló anteriormente. Dado que, cada muestra se obtuvo a partir de 2 animales, se combinó la porción derecha de la estructura de un animal con la izquierda del otro y viceversa; obteniéndose así dos fracciones de una misma muestra. El tejido fue disgregado manualmente mediante el uso de una hoja de cuchilla gilette ("*chopping*"). Posteriormente, una fracción de la muestra fue incubada con BS3 (52mM en buffer citrato: ácido cítrico 5 mM y citrato de sodio 5 mM; pH 5) en aCSF (CaCl₂ 0,012 M; Hepes 0,2 M; NaCl 1,47 M; KCl 0,027 M; MgCl 0,01 M; Dextrosa 1M) y la otra fracción sólo con aCSF (porción no tratada-NT) durante 30 min en agitación a 4 °C. Inmediatamente después se bloqueó la reacción al agregar glicina (100ul, 1M) a cada muestra e incubar 10 min a 4°C en agitación. Luego se centrifugó durante 2 min a 20.000 x g a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en buffer de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasa (100ul; Hepes 0,025 M; NaCl 0,25 M; EDTA 0,002 M; DTT 0,001; 0,1% de NP40; 10 µg/ml aprotinina; 1 µg/ml leupeptina; 1 µg/ml pepstatina A; 100 µg/ml fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 1 mM ortovanadato de sodio (Na₃VO₄)) y se homogeneizó mediante sonicador de punta (40%

amplitud; 5 pulsos/ 3 seg/ 10 seg intervalo). Posteriormente, se centrifugaron las muestras durante 2 min a 20.000 x g a 4°C y los sobrenadantes fueron almacenados a -70 °C hasta su uso. Previo al desarrollo de la técnica de Western Blot, las muestras fueron descongeladas, una alícuota fue utilizada para la cuantificación de proteínas y al resto se le agregó buffer muestra 4X (un tercio del volumen total; 4 % SDS, DTT 400 mM; 50 % glicerol, 125 mM Tris pH 6,8, 0.02 % azul de bromofenol). Posteriormente, fueron hervidas durante 10 min a 70 °C. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bio-Rad Bradford Protein Assay Kit; Hercules, CA). EL BS3 no atraviesa las membranas celulares, por lo que se une selectivamente a proteínas de superficie mediante enlaces sulfuro, y forma agregados de alto peso molecular; mientras que las proteínas intracelulares no presentan alteraciones. Esta reacción permite que las proteínas de superficie e intracelulares puedan ser distinguidas en base a su peso molecular mediante Western Blot. La expresión de la subunidad $\alpha 1$ de los receptores GABA-A (R-GABA-A) en la superficie celular se calculó como la diferencia entre los niveles que revela la muestra de proteínas total (NT) menos los niveles que se registran en la muestra tratada con BS3 (banda intracelular) (Ver Fig. I; Díaz y col., 2011; Suryanarayanan y col., 2011).

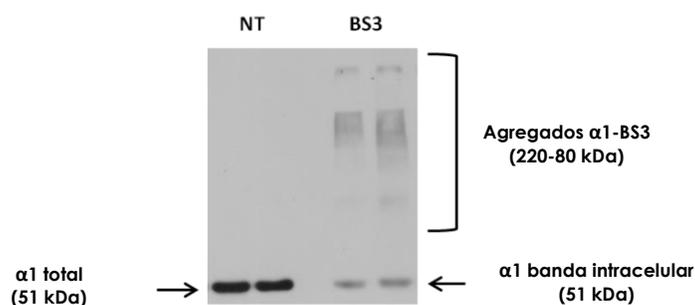


Figura I. Bandas representativas de la expresión de la subunidad $\alpha 1$ del R-GABA-A mediante análisis por Western Blot (gel 7,5% SDS-PAGE), en muestras de homogeneizado total (NT) y en muestras tratadas con BS3 (agregados proteicos y bandas intracelulares).

Western Blot

El estudio de la expresión proteica de la subunidad $\alpha 1$ del R-GABA-A, de la subunidad GluN2B de los R-NMDA y de las proteínas poliubiquitinadas, se realizó mediante la técnica de Western Blot. Para tal fin, las muestras fueron sembradas y separadas en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 7,5% y posteriormente transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, BioRad). Después de tres lavados con buffer TBS-Tween (TTBS; 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, Tween 20 0,1%), las membranas fueron incubadas con leche descremada (0 % grasa) o albúmina sérica bovina (BSA) disuelta al 5% en TTBS durante 1 h a temperatura ambiente en agitación, a fin de reducir uniones inespecíficas (bloqueo). Luego se incubaron en agitación durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla A). Al día siguiente, las membranas fueron lavadas 3 veces con TTBS y posteriormente incubadas a temperatura ambiente durante 2 h con el anticuerpo secundario adecuado para cada caso (Tabla A). Luego de tres lavados con TTBS se procedió al revelado (Tabla A).

Se utilizaron las proteínas constitutivas Actina y Tubulina como control interno de siembra. Para la determinación de dichas proteínas, después del revelado los anticuerpos primarios adheridos a las membranas fueron removidos mediante la utilización de NaOH 1M durante 2 min a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con TTBS, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios anti-actina o anti-tubulina a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se incubaron con sus correspondientes anticuerpos secundarios durante 2 h a temperatura ambiente, procediéndose después al revelado indicado (Tabla B). Las bandas escaneadas fueron evaluadas y cuantificadas con el programa computacional de análisis de imágenes Gel-Pro Analyzer Software. La cuantificación de la señal consistió en medir la densidad óptica para cada banda estableciendo la relación entre los valores obtenidos para la proteína de interés y los valores de densidad óptica de la proteína control de siembra. Por lo tanto, los datos fueron presentados como la

relación entre: $\alpha 1$ /Actina total, Proteínas Poliubquitinadas/Actina total y GluN2B/Tubulina de cada muestra. Cabe mencionar además, que los resultados fueron normalizados con la señal total de cada placa.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DEL PROTEOSOMA

La actividad catalítica del proteosoma fue determinada utilizando el kit comercial "20S Proteasome Activity Assay" (APT280, Millipore). Las muestras (20 μ g) fueron diluidas en buffer de reacción. Luego se adicionó 10 μ l de sustrato fluorogénico (Fluorogenic peptide Suc-LLVY-AMC) para evaluar la actividad enzimática del proteosoma tipo-quimiotripsina. La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 1,30 hs. La fluorescencia fue determinada utilizando un fluorómetro para microplacas (Biotek) con filtros de 360nm (excitación)/460nm (emisión). Los correspondientes controles fueron realizados en cada ensayo: blanco libre de proteínas, control positivo y control negativo. Además, se desarrolló la curva estándar del producto AMC, utilizada para referenciar los valores de fluorescencia obtenidos de cada muestra. La unidad de actividad tipo-quimiotripsina del proteosoma se definió como los pmoles de AMC generados por μ g de proteínas a 37°C durante 1,30 hs. Los resultados fueron expresados como porcentaje de la actividad enzimática de los grupos no reactivados.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresaron como la media \pm E.E.M (error estándar de la media). Se realizaron T-test y análisis de varianza (ANOVA) de una o más vías, según el caso. Para las comparaciones post hoc se utilizaron las pruebas Tukey-HSD o Newman-Keuls. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados como diferencias significativas entre los grupos. En el Anexo se muestran los valores de las medias y los E.E.M de cada grupo por experimento.

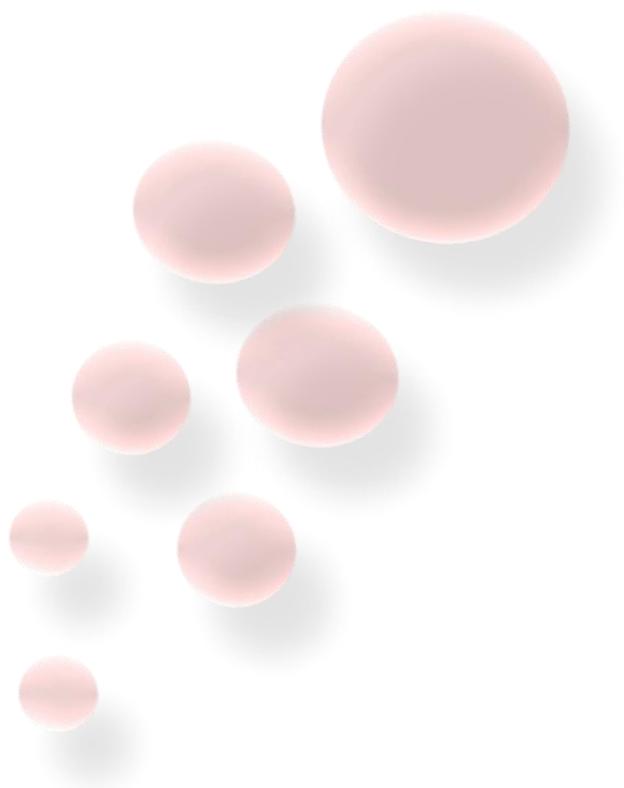
Proteína en estudio	Subunidad Alfa-1	Proteínas Poliubiquitinadas	Subunidad GluN2B
Peso Molecular	51 kDa	50-250 kDa	160 kDa
Siembra (ug)	15	40	15
Bloqueo	Albúmina	Leche	Albúmina
Ac Primario	Anti-subunidad- α 1 de R-GABAA monoclonal de conejo (1:750 en albúmina al 5 % en TTBS; Millipore).	Anti-Ubiquitina - Lys-48 monoclonal de conejo (1:500 en Leche al 5 % en TTBS; Millipore).	Anti-subunidad- GluN2B de R-NMDA policlonal de conejo (1:750 en albúmina al 5 % en TTBS; Cell Signaling).
Ac Secundario	IgG anti-conejo conjugado a peroxidasa (HRP) (1:2500; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.)	IgG anti-conejo conjugado a peroxidasa (HRP) (1:2500; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.)	IgG anti-conejo (1:20000; IRDye® 800 WC)
Revelado	Quimioluminiscencia: con luminol, ácido cumárico como catalizador y peróxido de hidrógeno como sustrato de reacción (ECL) y mediante la exposición de las membranas a las placas radiográficas (Ortho COG Plus-AGFA). Las placas obtenidas luego del revelado fueron escaneadas para su posterior análisis de imágenes.	Quimioluminiscencia: con luminol, ácido cumárico como catalizador y peróxido de hidrógeno como sustrato de reacción (ECL) y mediante la exposición de las membranas a las placas radiográficas (Ortho COG Plus-AGFA). Las placas obtenidas luego del revelado fueron escaneadas para su posterior análisis de imágenes.	Las bandas fueron visualizadas por el escáner LI-COR Odyssey imager.

Tabla A. Especificaciones de la técnica Western Blot para las proteínas de interés: subunidades α 1 y GluN2B, y proteínas poliubiquitinadas.

Proteína en estudio	Actina	Tubulina
Peso Molecular	43 kDa	55 kDa
Bloqueo	Albúmina	Albúmina
Ac Primario	Anti-actina monoclonal de ratón (1:1000 en albúmina al 5 % en TTBS; Sigma Aldrich).	Anti-Tubulina monoclonal de conejo (1:2500 en albúmina al 5 % en TTBS; Sigma Aldrich).
Ac Secundario	IgG anti-ratón conjugado a peroxidasa (HRP) (1:2500; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.)	IgG anti-conejo (1:20000; IRDye® 800 WC)
Revelado	Quimioluminiscencia: con luminol, ácido cumárico como catalizador y peróxido de hidrógeno como sustrato de reacción (ECL) y mediante la exposición de las membranas a las placas radiográficas (Ortho COG Plus-AGFA). Las placas obtenidas luego del revelado fueron escaneadas para su posterior análisis de imágenes.	Las bandas fueron visualizadas por el escáner LI-COR Odyssey imager.

Tabla B. Especificaciones de la técnica Western Blot para las proteínas control de siembra: Actina y Tubulina.

RESULTADOS



CAPÍTULO I

Efecto de Midazolam, Propranolol y un estímulo positivo sobre la reconsolidación de una memoria de miedo en animales abstinentes al etanol.

Objetivo IA: “Efecto de la administración de Midazolam y Propranolol sobre la reconsolidación de una memoria de miedo en animales abstinentes al etanol”

Fundamento

Como se ha mencionado anteriormente, las estrategias tendientes a atenuar memorias aversivas podrían tener relevancia en el contexto del alcoholismo. Además, la interferencia del proceso de reconsolidación de la memoria ha sido postulada como un potencial tratamiento para desórdenes psiquiátricos y la adicción a drogas. En relación a ello, diversos estudios realizados tanto en animales como en humanos han demostrado que la administración de Midazolam (MDZ; modulador alósterico positivo de los R-GABA-A) o Propranolol (PROP; antagonista de los R- β A) luego de la evocación, promueve una atenuación de la traza mnésica afectando el proceso de reconsolidación de memorias de miedo y asociadas a drogas (Debiec y LeDoux, 2004; Bustos y col., 2009; Wouda y col., 2010). Sin embargo, se desconoce el efecto interferente de dichos agentes farmacológicos sobre la reconsolidación de una memoria de miedo en animales dependientes al etanol. Por consiguiente, se procedió a evaluar la vulnerabilidad de una memoria de miedo contextual generada durante la abstinencia al etanol, al efecto interferente de MDZ y PROP sobre el proceso de reconsolidación de dicha memoria.

Experimento I: Efecto de MDZ sobre la reconsolidación de una memoria de miedo en animales abstinentes al etanol.

Experimento I.a: Efecto de la inyección de MDZ después de una sesión de reactivación de 3 min de duración.

Procedimiento

Los animales de los grupos CON y ETOH fueron sometidos al condicionamiento de miedo contextual (CMC) el tercer día de abstinencia, tal como se describió en Materiales y Métodos. Al día siguiente fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento durante 3 min e inmediatamente después se inyectó MDZ (3 mg/kg. i.p.) o SAL. Un día (Test 1) y ocho días (Test 2) después, se evaluó la respuesta de miedo durante 10 min. Los grupos experimentales fueron: CON-SAL (n=9), CON-MDZ (n=10), ETOH-SAL (n=8) y ETOH-MDZ (n=8). Para el análisis estadístico, los factores que se consideraron fueron: dieta (CON vs ETOH) y droga (SAL vs MDZ). El protocolo experimental se muestra en la Fig. 1A.

Resultados

Como era de esperar, por el protocolo de condicionamiento utilizado, durante los 3 min de la sesión de reactivación todos los animales exhibieron niveles similares de respuesta de miedo ($[F(1, 31) = 1,93, p = 0,17]$; Fig. 1B). La Fig. 1C muestra que la administración de MDZ después de 3 min de reexposición al contexto de condicionamiento, indujo una reducción de la respuesta de congelamiento en los animales del grupo CON durante el Test 1. Sin embargo, MDZ fue inefectivo en las ratas ETOH. Dicho efecto fue persistente en el tiempo, evidenciándose hasta una semana después (Test 2). El ANOVA de dos vías indicó una interacción significativa de la dieta x droga para el Test 1 $[F(1, 31) = 42,63; p < 0,05]$ y para el Test 2 $[F(1,31) = 21,19; p < 0,05]$.

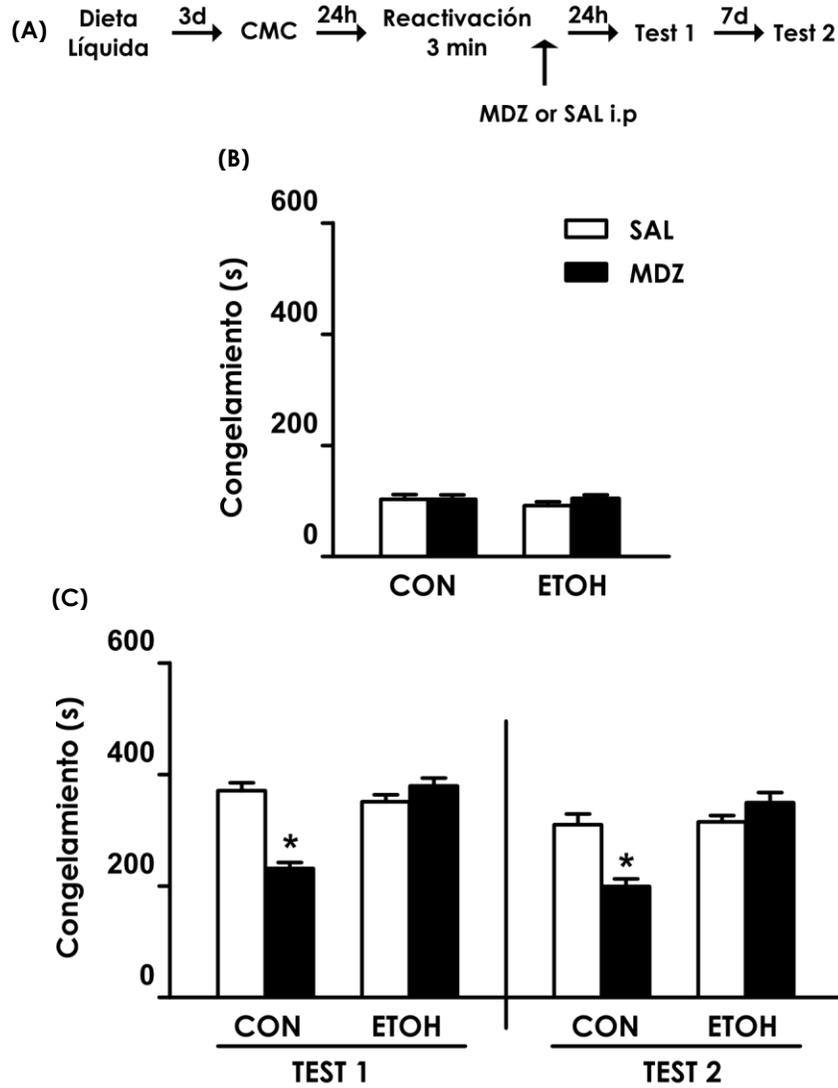


Figura 1. Efecto de la inyección de MDZ después de una sesión de reactivación de 3 min de duración, sobre la reconsolidación de una memoria de miedo contextual en animales ETOH. A- Esquema experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la sesión de reactivación de 3 min de duración. C- Respuesta de congelamiento durante los tests de retención de la memoria. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M del tiempo de congelamiento. (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$.

En ambos tests, el análisis *post hoc* reveló que las ratas CON tratadas con MDZ postevocación exhiben una respuesta de congelamiento significativamente menor en comparación con la que muestran el resto de los grupos.

Experimento I.b: Efecto de la inyección de MDZ después de una sesión de reactivación de 5 min de duración.

Procedimiento

Diversos estudios han demostrado que las memorias fuertes podrían requerir un mayor tiempo de duración de la sesión de reexposición para poder ser interferidas farmacológicamente (Suzuki y col., 2004; Bustos y col., 2009). A fin de atenuar la memoria de miedo en ratas abstinentes, evaluamos el efecto de un incremento en la duración de la sesión de reactivación. Para ello, seguimos el protocolo descrito en el *Exp. I.a* pero inyectamos MDZ (3 mg/kg. i.p.) o SAL inmediatamente después de una sesión de reactivación de 5 min de duración. Los grupos experimentales fueron: CON-SAL (n=6), CON-MDZ (n=6), ETOH-SAL (n=6) y ETOH-MDZ (n=6). Para el análisis estadístico, los factores que se consideraron fueron: dieta (CON vs ETOH) y droga (SAL vs MDZ). La Fig. 2A. muestra el protocolo experimental descrito.

Resultados

Al incrementar la duración de la sesión de reactivación a 5 min, todos los grupos siguen presentando niveles similares de congelamiento durante la evocación ($[F(1, 20) = 1,92; p = 0,18]$; Fig. 2B). La Fig. 2C indica que la administración de MDZ 5 min después de la reactivación de la memoria fue inefectiva en atenuar los niveles de congelamiento en ratas ETOH. Sólo los animales CON inyectados con MDZ presentaron una respuesta de

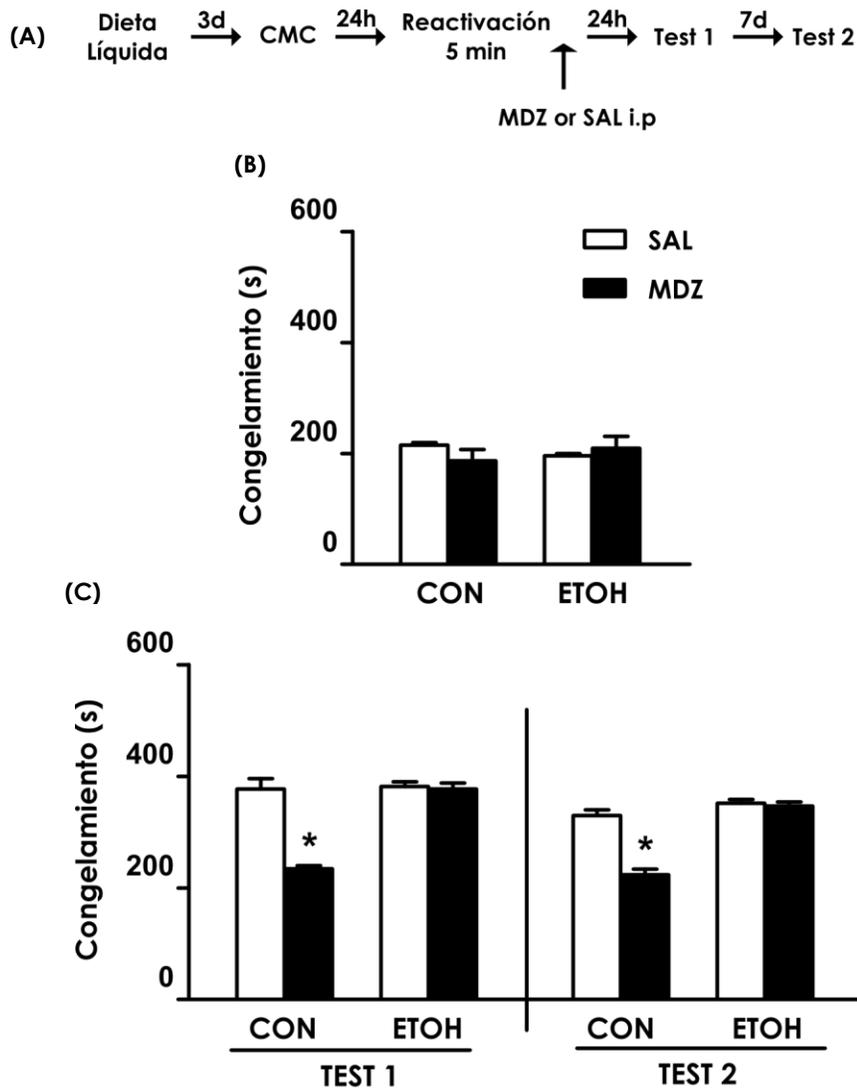


Figura 2. Efecto de la inyección de MDZ después de una sesión de reactivación de 5 min de duración, sobre la reconsolidación de una memoria de miedo contextual en animales ETOH. A- Esquema experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la sesión de reactivación de 5 min de duración. C- Respuesta de congelamiento durante los tests de retención de la memoria. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M del tiempo de congelamiento. (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$.

miedo disminuida durante ambas pruebas de retención de la memoria. El ANOVA de dos vías reveló una interacción significativa de la dieta x droga para Test 1 [$F(1,20) = 33,32$; $p < 0,05$] y Test 2 [$F(1,20) = 33,05$; $p < 0,05$]). El test *post hoc* indicó que las ratas CON tratadas con MDZ postevocación exhiben una respuesta de congelamiento significativamente menor que la exhibida por los grupos restantes durante ambos tests de retención de la memoria.

Experimento I.c: Efecto de la administración de MDZ sobre la memoria de miedo en animales no sometidos a la sesión de reactivación.

Procedimiento

Como se mencionó en la introducción, en el estudio del proceso de reconsolidación es necesario confirmar que el posible efecto del agente en estudio sea dependiente de la evocación de la memoria. Por lo tanto, todos los diseños experimentales incluyen grupos de animales no sujetos a la sesión de reactivación (grupos no reactivados, NR). Así en este primer experimento, paralelamente animales de ambos grupos (CON y ETOH) recibieron una inyección de MDZ (3 mg/kg, i.p) o SAL en su caja alojamiento 24 h postcondicionamiento de miedo, sin ser sometidos a la sesión de reactivación. Los grupos experimentales fueron: CON-SAL (n=7), CON-MDZ (n=7), ETOH-SAL (n=7) y ETOH-MDZ (n=8). Para el análisis estadístico, los factores que se consideraron fueron: dieta (CON vs ETOH) y droga (SAL vs MDZ). El diseño experimental se puede observar en la Fig. 3A.

Resultados

La Fig. 3B muestra que el efecto de MDZ fue dependiente de la sesión de reactivación ya que los grupos no reactivados muestran niveles de congelamiento similares entre sí

durante el Test ($[F(1,25) = 0,28; p = 0,60]$); y no difieren respecto de aquellos exhibidos por los grupos reactivados: CON-SAL, ETOH-SAL y ETOH-MDZ.

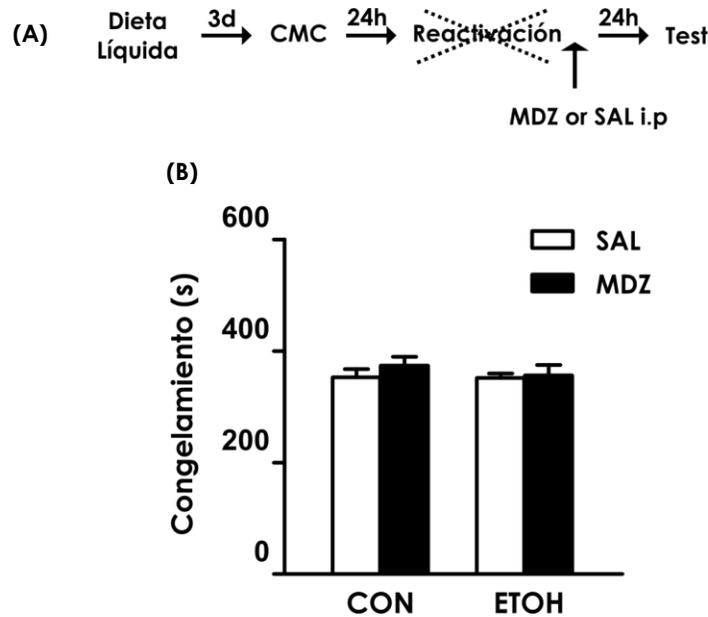


Figura 3. Efecto de la inyección de MDZ sobre la memoria de miedo en animales no sometidos a la sesión de reactivación. A- Esquema experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la prueba de retención de la memoria. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M del tiempo de congelamiento.

En conjunto, estos resultados sugieren que independientemente de la duración de la sesión de reactivación, MDZ no afecta la respuesta de miedo en animales abstinentes al etanol.

A fin de aumentar la probabilidad de interferencia de la memoria aversiva, la duración de la sesión de reactivación utilizada en los siguientes experimentos fue de 5 min.

Experimento II: Efecto de PROP sobre la reconsolidación de una memoria de miedo en animales abstinentes al etanol.

Procedimiento

Las ratas de los grupos CON y ETOH fueron sometidas al condicionamiento de miedo contextual el tercer día de abstinencia, tal como se describió en Materiales y Métodos. Al día siguiente fueron reexpuestas al contexto durante 5 min e inmediatamente después se inyectó PROP (10 mg/kg. i.p) o SAL. Un día (Test 1) y ocho días (Test 2) después, se evaluó la respuesta de miedo durante 10 min. Los grupos experimentales fueron: CON-SAL (n=8), CON-PROP (n=11), ETOH-SAL (n=8) y ETOH-PROP (n=9). Paralelamente, animales de ambos grupos (CON y ETOH) fueron entrenados y un día después recibieron una inyección de PROP (5mg/kg, i.p) o SAL en su caja alojamiento sin ser sometidos a la sesión de reactivación (grupos no reactivados, NR). Los grupos experimentales fueron: CON-SAL (n=9), CON-PROP (n=8), ETOH-SAL (n=9) y ETOH-PROP (n=11). Para el análisis estadístico, los factores que se consideraron fueron: dieta (CON vs ETOH) y droga (SAL vs PROP). Las figuras 4A y 5A ilustran ambos diseños experimental utilizados.

Resultados

En la Fig. 4B puede observarse que todos los animales asignados para evaluar el efecto del PROP muestran niveles de respuesta de miedo similares durante la sesión de reactivación ($[F(1, 32) = 0,15, p = 0,70]$). La Fig. 4C muestra que PROP postreactivación promovió una reducción en los niveles de congelamiento sólo en el grupo CON durante el Test 1 y el Test 2. El análisis estadístico ANOVA de dos vías mostró una interacción significativa de la dieta x droga para el Test 1 ($[F(1,32) = 13,34; p < 0,05]$) y para el Test 2 ($[F(1,32) = 8,32; p < 0,05]$). La prueba de Tukey HSD indicó que las ratas CON inyectadas con PROP postevocación presentan niveles de congelamiento significativamente menores

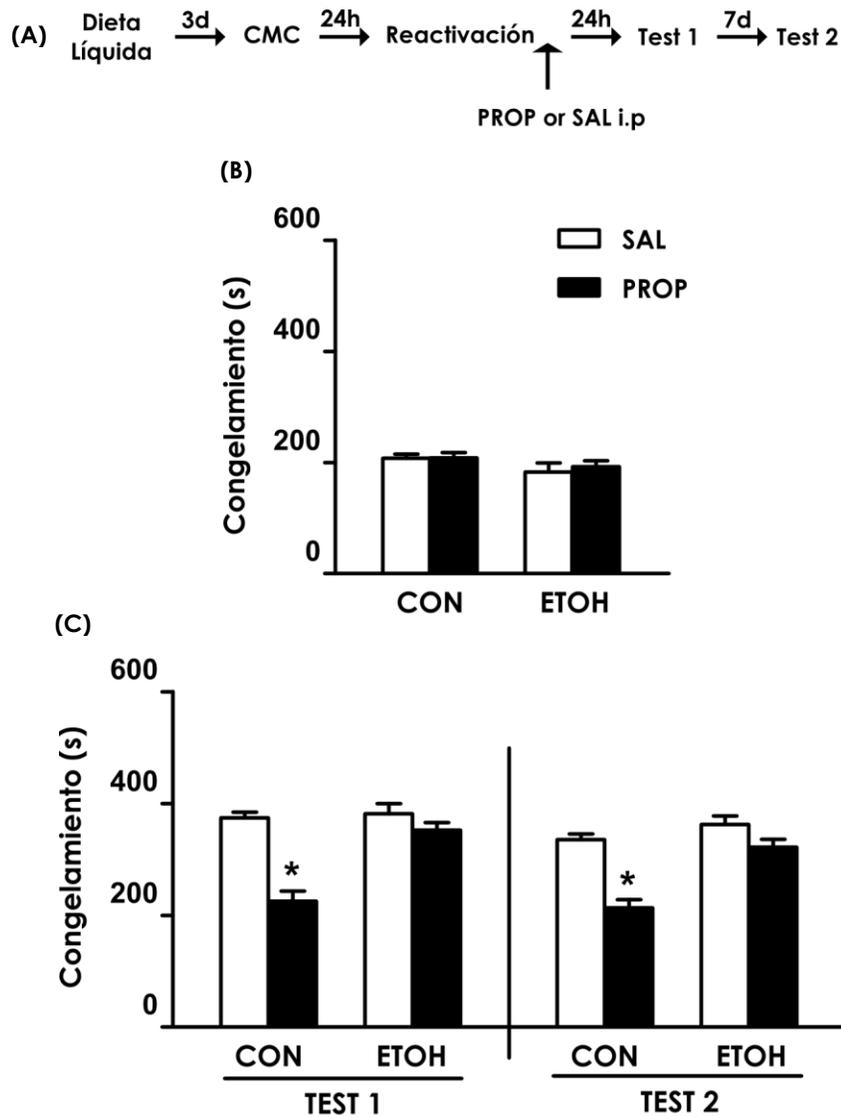


Figura 4. Efecto de la inyección de PROP sobre la reconsolidación de una memoria de miedo contextual en animales ETOH. A- Esquema experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la sesión de reactivación de 5 min de duración. C- Respuesta de congelamiento durante los tests de retención de la memoria. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M del tiempo de congelamiento. (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$.

que el resto de los grupos durante ambas pruebas de memoria. Además, el efecto atenuante de PROP sobre la memoria fue dependiente de la sesión de reactivación, debido que todas las ratas de los grupos no reactivados muestran niveles de congelamiento elevados durante el test de retención ($[F(1,33) = 0,05; p = 0,82]$; Fig. 5B).

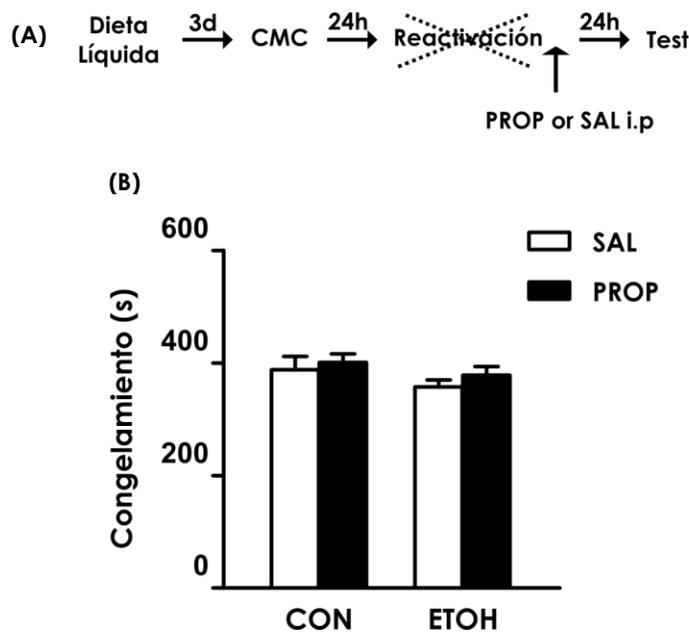


Figura 5. Efecto de la inyección de PROP sobre la memoria de miedo en animales no sometidos a la sesión de reactivación. A- Esquema experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la prueba de retención de la memoria. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M del tiempo de congelamiento.

A partir de estos resultados se puede inferir que la administración de PROP luego de la evocación no modifica la respuesta de miedo en las ratas abstinentes al etanol.

Experimento III: Influencia de D-cicloserina sobre el efecto interferente de MDZ y PROP sobre la reconsolidación de una memoria de miedo en animales abstinentes al etanol.

Fundamento

Es bien conocido que la activación de los R-NMDA es un evento neurobiológico esencial para que ocurra el proceso de labilización de la memoria inducido por el recuerdo (Ben Mamou y col., 2006). En esta línea, Bustos y col. (2010), han demostrado que la activación de dichos receptores por la administración de D-cicloserina (DCS, agonista parcial del sitio de glicina de los R-NMDA) previo a la reactivación promueve a la desestabilización de una memoria resistente inducida por estrés, permitiendo de esta manera poder interferir dicha traza mnésica con la administración de MDZ postevocación. Por lo tanto, se procedió a investigar la influencia de DCS sobre el efecto interferente de MDZ (Exp. III.a) y PROP (Exp. III.b) sobre el proceso de reconsolidación de una memoria de miedo en animales dependientes al etanol.

Procedimiento

Los animales de los grupos CON y ETOH fueron sometidos al condicionamiento de miedo contextual el tercer día de abstinencia, tal como se describió en Materiales y Métodos. Al día siguiente se inyectó SAL o DCS (5 mg/kg, i.p.) 30 min antes de la sesión de reactivación. Luego de dicha reexposición se administró MDZ (3 mg/kg;i.p) o PROP (10 mg/kg, i.p.) o SAL. Un día (Test 1) y ocho días (Test 2) después, se evaluó la respuesta de miedo durante 10 min. Los grupos experimentales fueron: CON-SAL/SAL (n=8), CON-SAL/MDZ (n=8), CON-DCS/SAL (n=8), CON-DCS/MDZ (n=10), ETOH-SAL/SAL (n=8), ETOH-SAL/MDZ (n=8), ETOH-DCS/SAL (n=9), ETOH-DCS/MDZ (n=10); y CON-SAL/SAL (n=7), CON-SAL/PROP (n=7), CON-DCS/SAL (n=7), CON-DCS/PROP (n=8), ETOH-SAL/SAL (n=8), ETOH-SAL/PROP (n=8), ETOH-DCS/SAL (n=8), ETOH-DCS/PROP (n=9); para los experimentos III.a y III.b, que evalúan la

influencia de DCS sobre el efecto interferente del proceso de reconsolidación de MDZ o PROP, respectivamente. Los esquemas experimentales utilizados en ambos experimentos se muestran en las Fig. 6A y 8A.

Paralelamente, grupos separados de ratas CON y ETOH fueron sometidos al mismo protocolo experimental excepto que no tuvieron reexposición al contexto de condicionamiento, constituyendo entonces los grupos no reactivados. Los grupos experimentales fueron: CON-SAL/SAL (n = 5), CON-SAL/MDZ (n = 5), CON-DCS/SAL (n = 5), CON-DCS/MDZ (n = 5), ETOH-SAL/SAL (n = 5), ETOH-SAL/MDZ (n = 5), ETOH-DCS/SAL (n = 5), ETOH-DCS/MDZ (n = 5); y CON-SAL/SAL (n = 7), CON-SAL/PROP (n = 7), CON-DCS/SAL (n = 6), CON-DCS/PROP (n = 6), ETOH-SAL/SAL (n = 7), ETOH-SAL/PROP (n = 6), ETOH-DCS/SAL (n = 5), ETOH-DCS/PROP (n = 5); para los experimentos III.a y III.b, que evalúan la influencia de DCS sobre el efecto interferente del proceso de reconsolidación de MDZ o PROP respectivamente. Los esquemas experimentales utilizados en ambos experimentos se muestran en las Fig. 7A y 9A.

Para el análisis estadístico, los factores que se consideraron fueron: dieta (CON vs ETOH), droga prereactivación (SAL vs DCS) y droga postreactivación (SAL vs MDZ o PROP).

Resultados

Experimento III.a:

Todas las ratas presentaron niveles de congelamiento similares durante la sesión de reactivación, indicando que el tratamiento farmacológico previo a la reactivación no influencia la expresión de la memoria aversiva (Fig. 6B; $[F(1,61) = 0,04; p = 0,84]$). Como puede observarse en la Fig. 6C, durante el Test 1 los animales del grupo CON muestran niveles de congelamiento reducidos cuando son tratados con MDZ, independientemente

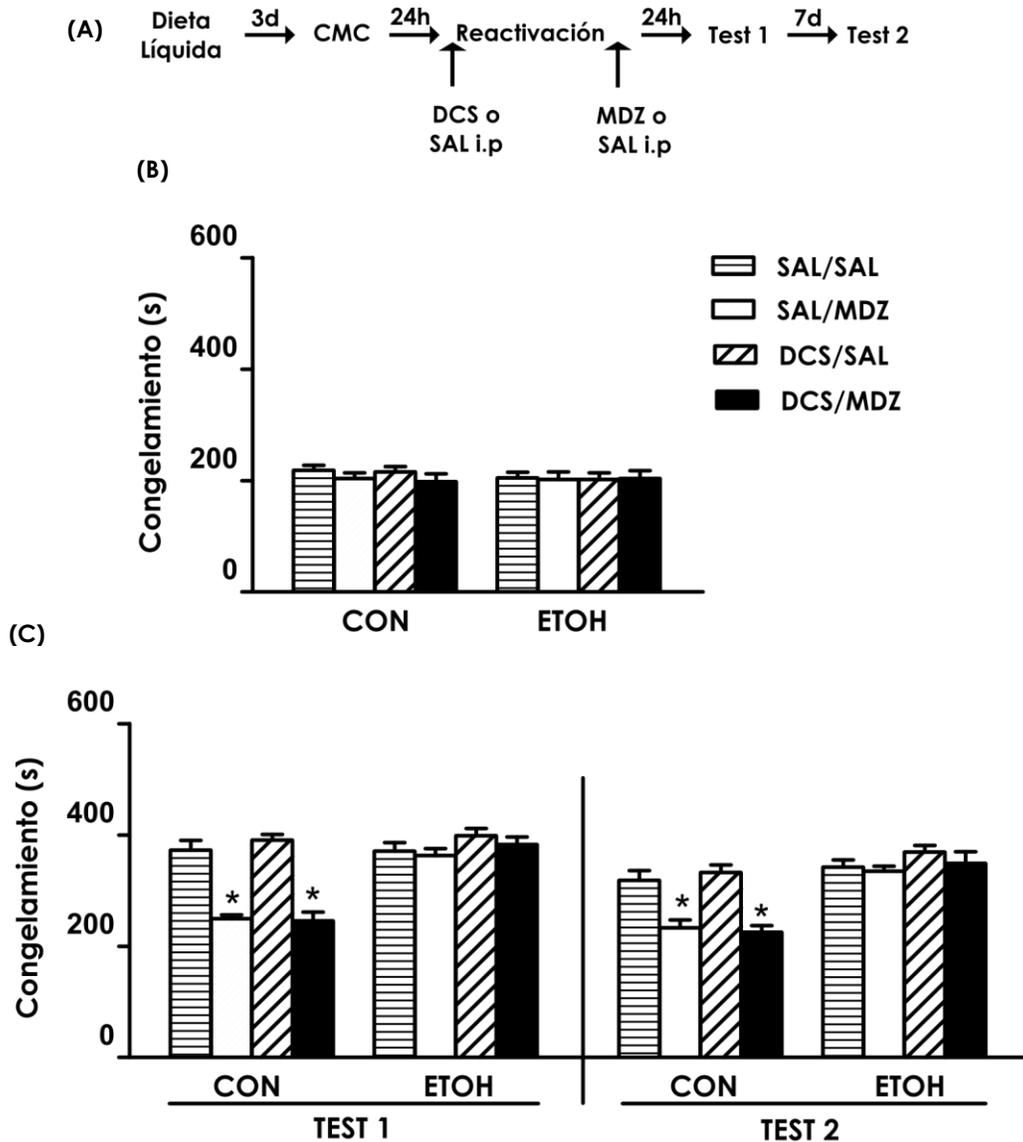


Figura 6. Influencia de DCS preactivación sobre el efecto interferente de MDZ sobre la reconsolidación de una memoria de miedo contextual en animales ETOH. A- Diseño experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la sesión de reactivación. C- Respuesta de congelamiento durante los Tests de retención de la memoria 24h (Test 1) y 8 días (Test 2) después de la administración sistémica MDZ postevocación en ratas inyectadas con SAL o DCS preactivación. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M del tiempo de congelamiento. (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$.

de que hayan recibido SAL o DCS previo a la evocación. Sin embargo, ninguno de los tratamientos fue efectivo para atenuar la respuesta aversiva en animales ETOH.

Dichos efectos se mantuvieron hasta una semana después (Test 2). El ANOVA de tres vías reveló que no hubo una interacción significativa entre los factores dieta x droga prereactivación x droga postreactivación para el Test 1 [$F(1,61) = 0,12$; $p = 0,72$] ni el Test 2 [$F(1,61) = 0,05$; $p = 0,83$]; sin embargo se registró una interacción significativa entre la dieta x droga postreactivación para el Test 1 [$F(1,61) = 40,24$; $p < 0,05$] y el Test 2 [$F(1,61) = 15,47$; $p < 0,05$]. En ambos tests, el análisis post hoc de la interacción significativa indicó que los niveles de congelamiento de los grupos CON que recibieron MDZ fueron significativamente menores comparados con los grupos restantes. Todos los animales no reactivados mostraron una respuesta de miedo similar en el test de retención de la memoria ([$F(1,32) = 0,13$; $p = 0,72$]; Fig. 7B).

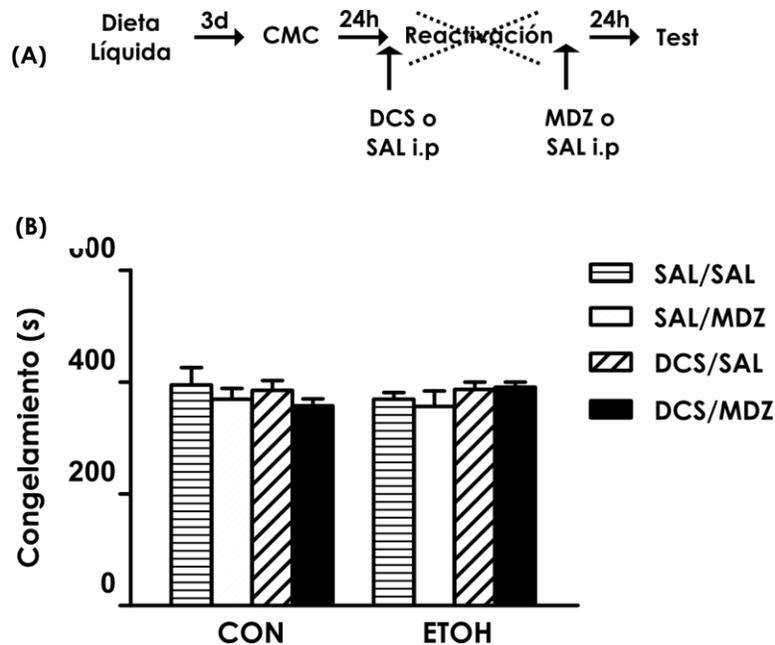


Figura 7. Efecto de MDZ sobre la memoria de miedo en animales no sometidos a la sesión de reactivación: Influencia de DCS. A- Diseño experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la prueba de retención de la memoria. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M del tiempo de congelamiento.

Experimento III.b:

Nuevamente se puede observar que el tratamiento previo a la reactivación no afectó los niveles de congelamiento durante la evocación de la memoria (Fig. 8B; $[F(1,54) = 0,04; p > 0,05]$). Como indica la Fig. 8C, al evaluar la retención de la memoria se encontró que independientemente del pretratamiento (SAL o DCS), todos los animales CON tratados con PROP presentaron una respuesta de miedo atenuada en ambas pruebas. Dentro del grupo ETOH, los animales que recibieron el tratamiento DCS-PROP mostraron una atenuación en la respuesta de congelamiento, cuyos niveles no difieren de aquellos que presentaron las ratas CON tratadas con PROP. Dichos efectos persistieron hasta una semana después (Test 2). El análisis estadístico reveló una interacción significativa entre los factores dieta x droga prereactivación x droga postreactivación para el Test 1 $[F(1,54) = 6,38; p < 0,05]$ y el Test 2 $[F(1,54) = 6,44; p < 0,05]$. En ambos tests, el test de Tukey HSD indicó que los niveles de congelamiento de los grupos DCS-PROP y SAL-PROP de los animales CON y el grupo DCS-PROP de las ratas ETOH no difirieron unos de otros y fueron significativamente menores al resto de los grupos. Todos los grupos no reactivados presentaron una respuesta de miedo similar y elevada en el test de retención de la memoria ($[F(1,41) = 0,02; p = 0,90]$; Fig. 9B).

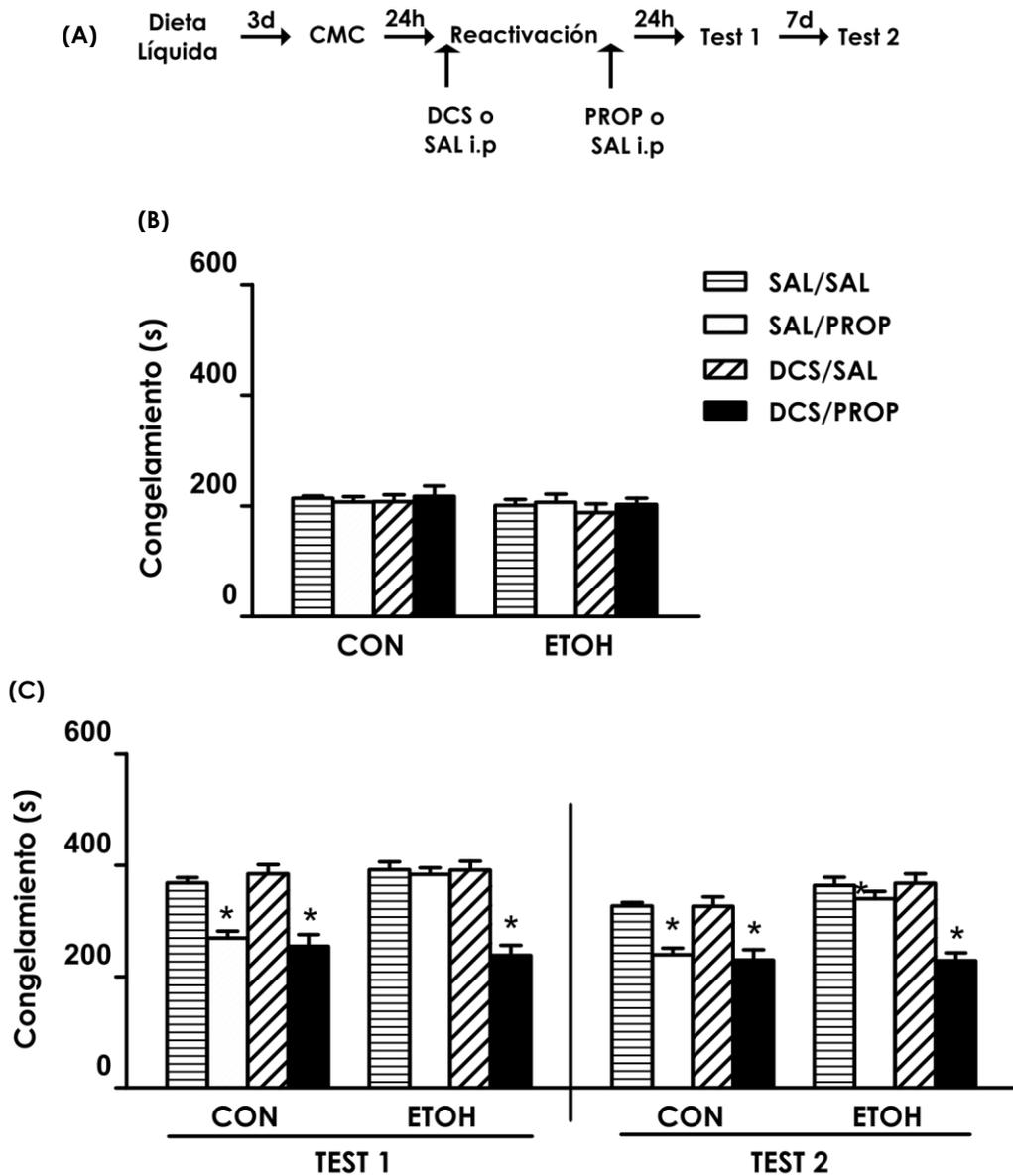


Figura 8. Influencia de DCS preactivación sobre el efecto interferente de PROP sobre la reconsolidación de una memoria de miedo contextual en animales ETOH. A- Diseño experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la sesión de reactivación. C- Respuesta de congelamiento durante los Tests de retención de la memoria 24h (Test 1) y 8 días (Test 2) después de la administración sistémica PROP postevocación en ratas inyectadas con SAL o DCS preactivación. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M del tiempo de congelamiento. (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$.

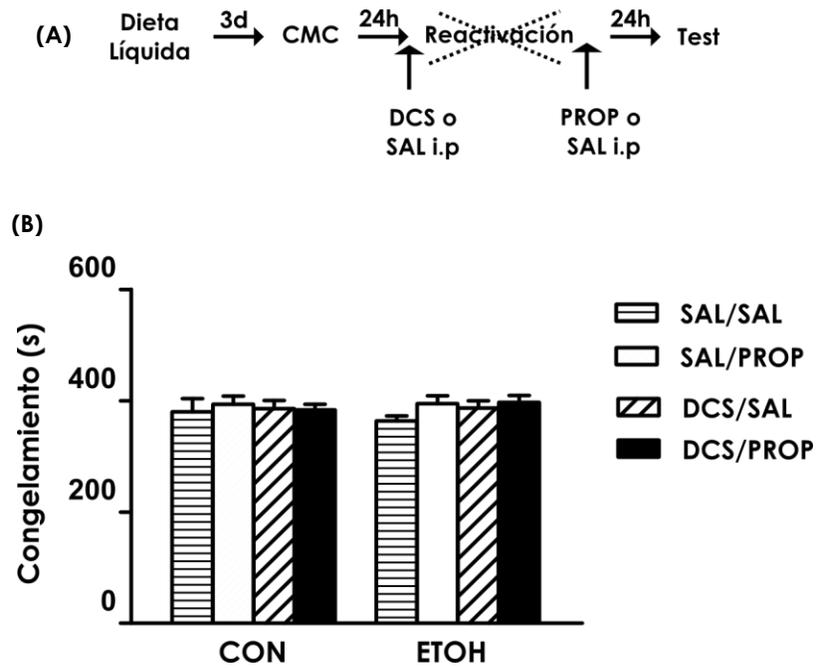


Figura 9. Efecto de PROP sobre la memoria de miedo en animales no sometidos a una sesión de reactivación: Influencia de DCS. A- Diseño experimental. B- Respuesta de congelamiento durante el test de retención de la memoria. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M del tiempo de congelamiento.

En conclusión, PROP logró atenuar la memoria de miedo en animales ETOH pretratados con DCS. Sin embargo, MDZ fue inefectivo para atenuar la memoria en las ratas dependientes al etanol, aun cuando se facilitó el proceso de desestabilización por acción de DCS.

Experimento IV: Influencia de la abstinencia al etanol sobre la expresión de la subunidad $\alpha 1$ de los receptores GABA-A en el ABL.

Fundamento

Las benzodiazepinas, entre ellas el MDZ, son moduladores alostéricos positivos de los R-GABA-A. Éstos son heteropentámeros compuestos por dos subunidades α , dos β y una γ , siendo la combinación $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ la principalmente expresada en la amígdala (McDonald y Mascagni, 2004). Es bien conocido que dichos receptores están involucrados en procesos de aprendizaje y memoria (Makkar y col., 2010), y que aquellos que contienen la subunidad $\alpha 1$ tienen un rol crítico en el aprendizaje de miedo y la plasticidad en la amígdala (Heldt y Ressler, 2007; Wiltgen y col., 2009). Además, se ha demostrado que los efectos amnésicos de las benzodiazepinas en pruebas motivadas aversivamente han sido atribuidos a los R-GABA-A que contienen la subunidad $\alpha 1$ (Mohler y col., 2002). En relación a estos receptores y la adicción al alcohol, se ha reportado una expresión disminuida de la subunidad $\alpha 1$ de los R-GABA-A después de la interrupción de la administración crónica de etanol en áreas límbicas, incluida la amígdala (Papadeas y col., 2001; Floyd y col., 2004; Diaz y col., 2011; Lindemeyer y col., 2014). En base a estas evidencias, se puede proponer que la falta de efecto “amnésico” de MDZ sobre la memoria aversiva en las ratas ETOH está relacionada a cambios en la expresión de dicha subunidad en el ABL, inducidos por el consumo crónico/ abstinencia al etanol utilizado en la presente tesis. Por lo tanto, en este objetivo se evaluó la expresión total y en superficie de la subunidad $\alpha 1$ de los R-GABA-A en el ABL en dichos animales.

Procedimiento

Los animales de los grupos CON y ETOH fueron sacrificados al tercer día de abstinencia para proceder luego al desarrollo de la técnica de “crosslinking” con BS3, y evaluar posteriormente la expresión total y en superficie de la subunidad $\alpha 1$ de los R-GABA-A en el ABL mediante Western Blot (Ver Materiales y Métodos). Los grupos experimentales fueron: CON (n= 8) y ETOH (n= 8). El protocolo experimental se muestra en la Fig. 10A.

Resultados

El análisis de los resultados obtenidos por Western Blot, reveló una disminución de la expresión total [t = 3,93; p < 0,05] y en superficie [t = 2,86; p < 0,05] de la subunidad $\alpha 1$ de los R-GABA-A en el ABL en animales ETOH (Figs. 10B y 10C, respectivamente).

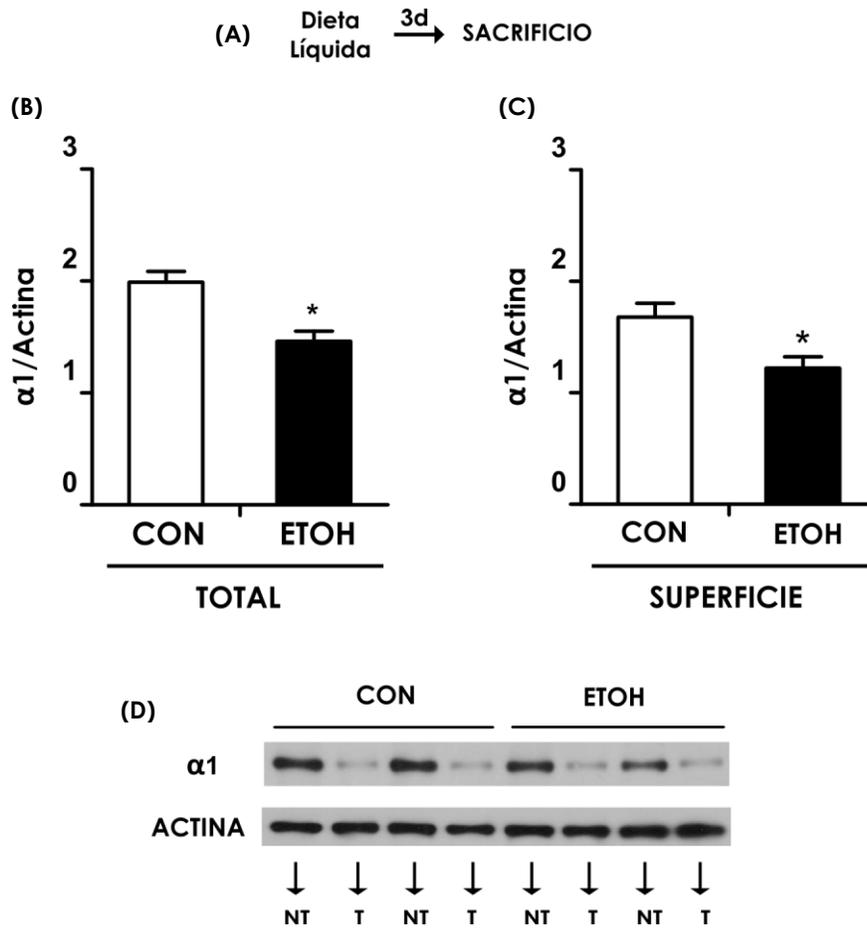


Figura 10. Influencia de la abstinencia al etanol sobre la expresión de la subunidad $\alpha 1$ de los receptores GABA-A en el ABL. A- Diseño experimental. B- Expresión de $\alpha 1$ en muestras de homogeneizado total (referenciada a actina). C- Expresión de $\alpha 1$ en superficie (referenciada a actina). D- Inmunoblots representativos de los niveles de $\alpha 1$ y actina. NT: muestras no tratadas con BS3 (homogeneizado total); T: muestras tratadas con BS3 (banda intracelular). Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M de la relación $\alpha 1$ /actina. (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$.

Dichos resultados confirman nuestra hipótesis que la falta de efecto de MDZ sobre la expresión de la memoria aversiva en animales abstinentes está asociada, al menos en parte, a una disminución en la expresión en superficie de la subunidad $\alpha 1$ de los R-GABA-A en el ABL.

Discusión

Como se esperaba, y replicando resultados previos, la administración sistémica de MDZ o de PROP luego de la sesión de reactivación indujeron una reducción de la respuesta de congelamiento durante las pruebas de retención de la memoria en animales CON. Dicho efecto interferente de MDZ y PROP sobre la memoria de miedo fue dependiente de la sesión de reactivación, debido que no se observó atenuación de la respuesta de congelamiento en las ratas CON de los grupos no reactivados. Dado que la reexposición al contexto de condicionamiento puede inducir también la generación de una memoria de extinción, la reducción de la respuesta de miedo observada podría deberse al bloqueo de la reconsolidación o la facilitación del proceso de extinción. Sin embargo, esta última posibilidad parece poco probable. En este sentido, la atenuación en los niveles de congelamiento se mantuvo durante el segundo test realizado 1 semana más tarde; lo que indica la ausencia de la recuperación de miedo, característico del proceso de extinción. Además, es bien conocido que la activación de los R-GABA-A interfiere con la adquisición y consolidación de la memoria de extinción; por lo que se esperaría que MDZ afecte más que facilite la extinción (Makkar y col., 2010). En cuanto al PROP, se ha demostrado que no facilita la memoria de extinción (Caín y col., 2004; Rodríguez- Romaguera y col., 2009). En conjunto, nuestros resultados han replicado hallazgos anteriores que muestran que la administración de MDZ o PROP después de la reactivación resulta en la interrupción del proceso de reconsolidación de una memoria de miedo contextual en ratas CON (Debiec y LeDoux, 2004; Bustos y col., 2006; Zhang y Cranney, 2008; Muravieva y col., 2010). En contraste con los efectos observados en las ratas CON, ni MDZ ni PROP luego de la reactivación lograron atenuar la respuesta de congelamiento en ratas ETOH. Esta falta de efecto “amnésico” no puede ser atribuida al uso de bajas dosis de los fármacos, debido que MDZ (3 mg/kg) y PROP (10 mg/kg) fueron reportadas como las dosis más altas necesarias para bloquear el proceso de reconsolidación (Debiec y LeDoux, 2004; Bustos y col., 2010; Muravieva y col., 2010). En conclusión, nuestros resultados sugieren que la

dependencia al etanol favorece a la generación de una memoria de miedo que es menos vulnerable a la interrupción después del recuerdo, por lo tanto, resistente al proceso de desestabilización de la memoria luego de su evocación.

Otros estudios han observado que un aumento del número de descargas eléctricas durante el condicionamiento o una experiencia estresante previa a la adquisición del miedo condicionado, inducen memorias robustas que son resistentes a la interferencia después del recuerdo (Suzuki y col., 2004; Wang y col., 2009; Bustos y col., 2010). Como ya mencionamos previamente, la abstinencia al alcohol facilita la formación de una memoria de miedo contextual robusta y resistente a la extinción (Bertotto y col., 2006). En esta línea, se ha informado que la interrupción de la administración intermitente de etanol también induce alteraciones en el proceso de extinción de una memoria de miedo auditiva (Holmes y col., 2012). El hecho que una memoria aversiva formada durante la abstinencia al etanol sea resistente tanto a la extinción como al bloqueo farmacológico después de su evocación, nos permite concluir firmemente que la abstinencia al etanol, de manera similar a lo generado por un evento estresante previo al entrenamiento de miedo, induce la formación de una memoria aversiva “maladaptativa”.

Como indicamos anteriormente, el inicio de la fase de labilización de la memoria inducida por el recuerdo, es dependiente de la activación de los R-NMDA (Ben Mamou y col., 2006). En esta línea, nuestros hallazgos revelaron que la activación de dichos receptores por la administración de DCS previa a la reactivación, revierte la resistencia al efecto interferente de PROP postevocación sobre una memoria aversiva en animales ETOH. Dicho supuesto se basa en los siguientes resultados: (1) PROP interfirió la memoria en los animales ETOH que recibieron DCS previa a la evocación pero no en los que fueron inyectados con SAL; (2) el tratamiento DCS/PROP fue ineficaz en ausencia de la sesión de reactivación, lo que indica que tal interferencia depende selectivamente de la reactivación

de la memoria; (3) las ratas ETOH tratadas con DCS/PROP muestran niveles de congelamiento similares a las exhibidos por las ratas CON tratadas con PROP; y (4) DCS fue ineficaz en ratas CON porque los grupos SAL/PROP y DCS/PROP mostraron respuesta de miedo similar durante ambos tests de retención de la memoria. En concordancia con resultados anteriores (Lee y col., 2006; Bustos y col., 2010), la administración de DCS previa a la sesión de reactivación no afectó los niveles de congelamiento, ya que todas las ratas mostraron niveles de respuesta de miedo similares durante dicha reexposición. Aunque otras evidencias indicaron que la DCS facilita la formación de la memoria de extinción (Walker y col., 2002; Bertotto y col., 2006), esto no ocurrió bajo nuestras condiciones experimentales, porque el grupo DCS/SAL de las ratas CON exhibió niveles altos de congelamiento durante los Test 1 y Test 2.

En concordancia con nuestros hallazgos, otros autores han sugerido que la administración de DCS antes de la reactivación facilita la ocurrencia del proceso de labilización de una memoria de miedo resistente, tal como la generada por un evento estresante o por una inyección de yohimbina precondicionamiento (Bustos y col., 2010; Gazarini y col., 2014). En conjunto, estos resultados y nuestros hallazgos refuerzan la noción de que la activación de los R-NMDA es necesaria para la ocurrencia de la fase de labilización de una memoria de miedo. Además, sugieren que la DCS posee la capacidad de actuar como agente facilitador de la desestabilización de la traza luego de la evocación de una memoria de miedo resistente inducida por diversas condiciones.

Es ampliamente conocido que la dependencia al etanol induce cambios neuroadaptativos en la expresión de los R-NMDA en áreas cerebrales relevantes para el aprendizaje de miedo, tales como la amígdala (Krystal y col., 2003; McCool y col., 2010). Por lo tanto, se podría especular que la resistencia a la labilización de una memoria traumática observada en las ratas ETOH, esté asociada con una alteración en la expresión y/o función de los R-NMDA inducidos por dependencia al etanol.

Hasta el momento se desconoce el mecanismo por el cual la DCS promueve a la desestabilización de una memoria aversiva luego de su evocación. Mao y col. (2008) reportaron que la facilitación del proceso de extinción de una memoria de miedo inducida por DCS es impedida por la infusión de un inhibidor del proteosoma en la amígdala, lo que sugiere que el efecto DCS está mediado por la activación del sistema de ubiquitina-proteosoma (SUP). Por otra parte, se ha reportado que la degradación proteica en el hipocampo y la amígdala regula la desestabilización de una memoria de miedo después de la reactivación (Lee y col., 2008; Jarome y col., 2011). En tales investigaciones, el inhibidor del proteosoma aplicado luego de la reactivación en la región CA1 del hipocampo y en la amígdala bloquea el efecto amnésico de anisomicina sobre la reconsolidación. Jarome y col. (2011) demostraron que el ifenprodil (antagonista selectivo de los R-NMDA(GluN2B)) postevocación reduce la cantidad de proteínas poliubiquitinadas en la amígdala, lo que sugiere que el aumento de la degradación proteica involucrado en la labilización de la memoria depende de la activación de los R-NMDA. Por lo tanto, el rol facilitador de DCS para promover la desestabilización de memorias resistentes luego del recuerdo parecería estar dado por un efecto inductor sobre la actividad del SUP. Estas observaciones abren el camino a futuros experimentos tendientes a elucidar este tema.

Se ha demostrado que los β -bloqueantes, como el PROP, atenúan algunos síntomas del síndrome de abstinencia y previenen el aumento de la autoadministración de alcohol en animales dependientes (Koob, 2008; Gilpin y Koob, 2010). Además, una hiperactividad noradrenérgica en el sistema nervioso central ha sido observada durante la abstinencia al etanol (Koob, 2008; Becker, 2012). Aunque la interrupción al consumo crónico de etanol genera un aumento en la densidad de los R- β A en todo el cerebro (Banerjee y col., 1978; Kuriyama y col., 1981) y una “*up-regulation*” de la expresión génica cortical de los R- β ₂A (Rimondini y col., 2002), hasta el momento no se ha reportado la influencia de la abstinencia al alcohol sobre la función y la expresión de estos receptores en el ABL. Independientemente de los posibles cambios inducidos por la interrupción del consumo

de etanol sobre la expresión de los R- β A, la desestabilización de la memoria facilitada por DCS representa un requisito fundamental para que PROP interfiera con el proceso de reconsolidación en ratas ETOH. Aunque no puede ser totalmente descartada una posible interacción entre los R-NMDA y los R- β A durante el proceso de labilización-reconsolidación de la memoria, el esclarecimiento de esta posibilidad requeriría el desarrollo de experimentos que escapan al objetivo de esta tesis.

En el presente trabajo se ha encontrado que la administración sistémica de MDZ no afectó a la memoria de miedo en los animales ETOH, aun cuando se facilitó el proceso de desestabilización de la memoria por la administración de DCS previa a la reactivación. Por otro lado, Bustos y col. (2010) demostraron que el deterioro de una memoria de miedo inducido por MDZ en ratas estresadas se hizo evidente con la administración de DCS previa a la reactivación. Por lo tanto, aunque la exposición al estrés y la interrupción de un tratamiento crónico de etanol facilitan la formación de memorias de miedo resistentes al bloqueo farmacológico después de la evocación, los resultados sugieren que los mecanismos involucrados en dicha resistencia a la interferencia postevocación serían diferentes. En este punto, la pregunta que surgió fue: ¿Por qué MDZ no afectó la reconsolidación de la memoria en los animales ETOH?. Considerando que los efectos sedativos y “amnésicos” de las benzodiazepinas han sido atribuidos a los R-GABA-A que contienen la subunidad α 1 (Mohler y col., 2002), y que el ABL es una estructura involucrada en la reconsolidación de una memoria aversiva, se evaluó la expresión de la subunidad α 1 en el ABL en ratas ETOH. Nuestros resultados sugieren que la falta de efecto “amnésico” de MDZ puede deberse a una reducción en la expresión total y en superficie celular de la subunidad α 1 de R-GABA-A en el ABL inducida por la abstinencia al etanol. Estos hallazgos coinciden con lo establecido en estudios previos, en los cuales se han utilizado diferentes protocolos para inducir dependencia al etanol. En ellos, se ha observado una disminución de dicha subunidad en la amígdala, la cual se evidencia desde las primeras horas luego de la interrupción de la administración de etanol hasta el día 40

de abstinencia (Papadeas y col., 2001; Floyd y col., 2004; Diaz y col., 2011; Lendemeyer y col., 2014). En concordancia con nuestro supuesto, se ha reportado además que la dependencia al etanol puede inducir cambios neuroadaptativos en la expresión de los R-GABA-A asociados con alteraciones en las respuestas farmacológicas a agonistas y agonistas inversos (Papadeas y col., 2001; Cagetti y col., 2003; Diaz y col., 2011). Por otra parte, dicha alteración en la expresión proteica de $\alpha 1$ podría estar asociada a la facilitación para generar memorias de miedo durante la abstinencia a etanol. Esta idea se desprende de resultados previos de nuestro laboratorio que demostraron una reducción del control inhibitorio mediado por la transmisión GABAérgica sobre las neuronas de proyección del ABL en animales dependientes al etanol, sugiriendo que ello conduce a una hiperexcitabilidad neuronal y a un aumento de la plasticidad, lo que facilitaría el aprendizaje del miedo (Isoardi y col., 2007).

En conclusión, nuestros resultados revelan que: (1) la abstinencia al etanol indujo la formación de una memoria de miedo que es resistente a la desestabilización después de su evocación; (2) la administración de DCS antes de la reactivación promovió el efecto interferente de PROP, pero no de MDZ, sobre la reconsolidación la memoria de miedo en ratas ETOH; y (3) la falta de efecto de MDZ sobre la reconsolidación de la memoria aversiva en ratas ETOH estaría asociado, al menos en parte, a una atenuación en la expresión de la subunidad $\alpha 1$ de R-GABA-A en el ABL, inducida por el tratamiento crónico/abstinencia al etanol.

Objetivo IB: “Efecto de un estímulo positivo sobre la reconsolidación de una memoria de miedo en animales abstinentes al etanol”

Fundamento

Con el propósito de generar esquemas terapéuticos de potencial aplicación en humanos con los mínimos efectos adversos, distintos laboratorios han utilizado diseños experimentales que no involucran el uso de fármacos como agentes interferentes del proceso de reconsolidación. Algunas estrategias ampliamente utilizadas consisten en realizar entrenamientos de extinción durante la ventana temporal de la reconsolidación o bien reexponer al animal al contexto de condicionamiento en presencia de un distractor (Monfils y col., 2009; Quirk y col., 2010; Schiller y col., 2010; Crestani y col., 2015). Cabe notar que, con el fin de reducir el impacto de memorias aversivas, otros autores han indicado que la valencia emocional de una memoria de miedo puede ser modificada mediante la presentación de un estímulo apetitivo (Richardson y col., 1982; Haubrich y col., 2015; Ferrer-Monti y col., 2016). Considerando entonces la importancia de atenuar memorias de miedo en el contexto del alcoholismo, y que el uso de agentes no farmacológicos como interferentes de la reconsolidación representaría una alternativa más segura respecto a las intervenciones farmacológicas; se examinó el efecto de un estímulo reforzante positivo sobre la reconsolidación de una memoria de miedo en animales dependientes al etanol. El estímulo reforzante positivo utilizado en esta tesis fue cerveza sin alcohol (CSA), basándonos en hallazgos que indicaron que las ratas son capaces de ingerir grandes volúmenes de CSA y además, muestran gran preferencia por esta bebida respecto al agua en un paradigma de libre elección (Cox y Mertz, 1985). Dichos autores sugirieron a la CSA como un reforzador positivo poderoso para las ratas y algunos estudios han corroborado este supuesto (Samson y col., 1996; Gallate y col., 2003, Orrú y col., 2007).

Experimento V: Efecto de un estímulo reforzante positivo sobre la reconsolidación de una memoria de miedo contextual.

Evidencias de la literatura han demostrado que la presentación de chocolate durante la sesión de reactivación de la memoria, el consumo de maltosa en un paradigma de contracondicionamiento o la ingesta de sucrosa postreactivación, atenuan la expresión de memorias de miedo en ratas (Richardson y col., 1982; Haubrich y col., 2015; Ferrer-Monti y col., 2016). Sin embargo, hasta el momento no se ha investigado el efecto del consumo de CSA después de la evocación de la memoria aversiva. Por lo tanto, en primera instancia se examinó si el consumo de CSA después de la reactivación de la memoria de miedo, es efectivo en interferir el proceso de reconsolidación en animales del grupo control.

Procedimiento

Los animales fueron tratados con dieta líquida control y recibieron el entrenamiento de miedo como se detalló en Materiales y Métodos. Veinticuatro horas después del condicionamiento aversivo comenzó la fase de habituación al consumo de CSA o agua, la cual se desarrolló en tres días consecutivos como se describió previamente. Un día después de finalizada dicha fase, las ratas fueron sometidas a una sesión de reactivación de la memoria de 5 min. Quince minutos después, a un grupo de ratas se les presentó CSA y a otro grupo agua (grupos CSA-15 min y Agua-15 min, respectivamente). Como se mencionó previamente, el proceso de reconsolidación de una memoria tiene lugar en una ventana temporal acotada, período en cual los agentes interferentes de dicho proceso de la memoria pueden actuar. Estudios preclínicos definieron dicha ventana de vulnerabilidad hasta 6 horas (aproximadamente) después de la presentación del recordatorio (Tronson y Taylor, 2007). Por lo tanto, a fin de corroborar que el potencial efecto de CSA afecta dicho proceso mnésico, un tercer grupo de animales tuvo acceso a la ingesta de CSA 7 h luego de la reactivación (grupo CSA-7h). Un día (Test 1) y ocho días

(Test 2) después, se evaluó la respuesta de miedo durante 10 min. Los grupos experimentales fueron: CSA-15 min (n=7), Agua (n=6) y CSA-7 h (n=7). En la Fig. 11A se muestra el procedimiento experimental.

Resultados

Como ilustra la Fig. 11B, y en concordancia con los experimentos anteriores, todos los animales muestran niveles equivalentes de congelamiento durante la reactivación ([F(1,17) = 2,44; p = 0,12]). La Fig. 11C muestra una reducción significativa de la respuesta condicionada únicamente en el grupo CSA-15 min, efecto que persistió hasta una semana después. El ANOVA de una vía indicó un efecto significativo del tipo de fluido (CSA vs Agua) para el Test 1 ([F(1,17) = 27,46; p < 0,05]) y para el Test 2 ([F(1,17) = 27,44; p < 0,05]). Para ambos tests, el análisis *post hoc* reveló que el grupo CSA-15 min exhibe significativamente menos congelamiento en comparación con los grupos restantes. Respecto al consumo de CSA y agua posterior a la reactivación de la memoria (Tabla I), se puede observar que las ratas tomaron menos agua que CSA, pero que los grupos CSA-15min y CSA-7h ingirieron niveles similares de la bebida ([F(1,17) = 20,78; p < 0,05]).

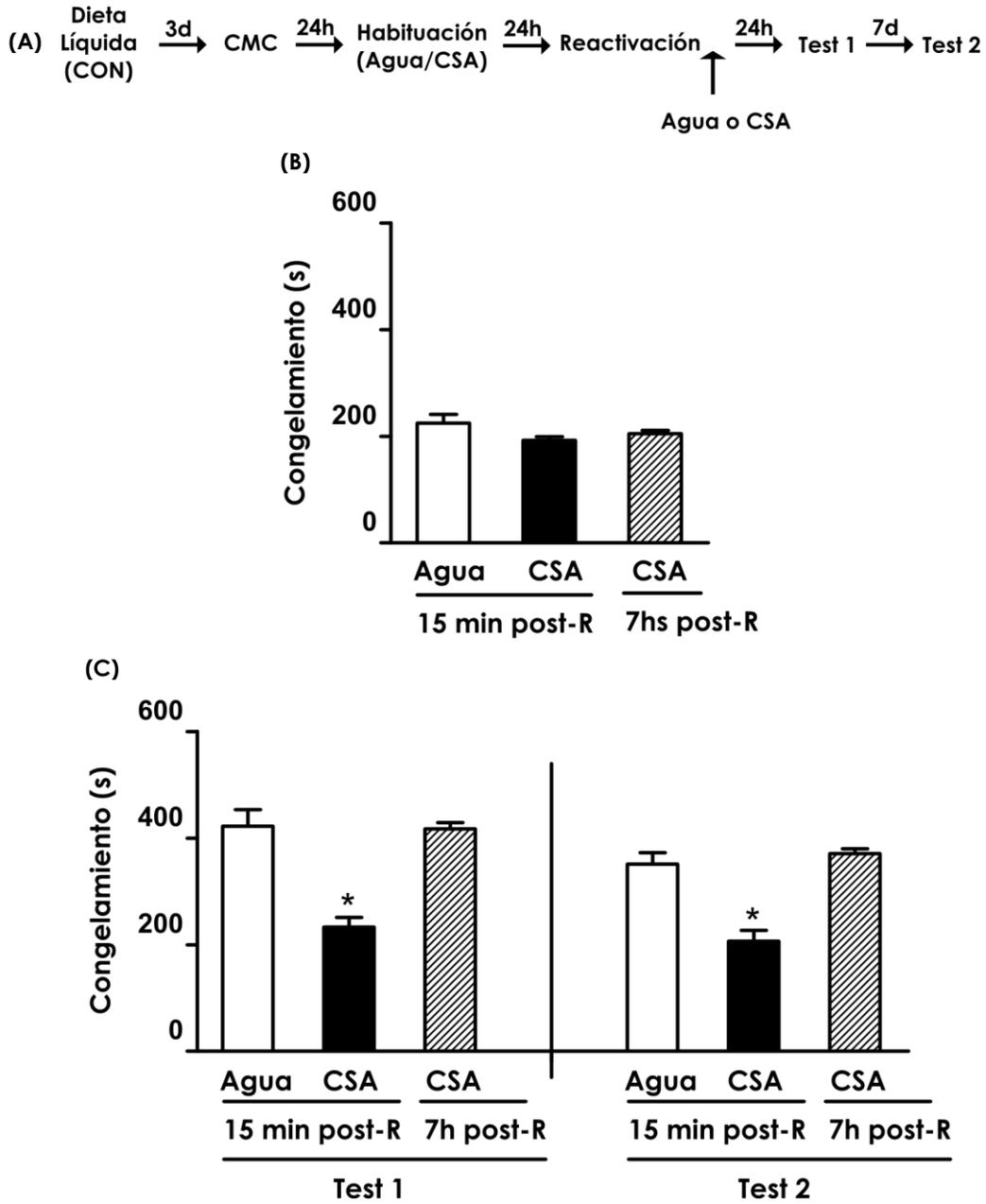


Figura 11. Efecto del consumo de CSA después de la evocación sobre la reconsolidación de una memoria de miedo contextual en animales CON. A- Esquema experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la sesión de reactivación de 5 min de duración. C- Respuesta de congelamiento durante los tests de retención de la memoria. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M del tiempo de congelamiento. (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$. Post-R: posterior a la reactivación.

Grupo	Consumo (ml/kg)
Agua-15 min	*8,2 ± 1,5
CSA-15 min	34,5 ± 4,0
CSA-7 h	36,4 ± 3,6

Tabla I. Consumo de agua y CSA postreactivación en animales CON durante el experimento V. Los datos se muestran como la media ± E.E.M del consumo de agua o CSA. (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$.

A partir de dichos resultados se puede concluir que el consumo de CSA a tiempos cortos después de la reactivación induce una disminución en la respuesta de miedo en las ratas controles.

Dado que se definió la capacidad de CSA para actuar como agente interferente de una traza mnésica aversiva, procedimos a evaluar su efecto sobre la reconsolidación de la memoria de miedo en ratas abstinentes al etanol.

Experimento VI: Efecto de un estímulo positivo sobre el proceso de reconsolidación de una memoria de miedo contextual en animales abstinentes al etanol.

Teniendo en cuenta que la memoria de miedo en animales ETOH, bajo las condiciones de entrenamiento y reactivación utilizadas en este trabajo, resulta resistente a la interferencia farmacológica después de la reactivación, se podría esperar una resistencia similar al efecto interferente por el estímulo apetitivo en estos animales. Sin embargo, como demostramos previamente, esta memoria puede llegar a ser vulnerable a la interferencia por la activación de los R-NMDA preevocación. Por lo tanto, a fin de minimizar el número de animales a utilizar, se evaluó el efecto de CSA sobre la reconsolidación de una memoria de miedo contextual en ratas ETOH pretratadas o no con DCS.

Procedimiento

Al tercer día de abstinencia, los animales de los grupos CON y ETOH fueron sometidos al condicionamiento de miedo, y en los días siguientes se les presentó CSA durante la fase de habituación, como se describe en Materiales y Métodos. Un día después de la finalización de la fase de habituación, las ratas recibieron DCS (5 mg/kg, i.p.) o SAL 30 min antes de la sesión de reactivación. Quince minutos después de la misma, se ofreció a todos los animales CSA durante 2 horas. La respuesta de congelamiento se evaluó 24 h (Test1) y 8 días (Test 2) después. En forma paralela, animales CON y ETOH fueron sujetos al mismo protocolo experimental, con la excepción de que no fueron reexpuestos al contexto de condicionamiento luego de la administración de DCS o SAL. Estos grupos de ratas no reactivadas representan un control para asegurar que los potenciales cambios sean dependientes de la evocación de la memoria. Los grupos experimentales fueron: CON-SAL/CSA (n=10), CON-DCS/CSA (n=12), ETOH-SAL/CSA (n=8), ETOH-DCS/CSA (n=12) para los grupos reactivados; y CON-SAL/CSA(n=9), CON-DCS/CSA (n=9), ETOH-SAL/CSA (n=9),

ETOH-DCS/CSA (n=9) para los grupos no reactivados. Para el análisis estadístico, los factores que se consideraron fueron: dieta (CON vs ETOH), droga prereactivación (SAL vs DCS) y reactivación (reactivados vs no reactivados). El diseño experimental de este objetivo se muestra en la Fig. 12A.

Resultados

Como se puede observar en la Figura 12B, todas las ratas reactivadas mostraron niveles similares de congelamiento durante la sesión de reactivación de 5 min. La Fig. 12C muestra que el consumo de CSA postreactivación atenuó la respuesta de miedo en animales ETOH pretratados con DCS. En ella también puede observarse que independientemente del tratamiento realizado antes de la sesión de reactivación, los animales CON mostraron una reducción de los niveles de respuesta de miedo. Además, las ratas del grupo ETOH reactivado tratado con SAL mostraron niveles de congelamiento elevados, los cuales no difieren de los exhibidos por todos los grupos no reactivados. Todos estos efectos se mantuvieron una semana después. El ANOVA de tres vías mostró una interacción significativa entre la dieta x droga x reactivación para el Test 1 ([F (1,70) = 29.14; p <0,05]) y el Test 2 ([F (1,70) = 21,23; p <0,05]). La prueba *post hoc* confirmó que los niveles de congelamiento de los grupos reactivados CON-DCS/CSA, CON-SAL/CSA y ETOH-DCS/CSA no difirieron uno de otros y fueron significativamente más bajos que los exhibidos por los grupos restantes. Por último, como se muestra en la Tabla II, no se detectaron diferencias significativas en el consumo de CSA entre los grupos.

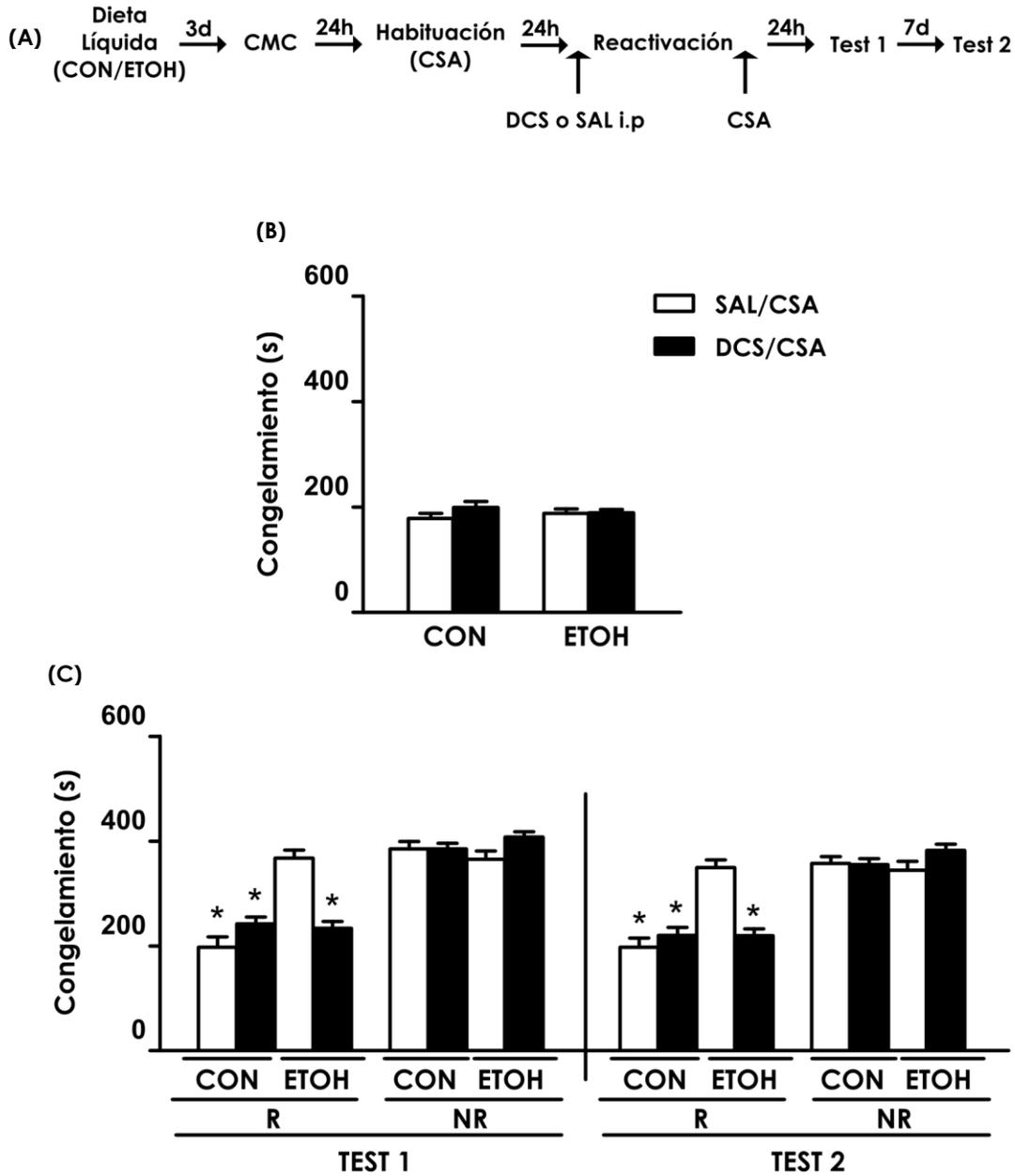


Figura 12. Efecto del consumo de CSA sobre la reconsolidación de una memoria de miedo contextual en animales ETOH: Influencia de DCS. A- Esquema experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la sesión de reactivación de 5 min de duración. C- Respuesta de congelamiento durante los tests de retención de la memoria en grupos de ratas sometidas a una sesión de reactivación (R) y no sometidas a la misma (NR). Los datos se muestran como la media ± E.E.M del tiempo de congelamiento. (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$.

Grupo	Cerveza (ml/kg)
CON-R-SAL	29,7 ± 2,9
ETOH-R-SAL	29,2 ± 2,1
CON-NR-SAL	27,8 ± 2,2
ETOH-NR-SAL	25,8 ± 2,9
CON-R-DCS	28,7 ± 2,9
ETOH-R-DCS	26,7 ± 2,0
CON-NR-DCS	25,4 ± 3,4
ETOH-NR-DCS	26,5 ± 1,3

Tabla II. Consumo de CSA postreactivación y en animales no sometidos a la sesión de reactivación: Experimento VI. Los datos se muestran como la media ± E.E.M del consumo de CSA (ml/kg).

En conjunto, estos resultados sugieren que la administración de DCS previa a la reactivación facilita el efecto interferente del estímulo positivo (CSA) sobre la reconsolidación de una memoria de miedo contextual en animales ETOH.

Discusión

Los presentes resultados revelaron una atenuación de la memoria de miedo únicamente en los animales CON que tuvieron acceso a la CSA 15 minutos después de la sesión de reactivación, pero no para aquellos que se les presentó agua, o aquellos que recibieron CSA 7h luego de la evocación. Teniendo en cuenta además, que el consumo de CSA después de la evocación fue similar entre los grupos CSA-15 min y CSA-7h, se puede inferir que el consumo de CSA fuera de la ventana de reconsolidación no afectó la memoria de miedo (Fig. 11C, grupo CSA-7h; Tronson y Taylor, 2007). Por otro lado, el hecho de que la reducción de los niveles de congelamiento en el grupo CSA-15min persistió 8 días después de la sesión de reactivación (Test 2), da indicios de la ausencia de recuperación del miedo; sugiriendo que este tratamiento no facilita la extinción de la memoria. El alto consumo de CSA en comparación con el del agua se puede atribuir a su sabor agradable y alta palatabilidad, porque los animales no fueron sometidos a privación de agua en ningún momento. Por último, el efecto interferente de CSA fue dependiente de la reactivación de la memoria, ya que el grupo reactivado CON-SAL/CSA mostró una respuesta de miedo disminuida en comparación con su respectivo grupo no reactivado, a pesar de que presentaron niveles similares de consumo (Experimento VI). En resumen, estos resultados sugieren que la reconsolidación de una memoria de miedo puede ser interferida por el consumo de un agente de reforzante positivo (CSA) después de una sesión de reactivación.

Haubrich y col. (2015) han informado que la presentación de un estímulo apetitivo (chocolate) durante la reactivación de una memoria de miedo contextual puede modificar la valencia emocional de la misma por la incorporación de información positiva a través del proceso de reconsolidación. Un resultado similar fue hallado en un paradigma de contracondicionamiento donde se usó maltosa como un estímulo reforzante (Richardson y col., 1982). En este sentido, un estudio reciente ha determinado que el consumo de

sucrosa postevocación interfiere la reconsolidación de una memoria de miedo contextual (Ferrer-Monti y col., 2016). A pesar de las diferencias en cuanto al tipo de estímulo positivo utilizado o el momento en que se presenta el mismo (durante o después de la reactivación), nuestros resultados refuerzan la hipótesis de que un estímulo apetitivo en combinación con la reactivación de la memoria puede ser eficaz para reducir una memoria aversiva. Sin embargo, este efecto atenuante de la memoria inducido por el consumo de CSA no se observó en las ratas ETOH pretratadas con SAL, a pesar que estos animales mostraron una ingesta de CSA similar a la de los grupos restantes (Fig. 12C; Tabla II). Por lo tanto, este hallazgo fortalece la conclusión arribada en el Objetivo IA, la cual indica que la interrupción al consumo crónico de etanol facilita la formación de una memoria miedo resistente a la desestabilización inducida por el recuerdo.

Los presentes hallazgos demuestran que en los animales dependientes al etanol, la administración de DCS previa a la evocación indujo la fase de labilización de la traza, restableciendo la vulnerabilidad al efecto interferente de CSA sobre la reconsolidación de dicha memoria aversiva. Esta conclusión es respaldada por los siguientes resultados: (1) la CSA fue capaz de atenuar la respuesta de miedo en los animales ETOH que recibieron DCS prereactivación pero no en los que recibieron SAL; (2) en los grupos reactivados, las ratas ETOH tratadas con DCS muestran niveles de congelamiento similares a los exhibidos por las ratas CON tratadas o no con DCS; (3) el tratamiento DCS/CSA fue ineficaz en ausencia de la sesión de reactivación, lo que indica que tal interferencia depende selectivamente de la reactivación de la memoria y (4) la DCS fue ineficaz en ratas CON, porque los grupos reactivados SAL/CSA y DCS/CSA exhibieron niveles de respuesta de miedo similares durante el Test 1 y el Test 2. Nuevamente, la administración DCS antes de la sesión de reactivación no influyó en la expresión de la memoria, ya que todas las ratas mostraron niveles comparables de congelamiento durante este período. En conclusión, la DCS es potencialmente capaz de inducir el proceso de desestabilización de una memoria de miedo resistente, facilitando de este modo el efecto interferente de agentes tanto

farmacológicos como no farmacológicos sobre el proceso de reconsolidación. Además, las ratas tratadas o no con DCS no mostraron diferencias significativas en la ingesta de la CSA, lo que indica que el consumo de la misma no se modifica por esta droga. Por otra parte, todos los grupos reactivados y no reactivados mostraron niveles similares de consumo de CSA, lo que sugiere que la evocación de la memoria de miedo no afectó la ingesta de la bebida.

Dado que la dopamina está involucrada en procesos de aprendizaje y memoria (Abraham y col., 2014), y que la CSA presenta propiedades reforzantes para las ratas, podemos sugerir tentativamente que la capacidad interferente de este estímulo está mediada por la liberación de dopamina en los circuitos cerebrales implicados en la reconsolidación de la memoria aversiva, como por ejemplo el ABL. En relación con esto, Rosenkranz y Grace (1999) han demostrado que la liberación de dopamina en el ABL atenúa la activación de las neuronas de proyección amigdalinas, lo que podría estar involucrado en el “déficit” de memoria de miedo observado. Experimentos futuros podrían explorar esta posibilidad.

En conjunto, estos hallazgos: 1) confirman que un estímulo reforzante positivo puede actuar como un agente interferente del proceso de reconsolidación de la memoria de miedo; 2) fortalecen nuestra hipótesis de que la abstinencia al etanol induce la formación de una memoria miedo resistente a la labilización luego de su reactivación, y 3) indican que la combinación “DCS/reactivación de la memoria/estímulo apetitivo” puede ser considerada como una alternativa efectiva para atenuar las memorias de miedo robustas como aquellas formadas durante la abstinencia al alcohol.

Capítulo II

Participación del complejo basolateral de la amígdala en la reconsolidación de una memoria de miedo en animales abstinentes al etanol: efecto de Midazolam y de Propranolol.

Fundamento

El complejo ABL es una estructura esencial en el procesamiento y en el almacenamiento de la información emocional (LeDoux, 2000; Maren, 2005) y, como se indicó en la introducción, es extensa la evidencia que indica su participación en la reconsolidación de memorias de miedo. En consecuencia, se procedió a investigar el rol de dicha estructura cerebral en la reconsolidación de una memoria aversiva en animales dependientes al etanol. Para ello, al igual que los experimentos anteriores, utilizamos PROP y MDZ como agentes interferentes de la reconsolidación, pero esta vez examinamos su efecto intra-ABL.

Experimento VII: Efecto de PROP intra-ABL sobre la reconsolidación de una memoria de miedo contextual en animales abstinentes al etanol.

Procedimiento

Las ratas de los grupos CON y ETOH fueron canuladas bilateralmente en el ABL el segundo día de abstinencia; y luego de 5 días de recuperación, fueron sometidas al entrenamiento de miedo. Un día después, recibieron una inyección de DCS (5mg/kg; i.p) o SAL 30 min antes de la sesión de reactivación; y PROP (1,25 ug/lado) o SAL fue infundido intra-ABL al terminar dicha sesión. La retención de la memoria fue evaluada 24 h y 8 días post-reactivación (Tests 1 y 2). Los grupos experimentales fueron: CON-SAL/SAL (n=7), CON-SAL/PROP (n=6), CON-DCS/SAL (n=7), CON-DCS/PROP (n=7), ETOH-SAL/SAL (n=7), ETOH-SAL/PROP (n=6), ETOH-DCS/SAL (n=6), ETOH-DCS/PROP (n=7). El protocolo experimental se muestra en la Fig. 13A.

Como en todos los experimentos, grupos separados de ratas CON y ETOH fueron sometidos al mismo diseño experimental, pero no fueron sujetos a la reactivación de la memoria (grupos no reactivados). Los grupos experimentales fueron: CON-SAL/SAL (n=5), CON-SAL/PROP (n=5), CON-DCS/SAL (n=5), CON-DCS/PROP (n=5), ETOH-SAL/SAL (n=6), ETOH-SAL/PROP (n=5), ETOH-DCS/SAL (n=5), ETOH –DCS/PROP (n=5). Para el análisis estadístico, los factores que se consideraron fueron: dieta (CON vs ETOH), droga prereactivación (SAL vs DCS) y droga postreactivación (SAL vs PROP). El esquema del diseño experimental usado se puede observar en la Fig. 14A.

En este caso, se utilizó un intervalo más largo entre la interrupción de la administración crónica del etanol y la adquisición de la memoria de miedo, debido a que las ratas canuladas necesitan tener un período de recuperación de al menos 5 días. El presente protocolo es respaldado por hallazgos previos de nuestro laboratorio que han demostrado que la influencia de la abstinencia al etanol sobre la formación de la memoria de miedo persiste durante al menos dos semanas después del inicio del período de abstinencia (Bertotto y col., 2006).

Resultados

Del mismo modo que en los experimentos previos, todos los animales mostraron niveles de congelamiento comparables durante la sesión de reactivación ($[F(1,45) = 2,47; p = 0,12]$; Fig. 13B). Como puede observarse en la Fig. 13C., la infusión de PROP logró disminuir los niveles de congelamiento en las ratas ETOH tratadas con DCS, como también en todas los animales CON, independientemente del tratamiento previo a la reactivación de éstos últimos. Dichos efectos se observaron hasta una semana después. El análisis ANOVA de tres vías reveló un interacción significativa entre la dieta x droga prereactivación x droga postreactivación para el Test 1 $[F(1,45) = 11,84; p < 0,05]$ y el Test 2 $[F(1,45) = 9,45; p < 0,05]$. En ambos tests, los niveles de congelamiento de los grupos

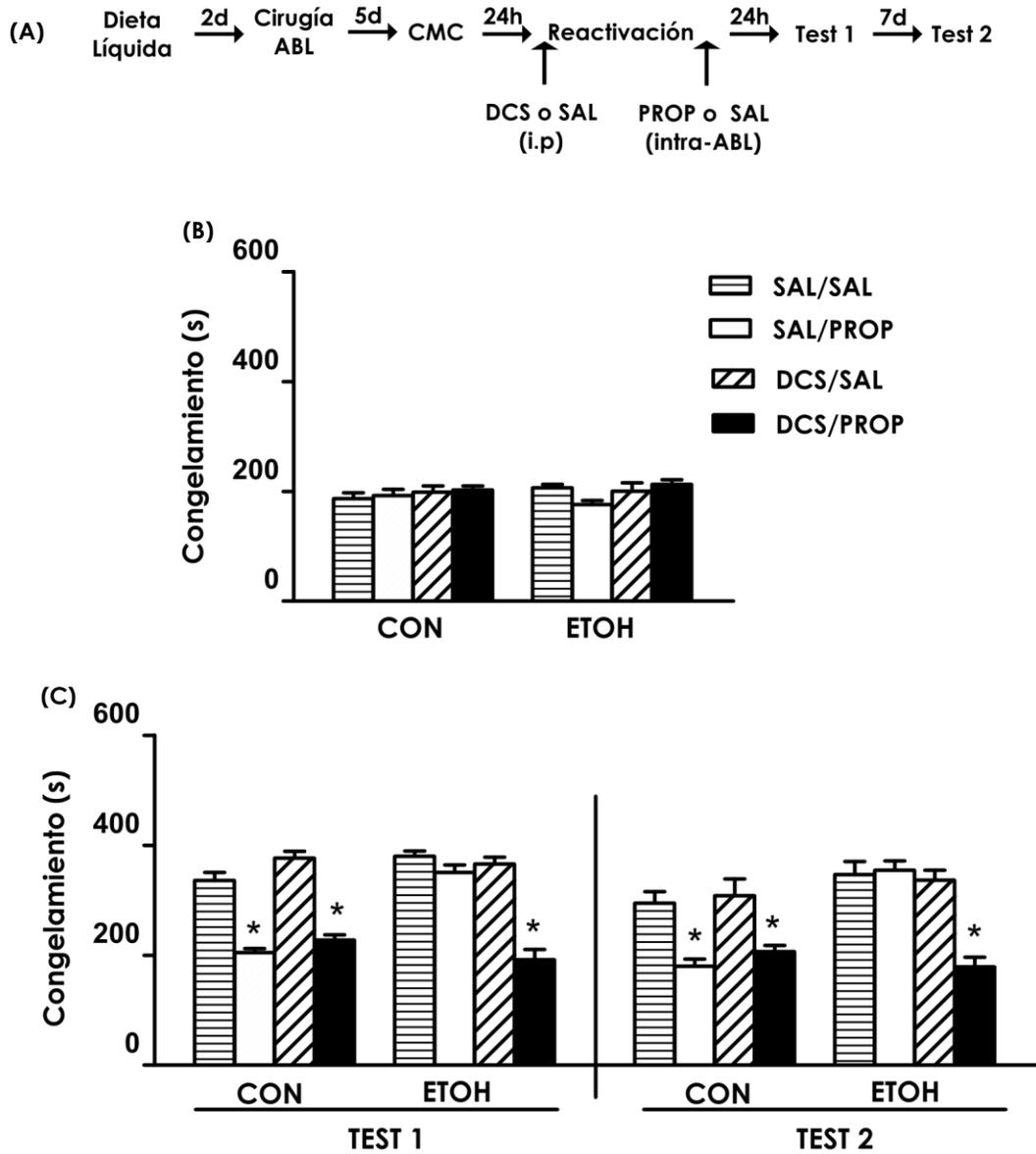


Figura 13. Efecto de la infusión de PROP intra-ABL sobre la reconsolidación de una memoria de miedo contextual en animales ETOH: Influencia de DCS. A- Esquema experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la sesión de reactivación de 5 min de duración. C- Respuesta de congelamiento durante los tests de retención de la memoria. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M del tiempo de congelamiento. (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$.

DCS- PROP y SAL-PROP de animales CON y el grupo DCS-PROP de ratas ETOH no difirieron uno de otro y fueron significativamente menores en comparación con los grupos restantes. Todos los animales no reactivados tuvieron una respuesta de congelamiento similar durante el test de retención de la memoria ($[F(1,33) = 0,10; p = 0,75]$; Fig. 14B). La localización de los sitios de infusión se muestra en la Fig. 15.

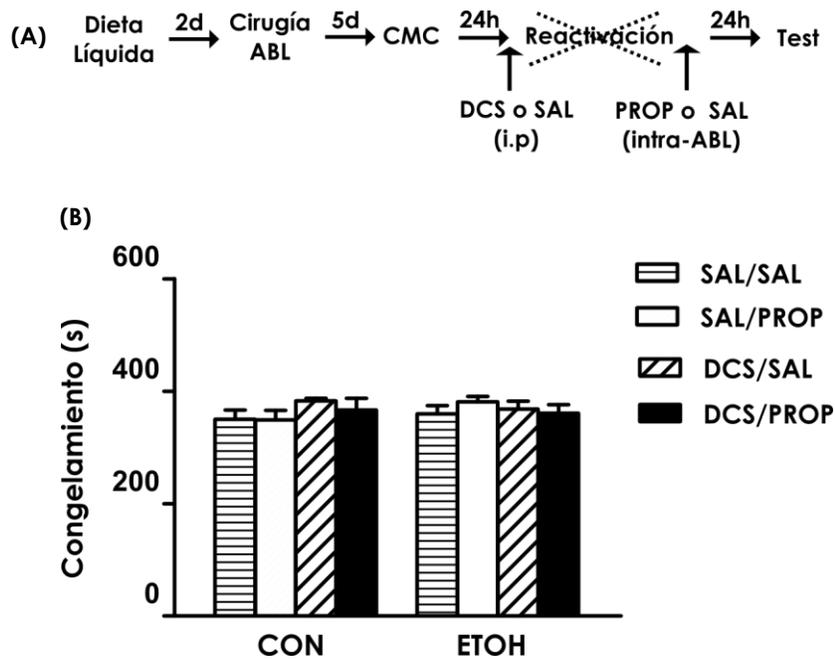


Figura 14. Efecto de la infusión de PROP intra-ABL sobre la memoria de miedo contextual en animales no sometidos a una sesión de reactivación: Influencia de DCS.

A- Esquema experimental. B- Respuesta de congelamiento durante el test de retención de la memoria. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M del tiempo de congelamiento.

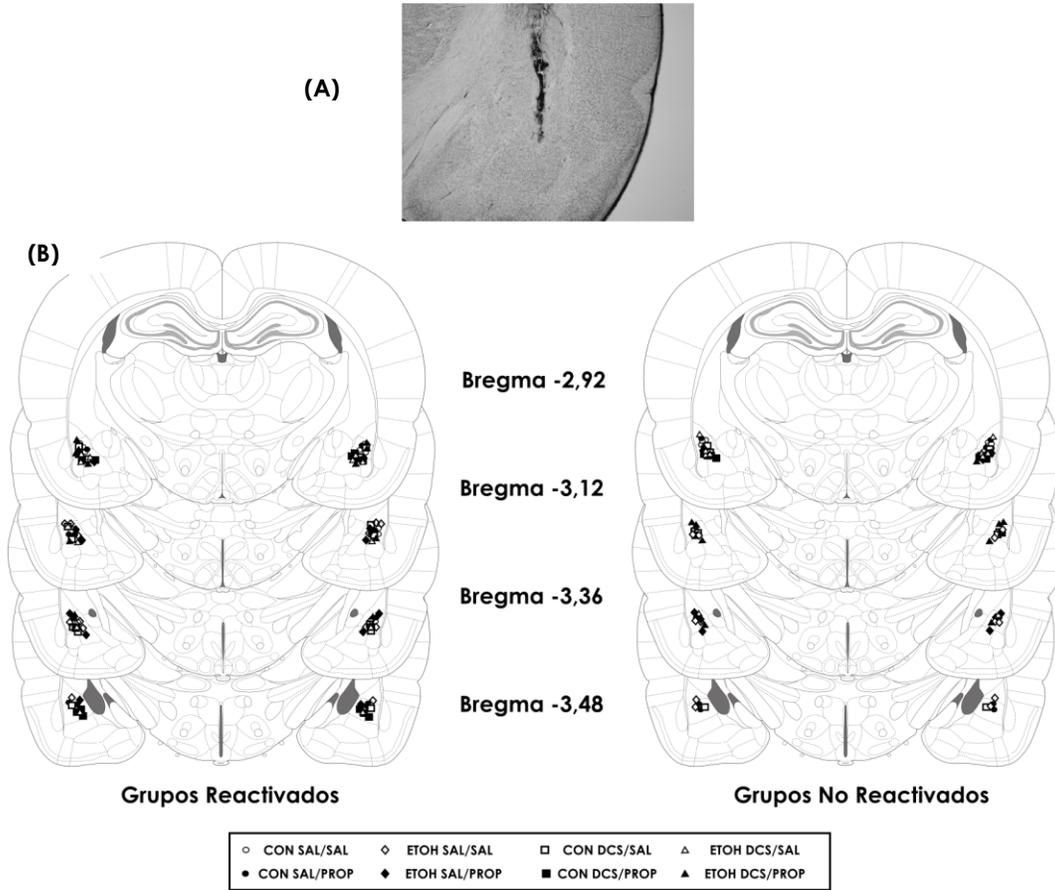


Figura 15. Localización de los sitios de infusión en el complejo ABL: Experimento VII. A- Microfotografía de un corte cerebral coronal con marca del sitio de infusión en el ABL. B y C- Láminas esquemáticas de las secciones coronales que muestran la ubicación del sitio de infusión en el ABL para los grupos sometidos (R) o no (NR) a la sesión de reactivación, respectivamente (Adaptado con permiso de Paxinos y Watson, 2009).

Estos resultados indican que PROP intra-ABL atenúa la respuesta de miedo en animales ETOH sólo cuando fueron pretratados con DCS.

Experimento VIII: Efecto de MDZ intra-ABL sobre la reconsolidación de una memoria de miedo contextual en animales abstinentes al etanol.

Procedimiento

Las ratas CON y ETOH fueron canuladas bilateralmente en el ABL en el segundo día de abstinencia, y luego de 5 días de recuperación, fueron sometidas al entrenamiento de miedo. Un día después, recibieron una inyección de DCS (5mg/kg; i.p) 30 min antes de la sesión de reactivación y MDZ (2 ug/lado) o SAL fue infundido intra-ABL al terminar dicha sesión. La retención de la memoria fue evaluada 24 h y 8 días post-reactivación (Tests 1 y Test 2). Los grupos experimentales fueron: CON-DCS/SAL (n= 7), CON-DCS/MDZ (n= 7), ETOH-DCS/SAL (n= 8), ETOH-DCS/MDZ (n=10). Para el análisis estadístico, los factores que se consideraron fueron: dieta (CON vs ETOH) y droga postreactivación (SAL vs MDZ). El diseño experimental se ilustra en la Fig. 16A.

Considerando que los resultados anteriores mostraron que la memoria de miedo en ratas ETOH es resistente a la interferencia después de su recuerdo, y que ello es revertido por la administración de DCS prereactivación; en este experimento todos los animales fueron inyectados con DCS previo a la exposición al recordatorio, a fin de reducir el número de animales a utilizar.

Resultados

Una vez más, se puede observar en la Fig. 16B que no hay diferencias significativas en los niveles de congelamiento durante la reactivación entre los grupos experimentales ([F(1,28) = 3,64; p = 0,07]). En la Fig. 16C se muestra que la infusión de MDZ intra- ABL

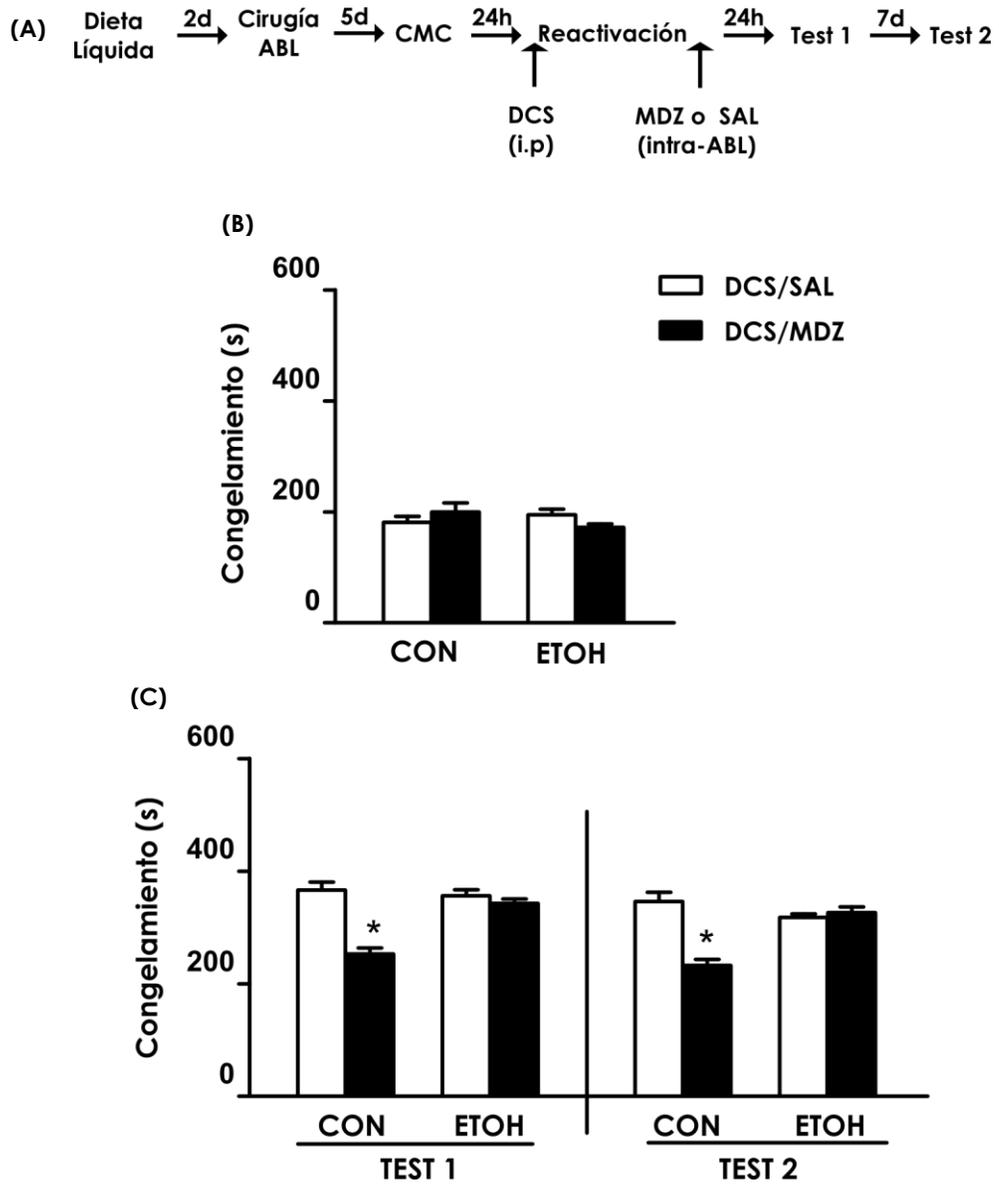


Figura 16. Efecto de la infusión de MDZ intra-ABL sobre la reconsolidación de una memoria de miedo contextual en animales ETOH: Influencia de DCS. A- Esquema experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la sesión de reactivación de 5 min de duración. C- Respuesta de congelamiento durante los tests de retención de la memoria. Los datos se muestran como la media ± E.E.M del tiempo de congelamiento. (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$.

luego de la reactivación disminuyó la respuesta de miedo sólo en animales CON durante ambos tests de retención de la memoria. El ANOVA de dos vías reveló que una interacción significativa entre los factores dieta x droga postreactivación para el Test 1 ($[F(1,28) = 18,46; p < 0,05]$) y para el Test 2 ($[F(1,28) = 24,97; p < 0,05]$). En ambas pruebas de retención de la memoria, el análisis post hoc indicó que los niveles de congelamiento del grupo CON-DCS/MDZ fueron significativamente menores comparados con los grupos restantes. La localización de los sitios de infusión se muestra en la Fig. 17.

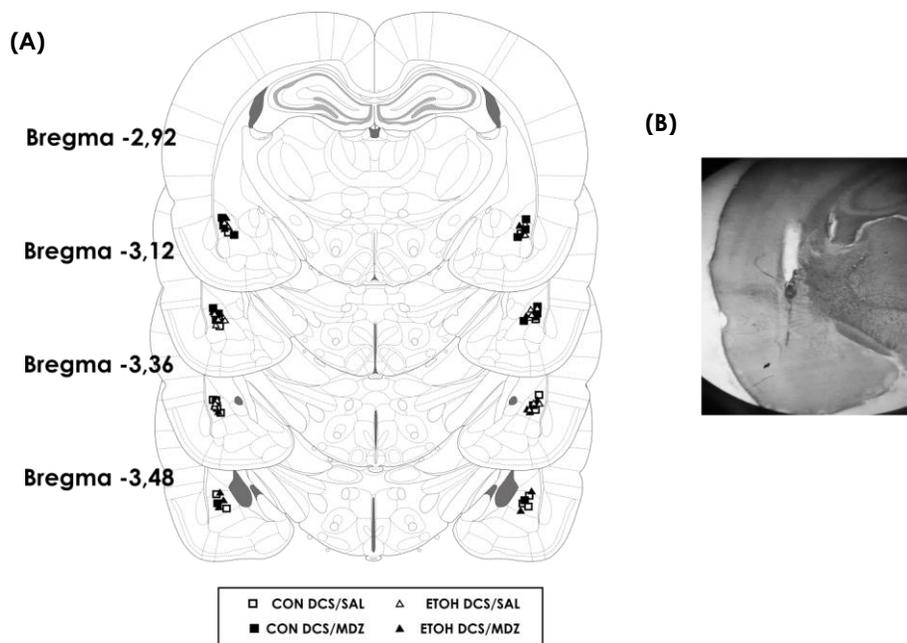


Figura 17. Localización de los sitios de infusión en el ABL: Experimento VIII. A- Láminas esquemáticas de las secciones coronales que muestran la ubicación del sitio de infusión en el ABL. B- Microfotografía de un corte cerebral coronal con marca del sitio de infusión en el ABL. (Adaptado con permiso de Paxinos y Watson, 2009).

Los resultados de este experimento indican que MDZ intra-ABL disminuye los niveles de respuesta de miedo en animales CON, no así en las ratas ETOH pretratadas con DCS.

Discusión

Los resultados del presente capítulo indicaron que los animales CON, independientemente del tratamiento previo a la reactivación, mostraron niveles de congelamiento disminuidos en la prueba de retención de la memoria cuando fueron infundidos intra-ABL con PROP o MDZ después de la sesión de reactivación. De manera similar a los resultados obtenidos con la administración sistémica de ambas drogas, dicho efecto se mantuvo una semana después y fue dependiente de la sesión de reactivación. Es decir, la reconsolidación de la memoria de miedo en ratas CON fue bloqueada por la administración de PROP o MDZ intra-ABL, revelando la participación de tal estructura cerebral en la reestabilización de la memoria aversiva luego de su evocación. Hasta la fecha, la interferencia de la reconsolidación por infusión de PROP en la amígdala sólo había sido informada en una memoria aversiva de tipo auditiva (Debiec y LeDoux, 2004). Por lo tanto, en el presente trabajo se extienden esos hallazgos a una memoria de miedo de tipo contextual. No existen estudios en la literatura que hayan evaluado el efecto de una infusión de MDZ intra-ABL después de la evocación de la memoria. Por lo tanto, los resultados actuales dan indicios de la implicancia de los R-GABA-A amigdalinos en el proceso de reconsolidación de una memoria aversiva en animales CON.

En cuanto a los animales ETOH, como muestra la Fig. 13, aquellos que recibieron SAL antes de la reactivación fueron resilientes al efecto atenuante de PROP intra-ABL sobre la memoria. Sin embargo, una vez más la facilitación de la fase de desestabilización por la administración de DCS previa a la reactivación, permitió que la infusión del β -bloqueante intra-ABL sea efectiva en bloquear la reconsolidación de la memoria de miedo en las ratas ETOH. Dichos efectos se mantuvieron una semana después y fueron dependientes de la sesión de reactivación. Por lo tanto, se puede confirmar la participación del complejo ABL, más específicamente los receptores β -adrenérgicos amigdalinos, en el proceso de reconsolidación de una memoria robusta inducida por la abstinencia al etanol. Dado que

las ratas canuladas fueron sometidas al entrenamiento de miedo al 7° día de abstinencia, y que las infusiones de PROP intra- ABL no afectaron la memoria en ratas ETOH tratadas con SAL preevoción, los resultados proporcionan evidencia adicional para sugerir un efecto relativamente a largo plazo de la abstinencia al etanol para inducir la formación de una memoria de miedo resistente a la interferencia después de su recuerdo.

Por otro lado, y como era de esperar, a pesar de la inyección de DCS previa a la reactivación, la infusión de MDZ intra-ABL no afectó la memoria de miedo en animales ETOH (Fig. 16). Este hallazgo refuerza los resultados obtenidos en el capítulo anterior, donde se asoció la falta de efecto de MDZ con una disminución en la expresión de la subunidad $\alpha 1$ de R-GABA-A en el ABL por influencia del consumo crónico/abstinencia al etanol.

Capítulo III

Efecto de la evocación de una memoria de miedo sobre la inducción de secuelas emocionales en animales abstinentes al etanol.

Fundamento

Se ha establecido que las experiencias negativas poseen un rol clave en el mantenimiento de los desórdenes psiquiátricos y la adicción a drogas. En relación a ello, se ha demostrado que el recuerdo de una memoria aversiva representa un factor crítico en la vulnerabilidad a la recaída al consumo en animales dependientes al alcohol (Bertotto y col., 2010). Considerando además, que la estrategia comportamental adoptada por un organismo frente a una situación amenazante está influenciada por el estado interno del individuo (McGaugh, 1983), se propuso examinar las secuelas emocionales inducidas por el recuerdo de una memoria de miedo en animales abstinentes al etanol. Para ello, se evaluó el efecto de la evocación de una memoria aversiva sobre el comportamiento de los animales ETOH en el laberinto en cruz elevado (LCE) y en un contexto novedoso.

Numerosos trabajos han demostrado que la exposición a estresores incontrolables, entre los cuales se puede mencionar la descarga eléctrica, incrementa el comportamiento tipo ansiedad en el LCE (Korte, 2003). Por lo tanto, a fin de disociar los efectos del entrenamiento de miedo *per se* de aquellos potencialmente generados por la reactivación de la memoria, en esta serie de experimentos todos los animales fueron sometidos a una sesión de reactivación 7 días postcondicionamiento. Cabe mencionar, que hemos corroborado que bajo las condiciones de este nuevo diseño experimental, la memoria de miedo contextual en los animales CON es vulnerable a la disrupción luego de su evocación, mientras que los animales ETOH muestran resistencia a la interferencia del proceso de reconsolidación.

Experimento IX: Efecto de la evocación de una memoria de miedo contextual sobre comportamiento en el LCE en animales abstinentes al etanol.

Procedimiento

Los animales de los grupos CON y ETOH fueron sometidos al entrenamiento de miedo contextual el tercer día de abstinencia, como se describió en Materiales y Métodos. Siete días más tarde, fueron sujetos o no a la sesión de reactivación, y 30 min después, fueron evaluados durante 5 min en el LCE. Los grupos experimentales fueron: CON-NR (n= 11), CON-R (n= 12), ETOH-NR (n= 11) y ETOH-R (n= 15). Para el análisis estadístico los factores considerados fueron: dieta (CON vs ETOH) y reactivación (reactivados-R- vs no reactivados-NR-). La Fig. 18A muestra el esquema del diseño experimental.

Resultados

La Figura 18 muestra que los animales ETOH reactivados presentan un comportamiento tipo-ansiolítico en el LEC, a pesar que no existen diferencias en los niveles de congelamiento entre los grupos CON y ETOH durante la sesión de reactivación ($t = 0,42$; $p > 0,05$]; Fig. 18B). El ANOVA de dos vías para el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos reveló una interacción significativa entre la dieta x reactivación ($[F(1,45) = 14,36$; $p < 0,05$]). Para el número de entradas en los brazos abiertos, el análisis estadístico indicó un efecto significativo de la interacción entre los factores dieta x reactivación ($[F(1,45) = 11,43$; $p < 0,05$]). La prueba *post hoc* indicó que las ratas ETOH reactivadas presentan menor número de entradas en los brazos abiertos (Fig. 18D) y menor porcentaje de tiempo de permanencia en los mismos (Fig. 18C) que el resto de los grupos. No se detectó ningún efecto significativo sobre el número de entradas en los brazos cerrados ($[F(1,45) = 0,006$; $p > 0,05$]; Fig. 18E), sugiriendo que el comportamiento observado no se debe a una reducción en la actividad exploratoria (Cruz y col., 1994).

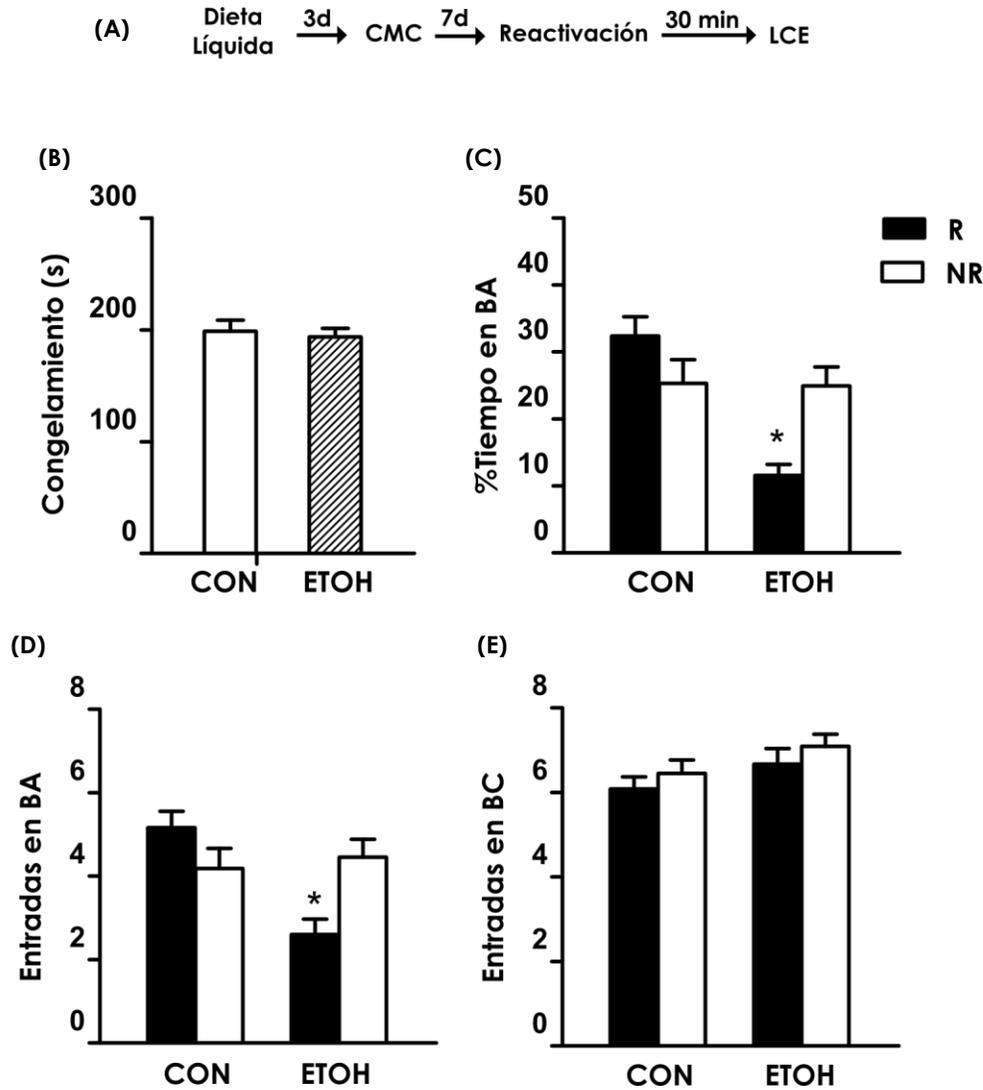


Figura 18. Efecto de la evocación de una memoria de miedo contextual sobre el comportamiento en el LCE en animales ETOH. A- Esquema del diseño experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la sesión de reactivación de la memoria de miedo (5 min). C, D y E- Comportamiento en el LCE: % de tiempo en los brazos abiertos (BA), número de entradas en los BA y los brazos cerrados (BC), respectivamente. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. de los parámetros evaluados. (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$. LCE: laberinto en cruz elevado. R: reactivados. NR: no reactivados.

En base a estos hallazgos, se puede inferir que la evocación de una memoria de miedo induce un comportamiento tipo-ansigénico en animales abstinentes al etanol.

Experimento X: Efecto de la evocación de una memoria de miedo contextual sobre la respuesta de congelamiento en un contexto novedoso en animales abstinentes al etanol.

Procedimiento

Los animales asignados a los grupos CON o ETOH fueron sometidos al entrenamiento de miedo contextual al tercer día de abstinencia como se describió en Materiales y Métodos. Siete días más tarde, fueron sujetos o no a la sesión de reactivación, y 30 min después, fueron evaluados durante 5 min en un nuevo contexto nuevo. Los grupos experimentales fueron: CON-NR (n= 9), CON-R (n= 12), ETOH-NR (n= 10) y ETOH-R (n= 12). Para el análisis estadístico los factores considerados fueron: dieta (CON vs ETOH) y reactivación (reactivados-R- vs no reactivados-NR-). El esquema del protocolo experimental se muestra en la Fig. 19A.

Resultados

Como puede observarse en la Fig. 19C, el recuerdo de una memoria de miedo induce un incremento en los niveles de respuesta de miedo en un contexto nuevo en ratas abstinentes, aunque los niveles de congelamiento sean similares durante la sesión de reexposición en el contexto de condicionamiento ($t= 1,28$; $p > 0,05$); Fig. 19B). EL ANOVA de dos vías indicó una interacción significativa entre la dieta x reactivación ($[F(1,28) = 20,49$; $p < 0,05$]; Fig. 19C). La prueba de Tukey muestra que los niveles de congelamiento en un nuevo contexto fueron significativamente mayores en el grupo ETOH reactivado en comparación con el resto de los grupos.

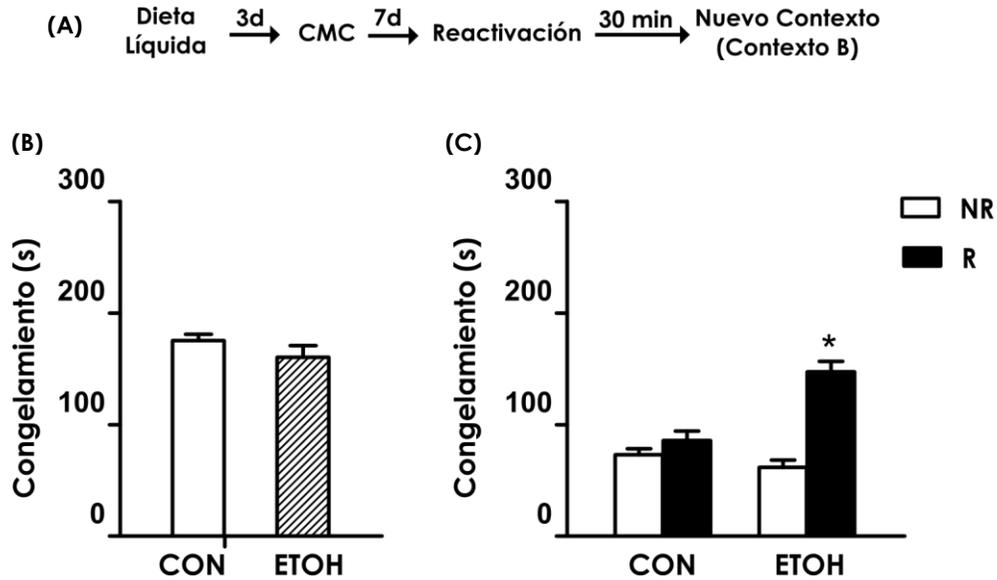


Figura 19. Efecto de la evocación de una memoria de miedo sobre la respuesta de congelamiento en un contexto novedoso en animales ETOH. A- Esquema del diseño experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la reexposición al contexto de condicionamiento de miedo. C- Respuesta de congelamiento en un ambiente nuevo. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M de la respuesta de miedo. (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$. R: reactivados. NR: no reactivados.

Dichos resultados permiten sugerir que la evocación de una memoria de miedo contextual promueve un incremento en la respuesta de miedo en un contexto novedoso en animales abstinentes al etanol.

Experimento XI: Rol del proceso de desestabilización de la memoria de miedo en el comportamiento tipo-ansiosgénico observado en animales abstinentes al etanol.

Fundamento

Tanto la sensibilización emocional como la ocurrencia del proceso de labilización de la memoria, parecen ser independientes de los niveles de respuesta de miedo durante la reexposición al contexto de condicionamiento. Es decir, frente a iguales niveles de congelamiento durante la evocación entre los animales CON y ETOH, la memoria de los animales ETOH no labiliza y además ese recuerdo induce en ellos un comportamiento tipo-ansiosgénico. En conjunto, estas evidencias permiten proponer un rol funcional-adaptativo a la desestabilización de la memoria miedo, ya que en ausencia de ese proceso, el recuerdo genera secuelas emocionales negativas (incremento de ansiedad en el LEC) en las ratas abstinentes al etanol. Si esta hipótesis es correcta, el bloqueo de la desestabilización de la memoria de miedo en el grupo CON debería incrementar el comportamiento tipo-ansiedad en dichos animales. En base a trabajos previos, que indican que nimodipina (NIMO, antagonista de canales de calcio tipo L- dependientes de voltaje) previene la desestabilización de la memoria de miedo, se evaluó el efecto de NIMO antes de la reactivación para bloquear dicho proceso en animales CON (De Oliveira Alvares y col., 2013). Por otro lado, si los efectos facilitadores de la DCS previo a la reactivación son selectivos para la desestabilización de una memoria de miedo resistente, DCS previa a la reactivación debería prevenir la respuesta incrementada tipo-ansiedad en el LCE exhibida por los animales ETOH.

Experimento XI.a: Efecto del bloqueo de la labilización de la memoria de miedo en animales controles sobre el comportamiento en el LCE.

Procedimiento

En primer lugar, se evaluó si NIMO afecta *per se* el comportamiento de los animales en el LCE. Para ello, diez días después de finalizar la dieta líquida, animales del grupo CON recibieron una inyección subcutánea de NIMO (16 mg/kg, s.c) o vehículo (VEH). Sesenta minutos después, los animales fueron evaluados en el LCE. Los grupos experimentales fueron: CON-VEH (n= 9) y CON-NIMO (n= 9). El protocolo experimental se muestra en la Fig. 20A.

En la segunda parte de este experimento, se analizó el efecto del bloqueo de la desestabilización de la memoria de miedo por la administración de NIMO previa a la evocación sobre el comportamiento en el LCE. Tres días después de finalizar la dieta líquida, las ratas del grupo CON fueron sometidas al condicionamiento de miedo descrito en Materiales y Métodos, y siete días más tarde recibieron una inyección subcutánea de NIMO (16 mg/kg) o VEH 30 min antes de la sesión de reactivación. Treinta minutos después, se examinó el comportamiento de los animales en el LCE durante 5 min. Paralelamente se evaluó la respuesta en el LEC de animales que no recibieron el tratamiento de dieta líquida ni fueron condicionados (animales *naïve*). Los grupos experimentales fueron: *Naïve* (n=9), CON-VEH (n= 7) y CON-NIMO (n= 8). La Fig. 21A representa el esquema experimental utilizado.

Resultados

La Fig. 20 (B-C) muestra que la administración de NIMO no afectó el desempeño comportamental de los animales en el LCE. No se observaron diferencias estadísticamente

significativas en el número de entradas en los brazos abiertos y cerrados, y tampoco en el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos entre los grupos ($[t= 1,21; p > 0,05]$, $[t= -1,11; p > 0,05]$, $[t= -0,38; p > 0,05]$, respectivamente). Por lo tanto se validó la administración de la droga en estudio para su uso en el siguiente experimento.

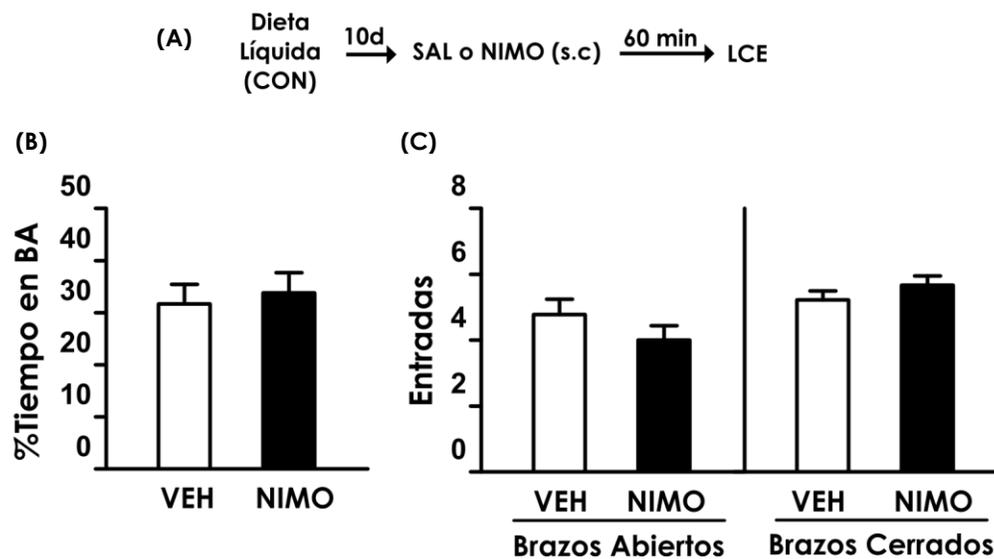


Figura 20. Efecto de Nimodipina (NIMO) sobre el comportamiento en el LCE. A- Diseño experimental. Comportamiento en el LEC: B- % de tiempo en los brazos abiertos (BA) y C- número de entradas. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M de los parámetros evaluados.

La Fig. 21 indica que los animales del grupo CON que recibieron NIMO previo a la reactivación de la memoria mostraron un comportamiento tipo-ansigénico en el LEC. El ANOVA de una vía indicó un significativo efecto de la condición (*Naïve* vs VEH vs NIMO; $[F(1,21) = 19,74; p < 0,05]$) para el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos. De manera similar, el estudio estadístico mostró un efecto significativo de la condición para el número de entradas en los brazos abiertos ($[F(1,21) = 5,45; p < 0,05]$). La prueba *post hoc* indicó que las ratas CON inyectadas con NIMO prereactivación

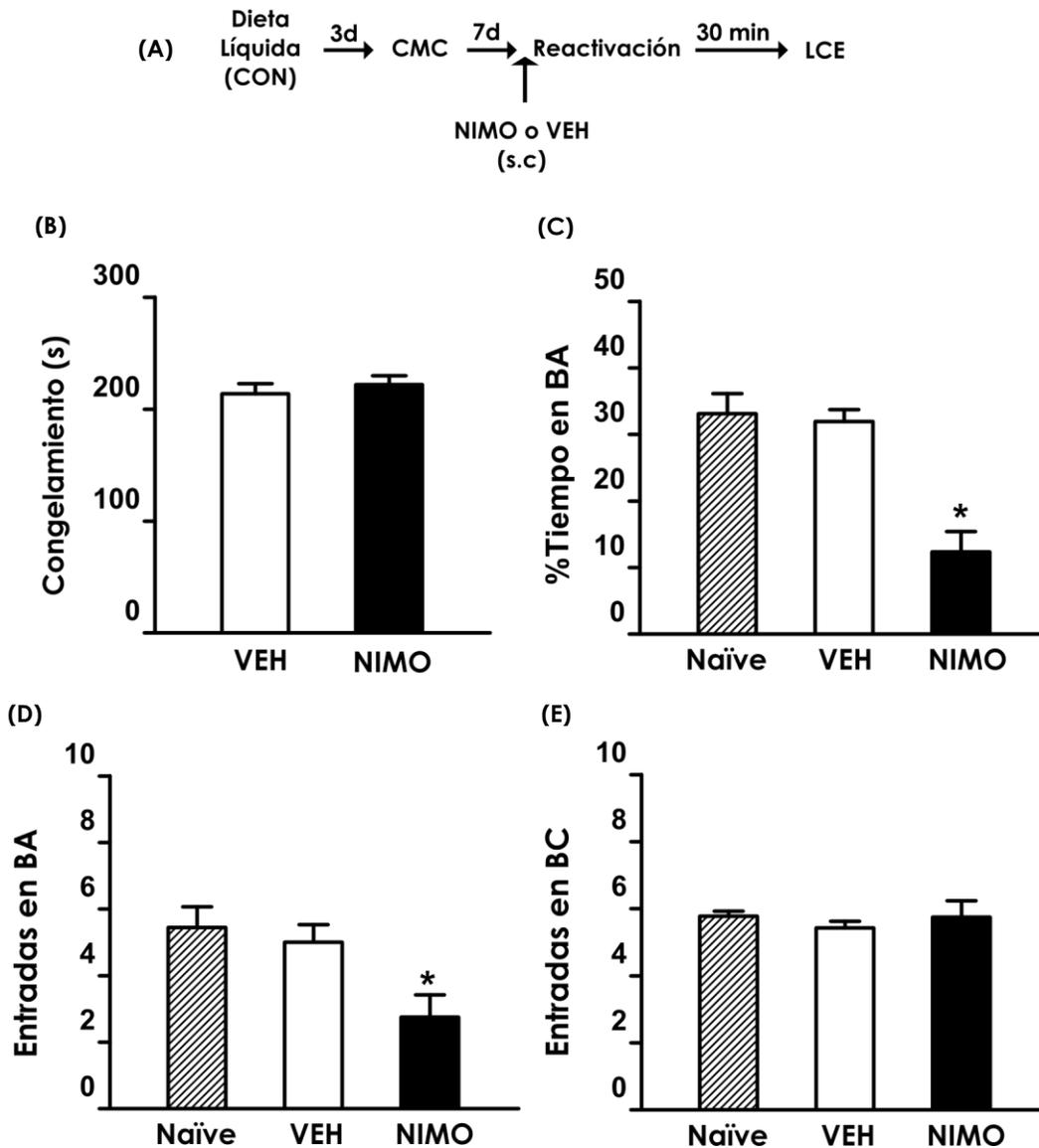


Figura 21. Efecto de Nimodipina (NIMO) previa a la reactivación de la memoria de miedo contextual sobre el comportamiento en el LCE en animales CON. A- Diseño experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la sesión de reactivación. C, D y E- Comportamiento en el LCE: % de tiempo en los brazos abiertos (BA), número de entradas en los BA y los brazos cerrados (BC), respectivamente. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M de los parámetros evaluados. (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$.

presentan menor número de entradas en los brazos abiertos (Fig. 21D) y menor porcentaje de tiempo de permanencia en los mismos (Fig. 21C) respecto a los animales CON tratados con VEH y los *Naïve*, los cuales presentaron similar desempeño en el LCE. No se detectó ningún efecto significativo sobre el número de entradas en los brazos cerrados ($[F(1,21) = 0,35; p > 0,05]$; Fig. 21E). Además como muestra la Fig. 21B, los niveles de congelamiento fueron similares entre ambos grupos ($[t = -0,69; p > 0,05]$). Cabe mencionar que hemos corroborado que bajo nuestras condiciones experimentales la administración de NIMO previa a la reactivación previene la labilización de una memoria aversiva. Por lo tanto, a pesar de que la respuesta de congelamiento fue similar en ambos grupos, los animales cuya desestabilización de la memoria fue bloqueada por la administración de NIMO presentaron un comportamiento tipo-ansiosgénico en el LEC.

A partir de dichos resultados se puede inferir que el bloqueo de la labilización induce un comportamiento tipo-ansiosgénico en los animales CON.

Experimento XI.b: Efecto de la facilitación de la labilización de la memoria de miedo sobre el comportamiento tipo-ansiedad en animales abstinentes al etanol.

Procedimiento

En este caso también evaluamos en primera instancia el efecto de la droga en estudio *per se* sobre el comportamiento de los animales en el LCE. Para ello, en el día diez de abstinencia animales del grupo ETOH recibieron una inyección DCS (5 mg/kg; i.p) o SAL. Sesenta minutos después, los animales fueron evaluados en el LCE. Los grupos experimentales fueron: ETOH-SAL (n= 5) y ETOH-DCS (n= 7). En la Fig. 22A se presenta el esquema del diseño experimental.

En la segunda parte de este experimento, se analizó el efecto de facilitar la desestabilización de la memoria de miedo por administración de DCS preevención sobre el comportamiento en el LCE en animales ETOH. Para ello, las ratas abstinentes fueron sometidas al condicionamiento de miedo en el tercer día de abstinencia como se mencionó en Materiales y Métodos, y siete días más tarde recibieron una inyección DCS (5 mg/kg; i.p) o SAL 30 min antes de la sesión de reactivación. Treinta minutos después, se examinó el comportamiento de dichos animales en el LCE durante 5 min. Además se utilizó como grupo control de los potenciales cambios a animales *naïve*. Los grupos experimentales fueron: *Naïve* (n= 15), ETOH-SAL (n= 13) y ETOH-DCS (n= 13). El protocolo experimental se muestra en la Fig. 23A.

Resultados

La Fig. 22 (B-C) muestra que la administración de DCS no modificó el comportamiento de los animales en el LCE. No se observan diferencias estadísticamente significativas en el número de entradas en los brazos abiertos y cerrados, y tampoco en el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos entre los grupos ETOH inyectados con SAL o DCS ([$t= 0,10$; $p > 0,05$], [$t= -0,71$; $p > 0,05$], [$t= 0,57$; $p > 0,05$], respectivamente). *Por lo tanto, se validó la administración de la droga en estudio para su uso en el siguiente experimento.*

La Fig. 23 indica que la administración de DCS previo a la sesión de reactivación revierte el comportamiento tipo-ansiolítico inducido por el recuerdo en los animales ETOH. El ANOVA de una vía reveló, para el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos, un efecto significativo de la condición (*Naïve* vs SAL vs DCS; [$F(1,38) = 24,58$; $p < 0,05$]). De igual manera, el estudio estadístico arrojó un efecto significativo de la condición para el número de entradas en los brazos abiertos ([$F(1,38) = 18,03$; $p < 0,05$]). La prueba *post hoc* indicó que las ratas ETOH inyectadas con SAL previo a la reactivación presentan

menor número de entradas en los brazos abiertos (Fig. 23D) y menor porcentaje de tiempo de permanencia en los mismos (Fig. 23C) respecto a los animales ETOH tratados con DCS y los *Naïve*, los cuales presentaron similar desempeño en el LCE. No se detectó ningún efecto significativo sobre el número de entradas en los brazos cerrados entre los grupos ($[F(1,38) = 0,62; p > 0,05]$); Fig. 23E). Además, los niveles de congelamiento fueron similares entre los grupos ETOH tratados con SAL o DCS ($[t = 1,66; p > 0,05]$; Fig. 23B).

En base a estos resultados, se puede sugerir que la facilitación del proceso de desestabilización por efecto de DCS revierte el comportamiento tipo-ansiosgénico inducido por la evocación de una memoria de miedo en animales ETOH.

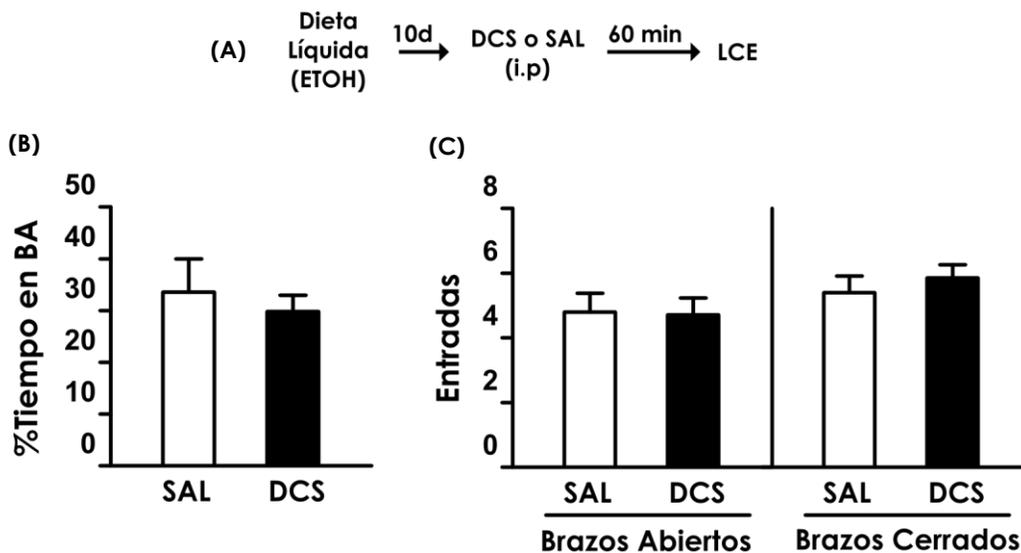


Figura 22. Efecto de D-cicloserina (DCS) sobre el comportamiento en el LCE en animales ETOH. A- Diseño experimental. Comportamiento en el LCE: B- % de tiempo en los brazos abiertos (BA) y C- número de entradas. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M de los parámetros evaluados.

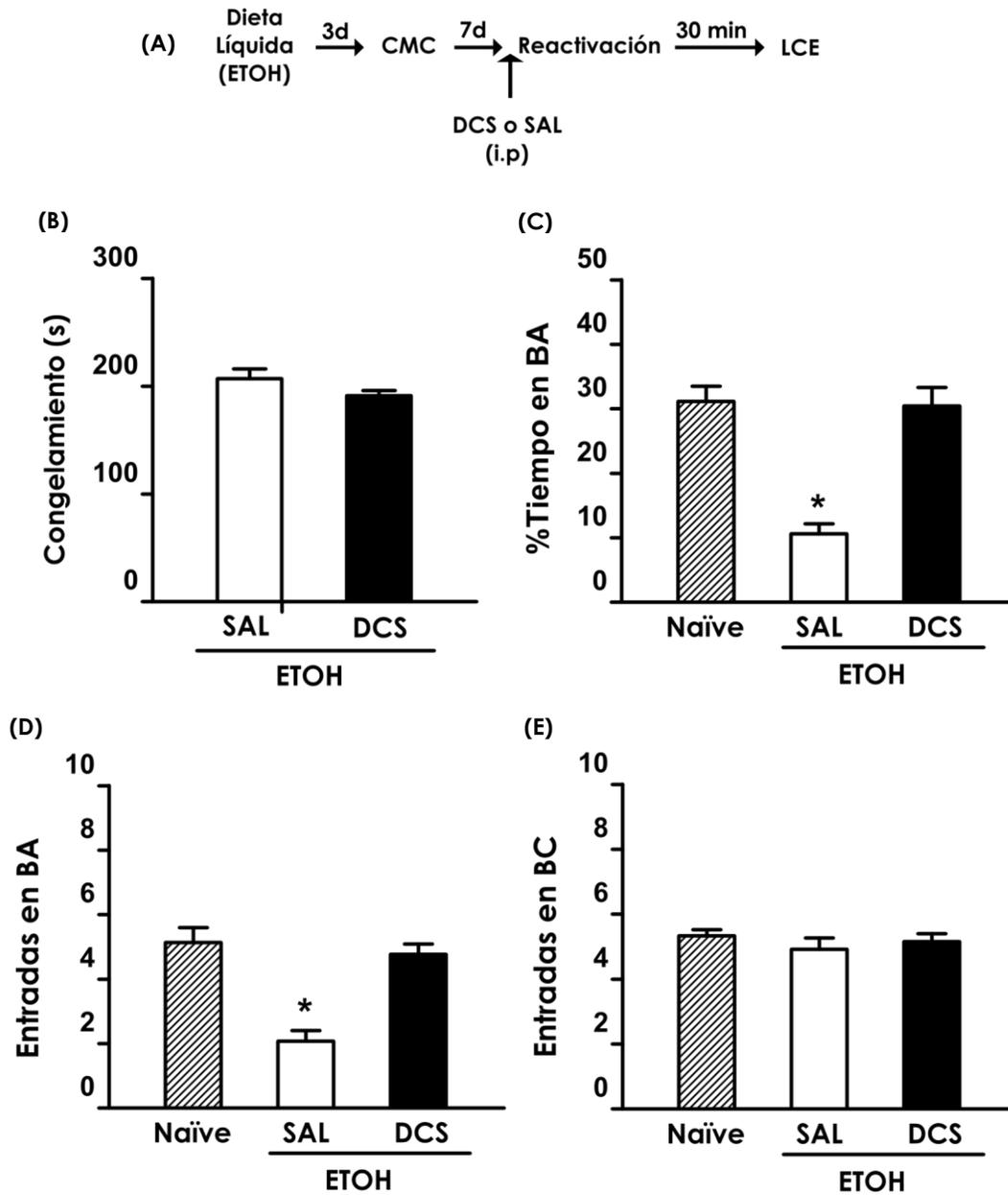


Figura 23. Efecto de D-cicloserina (DCS) previa a la reactivación de la memoria de miedo contextual sobre el comportamiento en el LCE en animales ETOH. A- Diseño experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la sesión de reactivación. C, D y E- Comportamiento en el LCE: % de tiempo en los brazos abiertos (BA), número de entradas en los BA y los brazos cerrados (BC), respectivamente. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M de los parámetros evaluados. (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$.

Discusión

Como revelan nuestros resultados, las ratas CON-R mostraron una performance semejante al grupo CON-NR en el LCE y en un contexto novedoso. A partir de ello, se puede inferir que la evocación de una memoria de miedo contextual no altera el comportamiento de los animales CON en dichas pruebas. En concordancia con esto, se ha demostrado que la reexposición al contexto de condicionamiento de miedo, no induce un incremento inmediato en la respuesta tipo-ansiedad; aunque si modifica el patrón sueño-vigilia (MacLean y Datta, 2007). Además, un estudio reciente mostró que, hasta 14 días postcondicionamiento, la evocación de una memoria aversiva no altera el comportamiento en el LCE en ratas controles, pero si provoca alteraciones en la performance en el LCE en animales sometidos a aislamiento social previo al condicionamiento (Berardi y col., 2014). Además, Korte y col. (1999) utilizando un paradigma de evitación inhibitoria por pasaje de compartimento en un paso (*step through passive avoidance*), demostraron que un día después del entrenamiento, la evocación de la memoria promueve un estado tipo-ansiedad. Sin embargo, dichos autores observaron que una semana posterior al condicionamiento, al igual que en los experimentos de esta tesis, el recuerdo no afecta la respuesta de los animales en el LCE. Por lo tanto, se puede inferir que los animales CON muestran resiliencia frente a una situación de conflicto después de la evocación de una memoria de miedo, al menos bajo las condiciones experimentales de los trabajos descriptos.

Los resultados del presente capítulo indican que, a diferencia de los animales CON, la reactivación de una memoria de miedo 7 días después del entrenamiento induce un comportamiento símil-ansiogénico en las ratas ETOH (Fig.18). La disminución en el número de entradas y el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos del grupo ETOH-R, no se debe a una reducción de la actividad motora general, ya que no se detectaron diferencias en las entradas en los brazos cerrados entre los grupos (Cruz y col.,

1994). Si bien algunos autores han indicado que luego de varias semanas del inicio del período de abstinencia se restablece la respuesta símil-ansiosgénica en ratas dependientes al etanol (Rasmussen y col., 2001; Valdez y col., 2002), estudios preliminares de nuestro laboratorio indicaron que en el día 10 de abstinencia los animales ETOH no muestran una respuesta incrementada tipo-ansiedad en el LCE. Así, dado que las ratas ETOH al día 10 de abstinencia y las pertenecientes al grupo ETOH-NR se comportaron como animales *naïve* y CON en el LCE, se puede inferir que la respuesta de los animales ETOH-R no fue resultado de la abstinencia al etanol *per se*. Además, el efecto observado fue dependiente de la sesión de reactivación, dado que se no se observó un comportamiento tipo-ansiedad en los animales ETOH-NR. Por otro lado, es importante resaltar que el estado interno aversivo que induce el recuerdo de miedo en las ratas ETOH, no puede ser atribuido a los niveles de congelamiento durante la reactivación; ya que ambos grupos (CON y ETOH) mostraron una respuesta de miedo similar durante la reexposición al contexto (Fig. 18B). A partir de dichos hallazgos se puede concluir que la evocación de una memoria miedo contextual induce un comportamiento tipo-ansiedad en las ratas ETOH.

Como era de esperar, cuando se examinó el efecto de la reactivación de una memoria de miedo en el comportamiento en un contexto nuevo, se encontró que las ratas ETOH-R presentaron mayor respuesta de congelamiento que los animales CON-R y los grupos no reactivados. Del mismo modo que la respuesta tipo-ansiedad, el incremento en los niveles de congelamiento en un contexto nuevo exhibido por los animales ETOH, fue dependiente de la sesión de reactivación y no fue generado por efecto de la abstinencia *per se*. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la evocación de una memoria aversiva induce una sensibilización emocional en los animales ETOH.

Es ampliamente conocido que el malestar psicológico asociado con la ansiedad experimentada durante la abstinencia, desempeña un papel importante en la perpetuidad del uso y abuso de alcohol (Becker 1999; Heilig y col., 2010). Luego de períodos

prolongados de tiempo después de la interrupción del consumo crónico de alcohol (fase tardía de la abstinencia), no se observa un efecto ansiogénico de la abstinencia *per se*. Sin embargo, las respuestas ansiogénicas exageradas se observan como resultado de la exposición del sujeto dependiente a estímulos estresantes. En este sentido, se ha encontrado que luego de la fase aguda de la abstinencia, los animales dependientes al alcohol presentan una reactividad al estrés aumentada, evidenciada por un incremento en la respuesta ansiogénica evaluada en diferentes paradigmas comportamentales (Valdez y col., 2002,2003; Breese y col., 2005; Sommer y col., 2008). Además, estudios de neuroimágenes realizados en pacientes alcohólicos, han revelado respuestas cerebrales exageradas ante estímulos afectivos negativos de manera selectiva (George y col., 2008; Gilman y Hommer, 2008). También se ha establecido una influencia del estrés sobre el “*craving*” y la recaída al consumo de alcohol en humanos (Fox y col., 2007; Sinha y Li, 2007; Sinha, 2009). En otras palabras, y de manera persistente en el tiempo, los eventos estresantes poseen capacidad de instaurar un estado ansiogénico y disparar la recaída al consumo de alcohol, tanto en animales como en individuos dependientes. En relación a ello, el hecho que la evocación de una memoria de miedo induzca un estado símil-ansiogénico (resultados de la presente tesis) y un aumento del consumo de etanol (Bertotto y col., 2010) en animales abstinentes, sugiere que el recuerdo aversivo actúa de forma similar a un estímulo estresante, promoviendo cambios en las propiedades motivacionales del alcohol. A partir de nuestros hallazgos, se puede proponer firmemente que el recuerdo de una memoria “traumática” representa un factor crítico en el mantenimiento de la adicción al alcohol.

Dado que la abstinencia al etanol induce la generación de una memoria de miedo resistente a la desestabilización luego de su recuerdo, y que la evocación de dicha memoria promueve a un comportamiento tipo-ansiedad, surgió el interrogante: ¿existe una influencia del proceso de labilización de memoria sobre la sensibilización emocional inducida por la evocación en animales ETOH? Los hallazgos de esta tesis indican que el

bloqueo del proceso de labilización por la administración de NIMO previa a la reactivación indujo un comportamiento símil-ansiógeno en el LEC en ratas CON, mientras que la respuesta del grupo CON-SAL no se diferenció del grupo *naïve* (Fig.21). Por otro lado, la inducción de la desestabilización de la memoria por la inyección de DCS antes de la sesión de reactivación revirtió el comportamiento tipo-ansiedad inducido por el recuerdo aversivo en ratas ETOH; las cuales presentaron una respuesta similar a los animales *naïve* (Fig.23). Sin embargo, tal como se demostró previamente, cuando no se facilitó la ocurrencia de la fase de desestabilización, las ratas ETOH mostraron una respuesta tipo-ansiedad en el LEC después de la evocación de la memoria aversiva (grupo ETOH-SAL). Cabe resaltar que en ambos experimentos no se observó influencia de la administración de NIMO o de DCS preactivación sobre la respuesta de miedo, por lo que los hallazgos encontrados no pueden ser atribuidos a diferencias en los niveles de congelamiento entre los grupos durante la reactivación (Figs. 21B y 23B). Además, ninguna de las drogas indujo cambios en la actividad motora de los animales, ya que todos los grupos presentaron un número similar de entradas en los brazos cerrados (Figs. 21D y 23D). En base a dichos resultados, se puede sugerir que la sensibilización emocional inducida por la evocación de una memoria del miedo contextual en ratas ETOH está asociada, al menos en parte, con la resistencia a la desestabilización de dicha traza. En conclusión, estos hallazgos permiten sugerir un rol funcional al proceso de labilización de una memoria de miedo robusta, debido que en ausencia de dicha fase, su evocación genera secuelas emocionales negativas.

Capítulo IV

Efecto de la interferencia de la reconsolidación de una memoria de miedo contextual sobre las potenciales secuelas emocionales inducidas por la evocación en animales abstinentes al etanol.

Experimento XII: Efecto de la evocación de una memoria de miedo contextual previamente interferida sobre el comportamiento tipo-ansiedad en animales abstinentes al etanol.

Fundamento

Es conocido que la interferencia de la reconsolidación de la memoria representa una estrategia terapéutica para reducir memorias “maladaptativas” implicadas en desórdenes psiquiátricos y adicción a drogas. Considerando que los hallazgos de la presente tesis muestran que el recuerdo de una memoria aversiva promueve un estado tipo-ansiosgénico en ratas ETOH; resultó interesante evaluar el efecto de la interferencia del proceso de reconsolidación sobre dicha secuela emocional. Para ello, se procedió a examinar el efecto de la evocación de una memoria de miedo que ha sido interferida previamente sobre la performance en el LCE en animales abstinentes al etanol.

Procedimiento

A partir de los resultados anteriores, hemos demostrado que DCS prerreactivación fue un requisito necesario para que PROP o CSA logren interferir el proceso de reconsolidación de una memoria de miedo contextual en ratas ETOH. Por lo tanto, para reducir al mínimo los animales a utilizar, en este experimento todas las ratas fueron tratadas con DCS previo a la reactivación y se eligió PROP como agente interferente.

Los animales de los grupos CON y ETOH fueron condicionados como se describió previamente en el día 3 de abstinencia. Siete días más tarde, las ratas recibieron DCS (5 mg/kg; ip) 30 min antes de una sesión de reactivación de 5 min. Inmediatamente después, fueron inyectadas con PROP (10 mg/Kg, i.p) o SAL. Al siguiente día, la retención de la memoria se evaluó por reexposición al contexto de condicionamiento durante 5 min

(Test). Treinta minutos después, las ratas fueron evaluadas en el LCE. Los grupos experimentales fueron: CON-DCS/SAL (n=10), CON-DCS/PROP (n=9), ETOH-DCS/SAL (n=12), ETOH-DCS/PROP (n=11). Para el análisis estadístico, los factores que se consideraron fueron: dieta (CON vs ETOH) y droga postreactivación (SAL vs PROP). El esquema del diseño experimental se muestra en la Fig. 24A.

Paralelamente, se evaluó el efecto de dichos tratamientos farmacológicos sobre la performance en el LCE en ratas de ambos grupos experimentales (CON y ETOH) no sometidos ninguna reexposición al contexto de condicionamiento. Para ello, siete días postentrenamiento de miedo las ratas CON y ETOH recibieron una inyección DCS y 30 minutos más tarde, la administración de PROP o SAL en su caja alojamiento. Al día siguiente fueron evaluadas en el LCE, sin ser sometidas a la reexposición al contexto de condicionamiento. Los grupos experimentales fueron: CON-DCS/SAL (n=7), CON-DCS/PROP (n=8), ETOH-DCS/SAL (n=7), ETOH-DCS/PROP (n=6). Para el análisis estadístico los factores considerados fueron: dieta (CON vs ETOH) y droga postreactivación (SAL vs PROP). El esquema del diseño experimental se muestra en la Fig. 25A.

Resultados

De manera semejante a todos los experimentos de esta tesis, en este caso tampoco hubo diferencia significativa en los niveles de congelamiento entre los grupos durante la sesión de reactivación (Fig. 24B; $F(1,38) = 0,003$; $p > 0,05$). Replicando resultados anteriores, las ratas CON y ETOH tratadas con DCS prereactivación y PROP postreactivación mostraron reducidos niveles de congelamiento durante la prueba de retención de la memoria (Fig. 24C). En este caso, el ANOVA de dos vías no reveló interacción significativa entre la dieta x la droga postreactivación [$F(1,38) = 0,89$; $p > 0,05$], pero sí un efecto significativo de la droga postreactivación [$F(1,38) = 29,61$; $p < 0,05$]. El test Tukey indicó que los grupos

tratados con PROP luego de la reactivación mostraron menores niveles de congelamiento durante el test de retención de la memoria que los animales tratados con SAL.

Respecto al comportamiento en el LEC después de la evocación (Fig. 24; D-F), el ANOVA de dos vías indicó que los animales del grupo ETOH-DCS/SAL mostraron una disminución significativa en el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos ($[F(1,38) = 12,84; p < 0,05]$), así como también una reducción en el número de entradas en los mismos ($[F(1,38) = 6,57; p < 0,05]$). En cambio, el grupo ETOH tratado con DCS/PROP exhibió similar porcentaje de tiempo y del número de entradas en los brazos abiertos a los presentados por los grupos CON. La prueba *post hoc* reveló que las ratas ETOH tratadas con DCS/SAL presentan menor número de entradas en los brazos abiertos (Fig. 24E) y menor porcentaje de tiempo de permanencia en los mismos (Fig. 24D) que el resto de los grupos. No se detectó ningún efecto significativo en el número de entradas en los brazos cerrados entre los grupos (Fig. 24F; $[F(1,38) = 0,47; p > 0,05]$).

Según lo revelado en la Fig. 25, e independientemente de las drogas administradas, todos los grupos no sometidos a ninguna reexposición al contexto de condicionamiento mostraron similar porcentaje del tiempo de permanencia en los brazos abiertos (Fig. 25B; $[F(1,24) = 0,38; p > 0,05]$) y número semejante de entradas en los brazos abiertos (Fig. 25C; $[F(1,24) = 0,002; p > 0,05]$) y cerrados (Fig. 25D; $[F(1,24) = 3,67; p > 0,05]$).

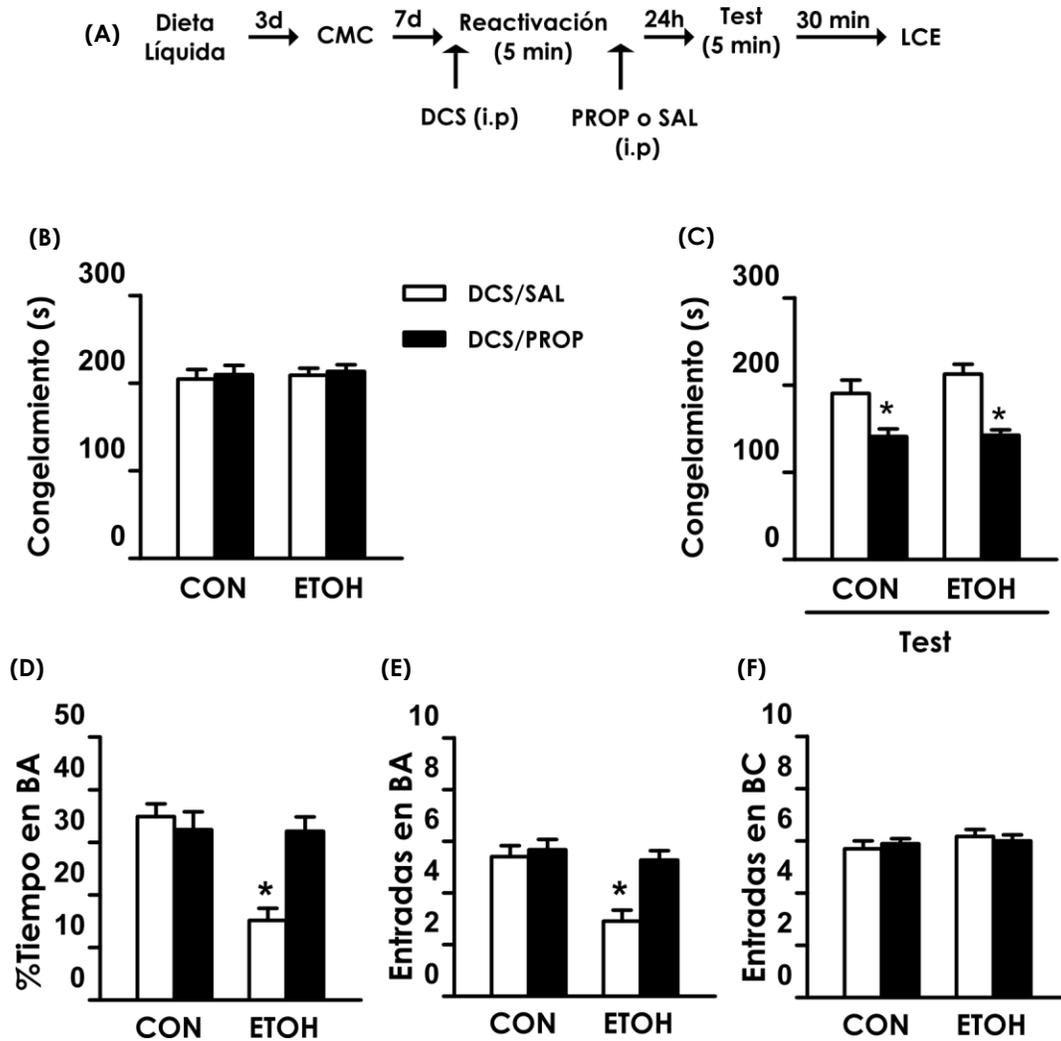


Figura 24. Efecto del bloqueo de la reconsolidación de una memoria de miedo contextual sobre el comportamiento en el LCE en animales ETOH. A- Diseño experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la sesión de reactivación. C- Respuesta de miedo durante el test de retención de la memoria. D, E y F- Comportamiento en el LCE: % de tiempo en los brazos abiertos (BA), número de entradas en los BA y los brazos cerrados (BC), respectivamente. Los datos se muestran como la media ± E.E.M de los parámetros evaluados. (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$.

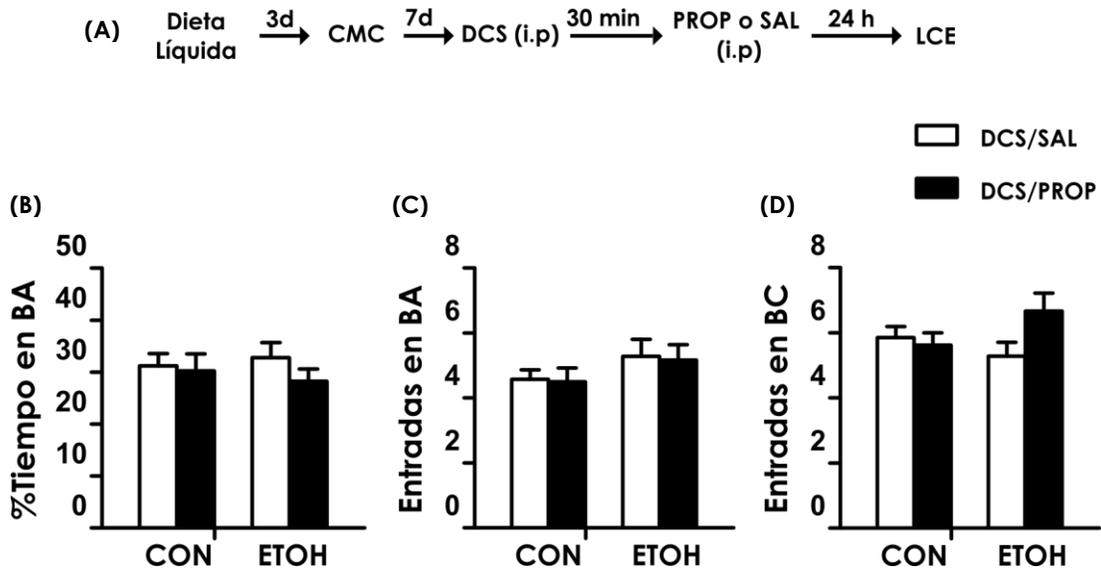


Figura 25. Efecto de de la administración de DCS/PROP sobre el comportamiento en el LCE en animales no reexpuestos al contexto de condicionamiento. A- Diseño experimental. B, C y D- Comportamiento en el LCE: % de tiempo en los brazos abiertos (BA), número de entradas en los BA y los brazos cerrados (BC), respectivamente. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M de los parámetros evaluados.

En conjunto, los resultados obtenidos permiten inferir que el bloqueo de la reconsolidación de una memoria aversiva, evita que el recuerdo subsecuente genere un estado símil-ansigénico en ratas ETOH.

Discusión

Replicando resultados anteriores, los animales reactivados tratados con DCS/PROP mostraron una disminución en los niveles de congelamiento durante el test de retención de la memoria; aunque la respuesta de miedo en la sesión de reactivación fue semejante entre todos los grupos (Figs. 24C y B, respectivamente). Es decir, la memoria aversiva de los animales tratados con DCS/PROP fue interferida por el bloqueo del proceso de reconsolidación, mientras que la traza mnésica original no fue atenuada en las ratas que recibieron DCS/SAL.

En el capítulo anterior se concluyó que a pesar de observarse una elevada expresión de miedo durante la evocación de una memoria aversiva, dicho recuerdo no induce secuelas en la performance en el LCE en ratas CON. Por lo tanto, cabe esperar que al atenuar la traza aversiva por bloqueo de la reconsolidación, el recuerdo subsecuente tampoco altere la respuesta de las ratas CON en LCE. Nuestros resultados confirman dicha hipótesis, debido que a pesar de la diferencia en los niveles de congelamiento durante el test de retención de la memoria entre los grupos CON-DCS/SAL y CON-DCS/PROP, el comportamiento en el LEC fue similar en ambos grupos.

Cabe mencionar que en el protocolo utilizado en los experimentos detallados en este capítulo, los animales fueron sometidos a dos reexposiciones al contexto de condicionamiento previo a la prueba del LEC: la sesión de reactivación y el test de retención de la memoria. En este sentido, diversas investigaciones han observado que reactivaciones repetidas de una memoria aversiva inducen, días o semanas posteriores a la última sesión de reactivación, un comportamiento símil-ansiogénico en roedores (Van Dijken y col., 1992; Pynoos y col., 1996; Louvart y col., 2005; Siegmund y Wotjak, 2007; Hawley y col., 2011; Hawley y col., 2012). Por otro lado, se observó una respuesta ansiolítica en ratones 4 semanas después de una sesión de reactivación (Albrecht y col.,

2013). A simple vista estos hallazgos parecen diferir con los resultados de la presente tesis, donde el recuerdo aversivo no indujo cambios en el comportamiento en el LEC en las ratas CON. La base de estas discrepancias puede ser atribuida a un efecto diferencial de una única sesión frente a sesiones repetidas de reactivación, al tipo de roedores (rata vs ratón) y a los paradigmas utilizados para generar la memoria aversiva, así como también al tiempo transcurrido entre la reactivación de la memoria y la evaluación de la respuesta tipo-ansiedad.

Nuestros resultados indican que los animales del grupo ETOH-DCS/PROP y las ratas CON presentaron un comportamiento similar durante la prueba en el LCE después de la evocación de una memoria de miedo contextual. Es decir, el bloqueo del proceso de reconsolidación previene la respuesta tipo-ansiedad inducida por el recuerdo aversivo en los animales abstinentes. Por lo cual, este hallazgo es el más relevante del presente capítulo. Por otra parte, como era de esperar, cuando la memoria de miedo no fue atenuada por la manipulación farmacológica (DCS/SAL), el recuerdo subsecuente generó una respuesta símil-ansiógena únicamente en las ratas ETOH. Además, dado que todos los grupos no reactivados presentaron una respuesta semejante y comparable con los CON-R en el LCE, se descarta la posibilidad que los efectos encontrados sean influenciados por la inyección de las drogas en sí mismas (Fig. 25).

En base a estos últimos resultados y los encontrados en el capítulo III, resulta interesante diferenciar el efecto de inducir la labilización o de interferir la reconsolidación, sobre las alteraciones emocionales generadas por el recuerdo de una memoria de miedo en los animales ETOH. Anteriormente se estableció que cuando la evocación induce la fase labilización de la memoria por efecto de DCS prereactivación, dicho recuerdo no genera una secuela emocional negativa en los animales ETOH. Por otra parte, los resultados del presente capítulo mostraron que los animales ETOH reactivados que recibieron DCS/SAL evidencian al día siguiente una respuesta símil-ansiógena luego de la evocación de la

memoria de miedo. En conjunto, ambos hallazgos permiten concluir que una única inducción de la labilización de la memoria de miedo, no impide que evocaciones subsecuentes de dicha traza generen una respuesta tipo-ansiedad incrementada en los animales ETOH. De esta manera, el bloqueo del proceso de reconsolidación resulta ser la estrategia más óptima para prevenir a largo plazo la sensibilización emocional inducida por el recuerdo de una memoria de miedo robusta y persistente, como aquella generada durante la abstinencia al etanol.

Resulta importante resaltar que hasta el momento no han sido evaluadas las secuelas “emocionales” luego de la evocación de una memoria de miedo robusta, ni tampoco el efecto del bloqueo de la reconsolidación sobre respuestas comportamentales subsecuentes. Por lo tanto, los resultados presentados en esta tesis brindan dos grandes aportes a la literatura de neurobiología de la memoria: 1) la evocación de una memoria de miedo robusta, como la inducida por la abstinencia al etanol, promueve un estado interno de tipo aversivo, el cual se manifiesta por un aumento de la respuesta tipo-ansiedad; 2) el bloqueo del proceso de reconsolidación no sólo atenúa la respuesta de congelamiento durante la reexposición al contexto de condicionamiento, sino que también reduce el impacto emocional negativo generado por el recuerdo de una memoria de miedo “maladaptativa”.

Capítulo V

Efecto de la evocación de una memoria de miedo contextual sobre la expresión de la subunidad GluN2B de los R-NMDA y de proteínas poliubiquitinadas, y la actividad proteosomal en el ABL en animales abstinentes al etanol.

Fundamento

El modelo molecular de desestabilización de la memoria establece que el remodelado sináptico que caracteriza a dicho proceso involucra un incremento en la proteólisis mediado por actividad del sistema ubiquitina-proteosoma (SUP), de manera dependiente de la actividad de los R-NMDA(GluN2B). Así, mediante la degradación de proteínas de andamiaje (scaffolds proteins) se desencadenaría el rearrreglo de la densidad postsináptica y el intercambio de receptores en superficie, necesarios para la plasticidad neuronal involucrada en el proceso de labilización de una memoria de miedo luego de su recuerdo.

Dadas las evidencias de la presente tesis, que establecen que la abstinencia al etanol induce la generación de una memoria de miedo resistente a la desestabilización después del recuerdo, resultó importante investigar la expresión proteica de los R-NMDA(GluN2B) y la actividad del SUP en el ABL postevocación en animales dependientes al etanol.

El receptor glutamatérgico NMDA es un complejo heterotetramérico formado el ensamble de subunidades GluN1 con subunidades GluN2 (A-D) o con una combinación de subunidades GluN2 y GluN3 (A-B) constituyendo un canal catiónico con alta permeabilidad al Ca^{2+} . La subunidad GluN1 es requerida para el ensamblaje de receptores funcionales y en ella se encuentran sitios de unión a la glicina, mientras que las subunidades GluN2 y GluN3 poseen los sitios de unión al glutamato y modulan las propiedades biofísicas y farmacológicas del receptor (Paoletti y col., 2013). Dado que el proceso de labilización de una memoria aversiva sólo ha sido asociado a la activación de los R-NMDA(GluN2B), en el presente estudio sólo se determinó la expresión proteica de la subunidad GluN2B en el ABL.

Para estudiar la actividad del SUP, se procedió a evaluar la expresión de proteínas poliubiquitinadas totales y la actividad enzimática del proteosoma. Para comprender la razón de tales determinaciones a continuación se describe brevemente el funcionamiento de dicho sistema de degradación proteica (Fig. J). En el proceso de proteólisis mediado por el SUP, inicialmente las proteínas a ser degradadas son marcadas por la unión covalente a una pequeña proteína llamada ubiquitina. Luego, por medio de diferentes enzimas “ubiquitina ligasas”, se agregan más ubiquitinas dando como resultado la formación de una cadena poliubiquitínica. La unión de las moléculas de ubiquitina ocurre a nivel de los residuos de lisina que poseen las mismas. Al grupo amino de esta lisina se puede unir una segunda molécula de ubiquitina y al de ésta una tercera y así sucesivamente hasta formar una cadena de poliubiquitina. La molécula de ubiquitina presenta varios residuos internos de lisina, de los cuales el más importante es el que ocupa la posición 48 (K48); ya que el proteosoma reconocerá las proteínas que posteriormente degradará, cuando la unión entre las ubiquitinas de la cadena esté a nivel del residuo de lisina en la posición 48 (Lys-K48). En esta línea, la expresión de proteínas poliubiquitinadas en Lys-K48 da indicio de la cantidad de proteínas a degradar y por ende, del funcionamiento del SUP. Por otro lado, el proteosoma es un gran complejo proteico que se encarga de degradar las proteínas no necesarias o dañadas que hayan sido poliubiquitinadas, al presentar actividad catalítica intrínseca. Respecto a ello, el proteosoma posee actividad enzimática tipo-quimiotripsina, tipo-tripsina y tipo-peptidil glutamil péptido hidrolasa. En el presente objetivo se examinó la actividad tipo-quimiotripsina para evaluar el funcionamiento del SUP en el proceso de labilización de la memoria (Werner y col., 2015; Jarome y col., 2016).

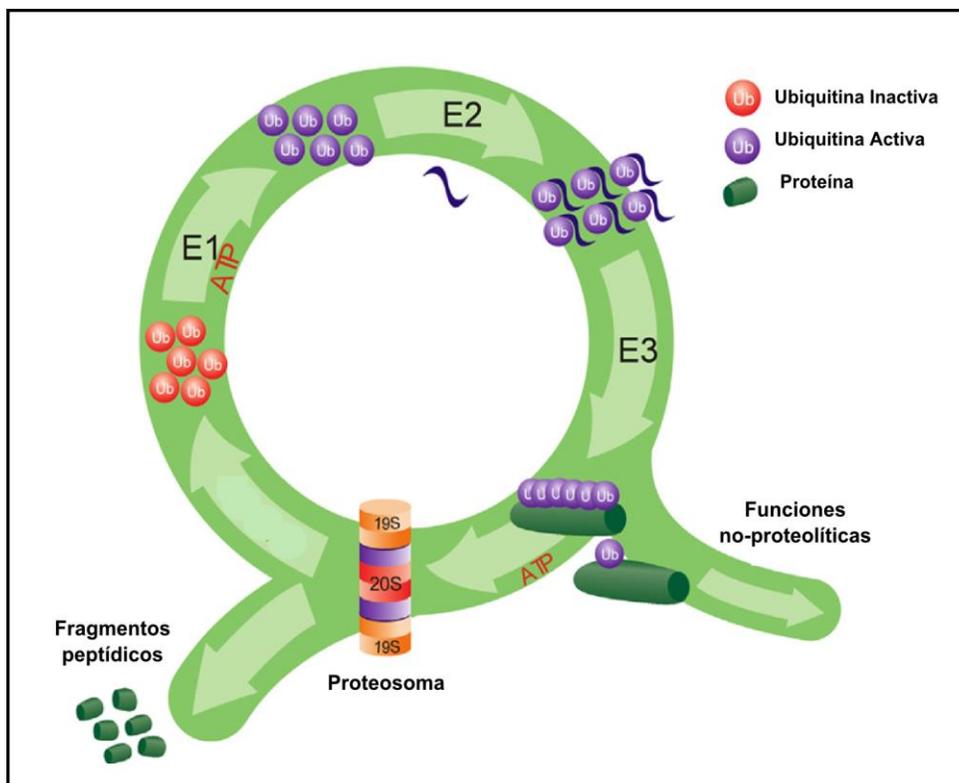


Figura J. Esquema representativo de la actividad del sistema ubiquitina-proteosoma. Abreviaturas: E1, E2, E3: ubiquitinas ligasas. Adaptado de Jarome y Helmstetter, 2013.

Experimento XIII: Efecto de la evocación de una memoria de miedo contextual sobre la expresión de la subunidad GluN2B de los R-NMDA en el ABL en animales abstinentes al etanol.

Procedimiento

Los animales de los grupos CON y ETOH fueron condicionados como se describió previamente en Materiales y Métodos. Siete días más tarde, fueron sometidos a una sesión de reactivación y sacrificados 60 minutos después. Dicho intervalo de tiempo se ha utilizado para evaluar la expresión de GluN2B en distintas fases de la memoria, incluida la reactivación (Leaderbrand y col., 2013; Plattner y col., 2014; Espejo y col., 2016). A fin de adjudicar los posibles efectos a la evocación de la memoria, paralelamente se sacrificaron animales sometidos al mismo protocolo excepto que no fueron sometidos a la sesión de reactivación de la memoria (grupos NR). Luego, se examinó la expresión total de GluN2B en el ABL mediante Western Blot (Materiales y Métodos). Los grupos experimentales fueron: CON-NR (n= 9), CON-R (n= 10), ETOH-NR (n= 9) y ETOH-R (n= 9). Para el análisis estadístico, los factores que se consideraron fueron: dieta (CON vs ETOH) y reactivación (R vs NR). El esquema representativo del diseño experimental se muestra en la Fig. 26A.

Resultados

La Fig. 26B muestra que no hubo diferencias significativas en los niveles de congelamiento durante la sesión de reactivación entre los grupos ($t = 0,10$; $p > 0,05$). Únicamente los animales del grupo CON-R presentaron niveles de expresión de GluN2B elevados (Fig. 26C). Las ratas ETOH reactivadas expresaron niveles de la subunidad en estudio similares a los grupos no reactivados. El ANOVA de dos vías reveló una interacción significativa entre la dieta x reactivación ($[F(1,33) = 7,39$; $p < 0,05$]). La prueba *post hoc* indicó que la

expresión de GluN2B en el ABL fue significativamente mayor en el grupo CON-R en comparación con los grupos restantes.

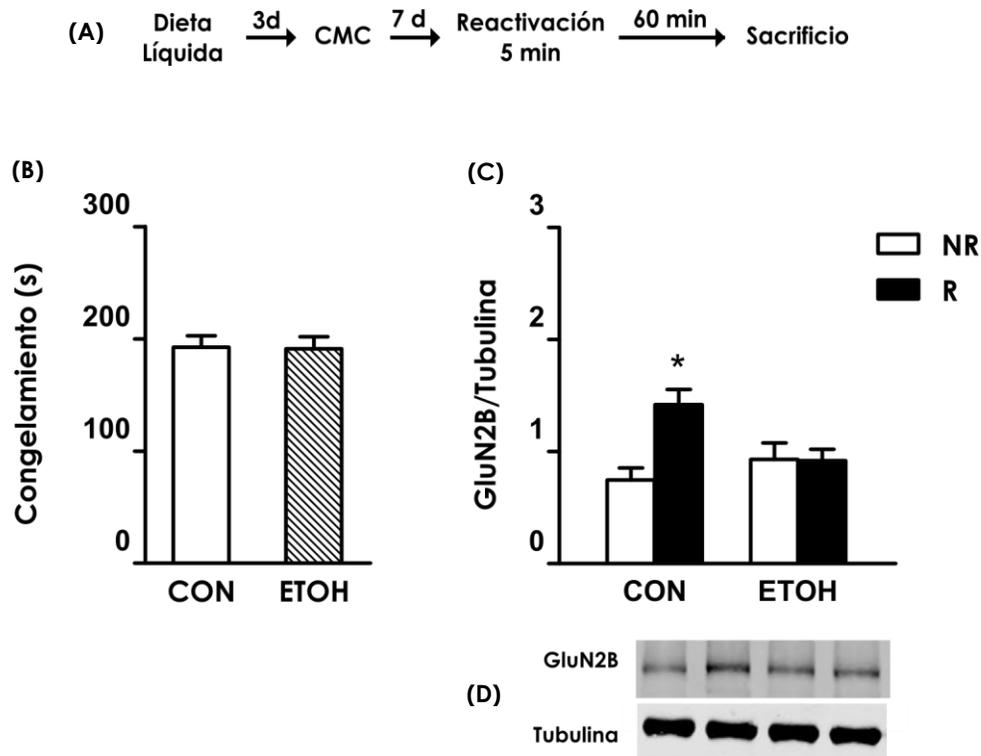


Figura 26. Expresión de la subunidad GluN2B de los R-NMDA en el ABL luego de la evocación de una memoria de miedo contextual en animales ETOH. A- Esquema del diseño experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la sesión de reactivación. C- Expresión de la subunidad GluN2B (referenciada a tubulina) en el ABL. D- Inmunoblots representativos de la expresión de GluN2B y Tubulina. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$.

En conclusión, a diferencia de los animales CON, en los ETOH la evocación de una memoria aversiva contextual no induce un aumento en la expresión de la subunidad GluN2B de R-NMDA en el ABL.

Experimento XIV: Efecto de la evocación de una memoria de miedo en la expresión de proteínas poliubiquitinadas en el ABL en animales abstinentes al etanol.

Procedimiento

Los animales de los grupos CON y ETOH fueron condicionados como se describió previamente en Materiales y Métodos. Siete días más tarde, fueron sometidos a una sesión de reactivación y sacrificados 60 minutos después (Jarome y col., 2011). Paralelamente se sacrificaron animales sometidos al mismo protocolo pero no sujetos a la sesión de reactivación (grupos NR). Luego, se evaluó la expresión de proteínas poliubiquitinadas (PPubq) en Lys-K48 en el ABL mediante Western Blot (Materiales y Métodos). Los grupos experimentales fueron: CON-NR (n= 5), CON-R (n= 6), ETOH-NR (n= 5) y ETOH-R (n= 5). Para el análisis estadístico, los factores que se consideraron fueron: dieta (CON vs ETOH) y reactivación (R vs NR). El diseño experimental se muestra en la Fig. 27A.

Resultados

Una vez más, no hubo diferencias significativas en los niveles de congelamiento durante la sesión de reactivación entre los grupos ($t = -1,23$; $p > 0,05$); Fig. 27B). Únicamente los animales del grupo CON-R mostraron un aumento en la expresión de PPubq en el ABL (Fig. 27C). Las ratas del grupo ETOH-R expresaron niveles de PPubq semejantes a los grupos no reactivados. El ANOVA de dos vías reveló una interacción significativa entre la dieta x reactivación ($[F(1,17) = 9,25$; $p < 0,05]$). La prueba *post hoc* indicó que la expresión de PPubq en el ABL fue significativamente mayor en el grupo CON-R en comparación con los grupos restantes.

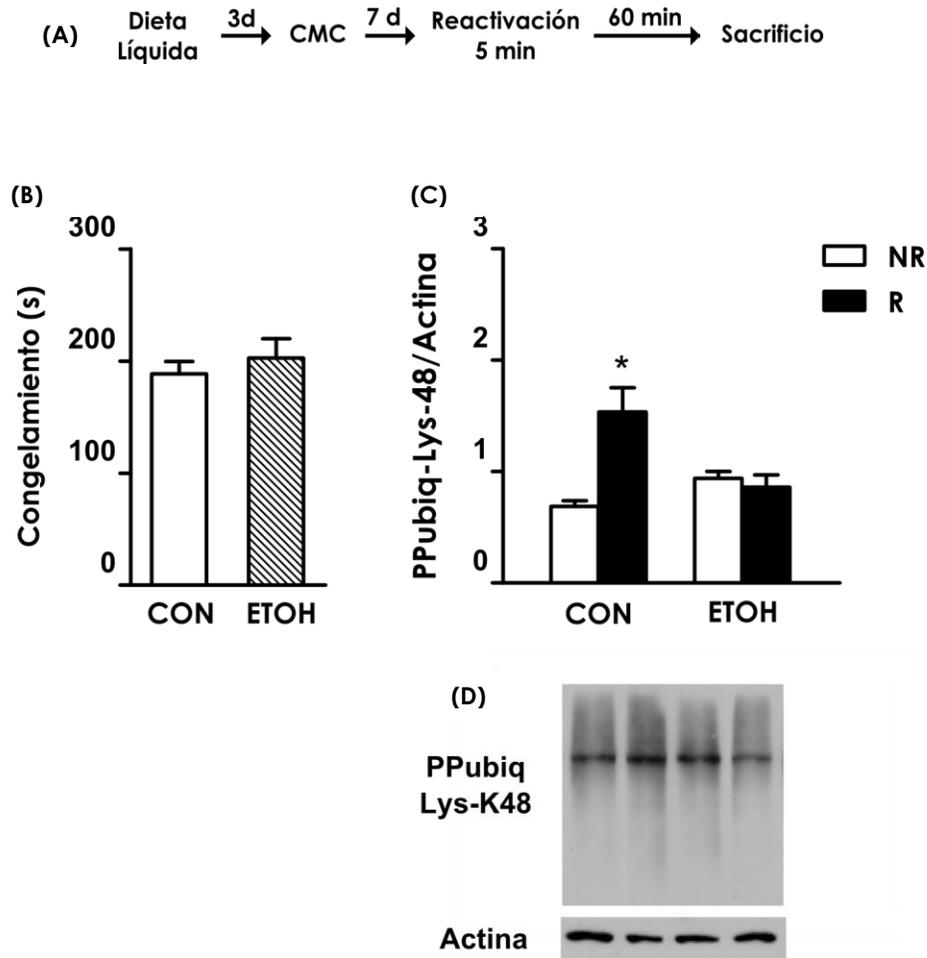


Figura 27. Expresión de PPubiq en el ABL luego de la evocación de una memoria de miedo contextual en animales ETOH. A- Esquema del diseño experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la sesión de reactivación. C- Expresión de PPubiq (referenciada a actina) en el ABL. D- Inmunoblots representativos de cada grupo de los niveles de PPubiq y Actina. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$.

En conclusión, a diferencia de los animales CON, en los ETOH la evocación de una memoria aversiva contextual no induce un aumento en la expresión de proteínas poliubiquitinadas en el ABL.

Experimento XV: Evaluar el efecto de la evocación de una memoria de miedo contextual sobre la actividad del proteosoma en el ABL en animales abstinentes al etanol.

Experimento XV.a: Influencia de la evocación de una memoria de miedo contextual sobre la actividad del proteosoma en el ABL: dinámica temporal.

Fundamento

Debido que no existen estudios en la bibliografía que hayan determinado la dinámica temporal de la actividad del proteosoma después de la evocación de una memoria aversiva contextual, en primera instancia se examinaron los niveles de actividad enzimática proteosómica en el ABL a diferentes tiempos postreactivación en animales CON, a fin de determinar el momento en que potencialmente la evocación de la traza mnésica promueve cambios en la actividad tipo-quimiotripsina del proteosoma.

Procedimiento

Los animales CON fueron condicionados como se describió previamente en Materiales y Métodos. Siete días más tarde, fueron sometidos a una sesión de reactivación y sacrificados 60, 90 y 120 minutos después. A fin de atribuir los posibles efectos a la evocación de la memoria, paralelamente se sacrificaron animales sometidos al mismo protocolo pero que no fueron sometidos a la sesión de reactivación (grupo NR). Posteriormente, se procedió a evaluar la actividad proteosomal en el ABL mediante un ensayo enzimático de fluorescencia (Materiales y Métodos). Los grupos experimentales fueron: NR (n= 12), 60 min (n= 10), 90 min (n= 10) y 120 min (n= 10). El protocolo experimental se muestra en la Fig. 28A.

Resultados

Como puede observarse en la Fig. 28B, se encontró un aumento significativo en la actividad tipo-quimiotripsina del proteosoma en el ABL en el grupo 60 min. El ANOVA de una vía indicó un efecto significativo del tiempo para la actividad del proteosoma ($[F(1,38) = 3,53; p < 0,05]$). El análisis *post hoc* reveló que el grupo 60 min presentó una actividad del proteosoma en el ABL mayor que los grupos NR y 120 min.

(A) Dieta Líquida $\xrightarrow{3d}$ CMC $\xrightarrow{7d}$ Reactivación 5 min \rightarrow Sacrificio: 60/90/120 min post-reactivación

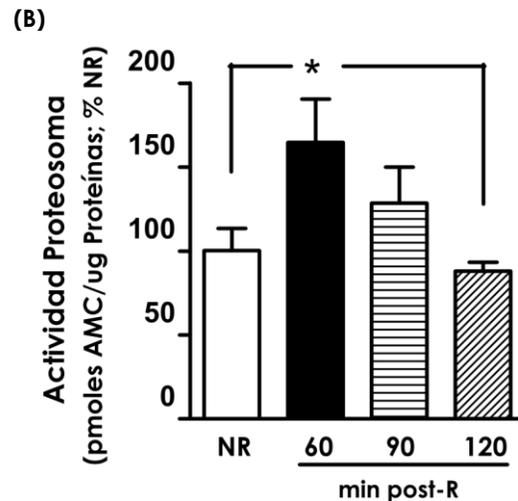


Figura 28. Influencia de la evocación de una memoria de miedo contextual sobre la actividad del proteosoma en el ABL: dinámica temporal. A- Esquema del diseño experimental. B- Actividad tipo-quimiotripsina del proteosoma. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M de la actividad del proteosoma normalizado al valor del grupo NR. (*) Significativamente diferente a los grupos NR y 120 min, $p < 0,05$. NR: no reactivado. Post-R: luego de la reactivación

A partir de este resultado, se determinó que la evocación de una memoria de miedo contextual induce un aumento en la actividad tipo-quimiotripsina del proteosoma en el ABL 60 min luego de la evocación.

Experimento XV.b: Influencia de la evocación de una memoria de miedo contextual sobre la actividad del proteosoma en el ABL en ratas ETOH.

Procedimiento

Los animales de los grupos CON y ETOH fueron condicionados como se describió previamente en Materiales y Métodos. Siete días más tarde, fueron sometidos a una sesión de reactivación y sacrificados 60 minutos después. A fin de atribuir los posibles efectos a la evocación de la memoria, paralelamente se sacrificaron animales sometidos al mismo protocolo solo que no fueron sujetos a la sesión de reactivación (grupos NR). Posteriormente, se investigaron los niveles de actividad enzimática en el ABL mediante un ensayo fluorescente (Materiales y Métodos). Los grupos experimentales fueron: CON-NR (n= 5), CON-R (n= 4), ETOH-NR (n= 4) y ETOH-R (n= 4). Para el análisis estadístico, los factores que se consideraron fueron: dieta (CON vs ETOH) y reactivación (R vs NR). En la Fig. 29A se muestra el esquema del protocolo experimental utilizado.

Resultados

Durante la sesión de reactivación todos los animales mostraron similar respuesta de miedo ($t = -0,62$; $p > 0,05$); Fig. 29B). Como puede observarse, sólo los animales del grupo CON-R presentaron un aumento en la actividad tipo-quimiotripsina del proteosoma (Fig. 29C). Los animales ETOH-R expresaron niveles de actividad similares a los grupos no reactivados. El ANOVA de dos vías reveló una interacción significativa entre la dieta x reactivación ($[F(1,13) = 19,97$; $p < 0,05]$). La prueba *post hoc* indicó que la actividad proteosomal en el ABL fue significativamente mayor en el grupo CON-R en comparación con los grupos restantes.

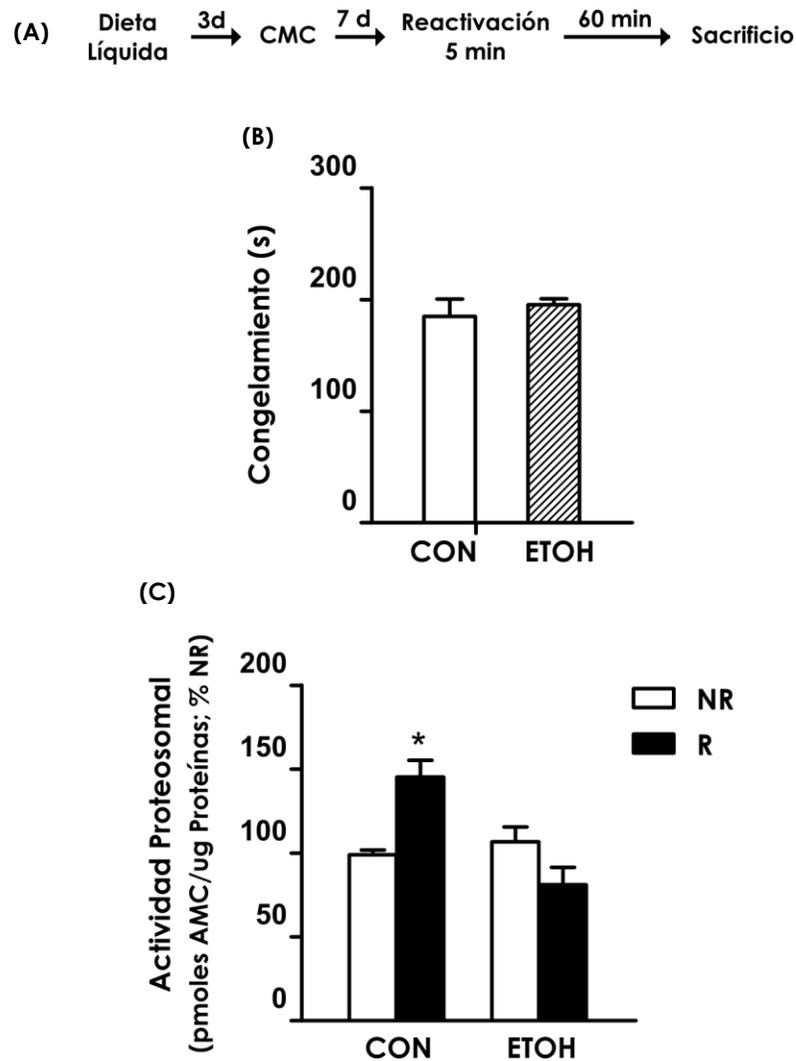


Figura 29. Influencia de la evocación de una memoria de miedo contextual sobre la actividad del proteosoma en el ABL en ratas ETOH. A- Esquema del diseño experimental. B- Respuesta de congelamiento durante la sesión de reactivación. C- Actividad tipo-quimiotripsina del proteosoma. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M de la respuesta de congelamiento y de la actividad del proteosoma (normalizado al valor del grupo CON-NR). (*) Significativamente diferente al resto de los grupos, $p < 0,05$.

En conclusión, a diferencia de los animales CON, en los ETOH la evocación de una memoria aversiva contextual no promueve modificaciones en los niveles de actividad proteosomal en el ABL.

Discusión

Mediante estudios farmacológicos y electrofisiológicos se ha establecido un rol crucial de la activación de los R-NMDA(GluN2B) en el inicio de la fase de labilización de la memoria luego de la evocación (Ben Mamou y col., 2006; Li y col., 2013; Milton y col., 2013). Incluso, se ha indicado que activación de los R-NMDA por la administración de DCS promueve a que memorias resistentes, tales como las formadas bajo condiciones de estrés, elevada actividad noradrenérgica o la abstinencia al etanol, se vuelvan susceptibles a la interferencia después de la evocación (Bustos y col., 2010; Gazarini y col., 2014). Sin embargo, las investigaciones acerca del efecto de la evocación de una memoria de miedo sobre la expresión de la subunidad GluN2B son escasas. En el presente estudio encontramos que la reactivación de una memoria de miedo contextual induce un aumento de dicha subunidad en el ABL en animales CON, mientras que los animales ETOH reactivados y los grupos no reactivados mostraron niveles de expresión reducidos y similares entre sí. Este resultado no puede ser atribuido a una diferencia en los niveles de congelamiento, debido que ambos grupos CON y ETOH reactivados presentaron niveles de respuesta de miedo similares durante la sesión de reactivación. En concordancia con estos hallazgos, Espejo y col. (2016) demostraron que la evocación de una memoria aversiva de tipo contextual genera un incremento de GluN2B en el ABL en ratas CON. Por el contrario, en los animales sometidos a un evento estresante antes del condicionamiento, cuya memoria es resistente al proceso de labilización-reconsolidación, no se observaron cambios en la expresión de GluN2B luego de la evocación. Consecuentemente, ambos estudios permiten sugerir que la reactivación de una memoria de miedo robusta no induce incremento en la expresión de GluN2B en el ABL; lo cual representa, al menos en parte, un correlato molecular de la resiliencia a la interferencia del proceso de reconsolidación que presentan tanto los animales ETOH como los estresados.

Si bien estos trabajos son los únicos que han examinado el efecto de la evocación de una memoria sobre la expresión de los R-NMDA(GluN2B) tanto en trazas mnésicas resistentes como no resistentes; el rol de tal subunidad en la resistencia a la interferencia de una memoria robusta después de la evocación también ha sido evaluada por Wang y col. (2009). Estos autores indicaron que los animales sometidos a un entrenamiento con alta intensidad de descarga eléctrica, presentan niveles disminuidos de GluN2B en el ABL dos días después del entrenamiento. A partir de ello, en el presente estudio podría haberse esperado que los animales ETOH no reactivados presentaran una menor expresión de GluN2B respecto a los CON no reactivados; sin embargo no se encontró tal diferencia. Esta aparente discrepancia puede deberse al tipo de protocolo experimental empleado para generar una memoria de miedo resistente a la labilización (abstinencia al etanol vs entrenamiento intenso), como también al momento en que se evaluó la expresión de la proteína (7 días vs 2 días, postcondicionamiento). A pesar de esta diferencia, los estudios mencionados coinciden en el hecho de que la resistencia al proceso de labilización-reconsolidación de una memoria de miedo, está asociada a una alteración en los niveles de expresión de los R-NMDA(GluN2B) en el ABL.

Por otro lado, si bien existen evidencias que el consumo crónico/abstinencia al etanol induce un aumento de la expresión de los R-NMDA en el hipocampo, la amígdala central y la corteza (Krystal y col., 2003; McCool y col., 2010), los estudios en el ABL son escasos. Así, se ha demostrado que el consumo crónico/abstinencia al etanol no altera la expresión proteica ni los niveles de ARNm de la subunidad GluN2B en el ABL (Floyd y col., 2003; Obara y col., 2009). En este sentido, bajo nuestras condiciones experimentales, tampoco encontramos un incremento de la subunidad GluN2B en el ABL en los animales ETOH. Además, cabe resaltar que en nuestros experimentos evaluamos la expresión de GluN2B en ratas ETOH que previamente fueron sometidas a un condicionamiento de miedo contextual, por lo tanto los resultados observados no pueden ser atribuidos exclusivamente al efecto de la abstinencia al etanol.

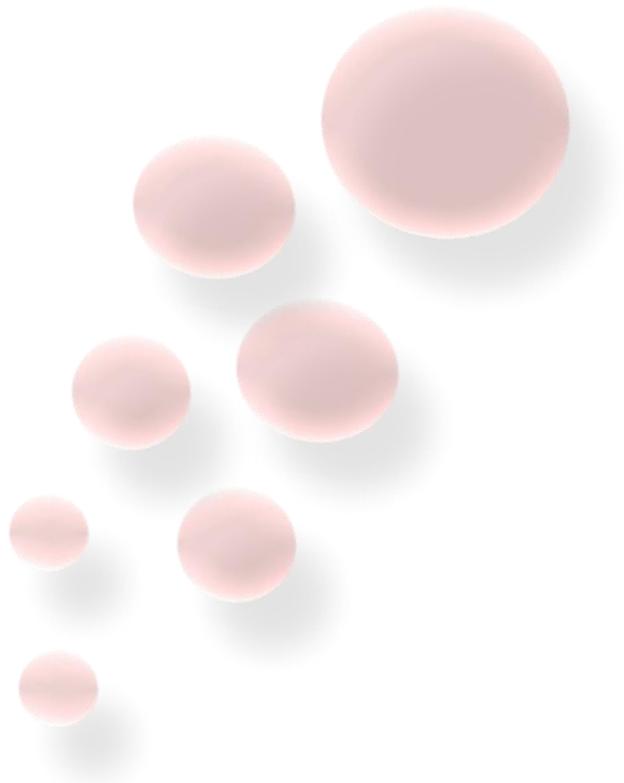
En concordancia con resultados de la bibliografía (Jarome y col. 2011, 2016), encontramos que la evocación de una memoria de miedo induce un incremento en la actividad del SUP en el ABL en ratas CON, indicando así la ocurrencia de la desestabilización de la memoria luego del recuerdo. En esta línea, observamos un aumento en la poliubiquitinación de proteínas y en la actividad enzimática del proteosoma en el ABL en animales CON luego de la reactivación de la memoria de miedo contextual. No obstante, la actividad del SUP no se modificó en los animales ETOH después de la reactivación de una memoria aversiva, ya que no se detectaron diferencias en los niveles de proteínas poliubiquitinadas y la actividad tipo-quimiotripsina entre dichos animales y los grupos no reactivados. Los efectos encontrados fueron dependientes de la sesión de reactivación, pero independientes de los niveles de congelamiento durante dicha reexposición al contexto de condicionamiento. De esta manera, los presentes hallazgos ponen de manifiesto que la abstinencia al etanol promueve a la generación de una memoria aversiva cuya evocación no induce los mecanismos intracelulares implicados en la ocurrencia de la fase de desestabilización; explicando en parte, la resistencia al bloqueo del proceso de reconsolidación que muestran los animales ETOH.

Si bien una serie de trabajos indican que el alcohol altera los procesos de degradación de proteínas mediados por SUP en patologías como la hepatopatía alcohólica (Bardag-Gorce y col., 2011; Osna y col., 2011), las evidencias de los efectos del consumo crónico/abstinencia al etanol sobre la actividad del SUP en el sistema nervioso central son escasas. Por ejemplo, Pla y col., (2014) reportaron una alteración en el funcionamiento del SUP en la corteza cerebral de ratones sometidos a un consumo de etanol durante 4 meses. Sin embargo, dichos hallazgos no son comparables con los resultados de esta tesis ya que en nuestros experimentos se evaluó la actividad del SUP en animales abstinentes sometidos a un condicionamiento de miedo contextual, mientras que en el estudio mencionado dicha evaluación se realizó en animales durante el tratamiento crónico con etanol. Además, las diferencias entre ambos estudios pueden deberse, por ejemplo a: 1)

el protocolo de consumo crónico (dieta líquida vs etanol en el agua de bebida), 2) la duración de dicho consumo (14 días vs 4 meses), 3) las áreas cerebrales donde se evaluó la actividad del SUP (ABL vs corteza cerebral), y la especie animal (ratas vs ratones).

En resumen, en ratas las ETOH la reactivación de una memoria aversiva no induce modificación en los niveles de la subunidad GluN2B de los R-NMDA, de las proteínas poliubiquitinadas ni en la actividad enzimática del proteosoma en el ABL. De esta manera, reafirmando lo demostrado a nivel farmacológico, dicha evidencia molecular refuerza la propuesta que la abstinencia al etanol promueve a la generación de una memoria de miedo contextual resistente al desarrollo del proceso de labilización-reconsolidación luego de su evocación.

DISCUSIÓN GENERAL



En la presente tesis se ha demostrado que la abstinencia al etanol induce la generación de una memoria de miedo contextual resistente al efecto interferente de agentes farmacológicos y no farmacológicos sobre el proceso de reconsolidación. A partir de ello, se puede concluir que una memoria aversiva en animales abstinentes al etanol es resistente a la desestabilización luego de su evocación. Este supuesto fue reforzado por estudios farmacológicos y bioquímicos. En este sentido, considerando que la activación de los R-NMDA es necesaria para desencadenar la fase de labilización después del recuerdo, la administración de DCS previa a la evocación promovió el efecto interferente de PROP y CSA sobre la reconsolidación de la memoria de miedo generada durante la abstinencia al etanol. Además, respecto a los mecanismos moleculares implicados en la ocurrencia de la fase de desestabilización luego de la evocación de la memoria de miedo, nuestros hallazgos indicaron que la evocación de la traza mnésica no indujo cambios en la vía R-NMDA(GluN2B)/SUP en ratas dependientes al etanol. En conjunto, estos resultados permiten explicar, al menos en parte, la resistencia a la interferencia del proceso de reconsolidación de una memoria de miedo contextual que presentan los animales abstinentes al etanol.

El hecho de que la evocación de una memoria, bajo ciertas condiciones, induce una fase de labilización-reconsolidación mediante la cual la traza original puede incorporar nueva información ajustándose a nuevas exigencias ambientales (Nader y col., 2000; Sara, 2000; Dudai, 2002; Lee, 2008); le confiere a la memoria una propiedad flexible y dinámica. Por lo tanto, dado que las ratas ETOH presentan dificultad para la ocurrencia del proceso de labilización-reconsolidación postevocación, puede sugerirse que la abstinencia al etanol induce la formación de una traza mnésica aversiva con capacidad dinámica limitada. En esta línea de razonamiento, se ha determinado previamente que la memoria de miedo generada durante la abstinencia al etanol es robusta y resistente a la extinción (Bertotto y col., 2006). De manera similar, la exposición a un evento estresante previo al condicionamiento genera una memoria de miedo robusta y resistente a la interferencia

después de su evocación (Bustos y col., 2010). También se ha observado que la evocación de dicha traza aversiva en animales estresados no promueve los eventos moleculares involucrados en el desarrollo de la fase de labilización-reconsolidación (Espejo y col., 2016). Además, evidencias de nuestro laboratorio han revelado que la formación de una memoria aversiva robusta inducida por una experiencia estresante o la abstinencia al etanol, está asociada a una desinhibición GABAérgica en el BLA; resultando en la hiperexcitabilidad de dicha estructura (Isoardi et al. 2007). Por lo tanto, proponemos que los cambios originados por la instauración de un estado emocional negativo, como el promovido por la abstinencia al etanol o un evento estresante, modelan la formación de una memoria de miedo menos flexible a la ocurrencia de los fenómenos que pueden ser disparados por la evocación. En otras palabras, el estado emocional presente durante la formación de una traza mnésica aversiva determina la capacidad dinámica de la misma para ajustarse a nuevas exigencias ambientales.

Nuestros hallazgos, en concordancia con evidencias previas (Bustos y col., 2010; Gazarini y col., 2014), demostraron que la administración de DCS prereactivación facilita la ocurrencia del proceso de desestabilización de una memoria de miedo robusta, promoviendo la interferencia de la traza original luego de su evocación. Es decir, DCS permite recuperar la capacidad dinámica de una memoria “traumática”, inducida por estrés o la abstinencia al etanol. En relación a ello, el presente estudio propone que la administración DCS/PROP en combinación con la evocación de la memoria, puede ser un potencial tratamiento para la interferencia de la reconsolidación de una memoria de miedo robusta generada durante la abstinencia al etanol. En esta línea, cabe señalar que tanto la DCS como el PROP son drogas aprobadas para su uso en seres humanos, y que el efecto interferente del PROP sobre la reconsolidación de memorias aversivas y asociadas a drogas se ha demostrado previamente en estudios preclínicos y clínicos (Debiec y LeDoux, 2004; Kindt y col., 2009; Wouda y col., 2010; Saladin y col., 2013). Además, a partir de nuestros resultados podemos sugerir un tratamiento alternativo para interferir la

memoria aversiva original luego de su evocación, mediante el tratamiento DCS/estímulo reforzante positivo. Esta estrategia terapéutica resultaría menos invasiva y evitaría las posibles interacciones farmacológicas que podrían ocurrir con el tratamiento DCS/PROP. Como mencionamos anteriormente, las evidencias parecen indicar que el bloqueo de la reconsolidación de memorias “maladaptativas” mediante las manipulaciones convencionales no resulta efectivo. Por lo que, en base a los hallazgos de la presente tesis, se puede proponer que el tratamiento DCS/PROP o DCS/estímulo reforzante positivo podría ser eficaz para también interferir la reconsolidación de memorias asociadas a drogas y aquellas involucradas en desórdenes psiquiátricos.

Por otro lado, encontramos que la administración de MDZ post-evocación no fue eficiente para interferir la memoria original en ratas ETOH, aún cuando se facilitó la labilización por la administración de DCS previa a la reactivación. De manera similar, se ha reportado que los efectos hipnóticos-sedativos del MDZ están atenuados en pacientes alcohólicos abstinentes (Lingford-Hughes y col., 2005). Es conocido que el consumo crónico/abstinencia al etanol altera la expresión de los R-GABA-A y que el efecto hipnótico-sedativo y amnésico de las benzodiazepinas es mediado por dichos receptores que contienen la subunidad $\alpha 1$. En este sentido, demostramos que la falta de efecto atenuante de MDZ sobre la reconsolidación estaría asociada a una disminución en la expresión total y en superficie de dicha subunidad en el ABL por influencia de la abstinencia al etanol. Diversas investigaciones han demostrado que el consumo crónico de alcohol induce un desacople del receptor en el sitio de unión a benzodiazepinas, impidiendo la expresión de R-GABA-A funcionales (Paredes, 1989). Por otra parte, dado que las benzodiazepinas son moduladores alostéricos positivos de los R-GABA-A, es decir necesitan de la presencia del GABA para ejercer su efecto, no puede descartarse la posibilidad de que la falta de efecto de MDZ también esté relacionada con una disminución en la liberación de GABA en el ABL por efecto de la abstinencia al etanol. En conjunto, este grupo de evidencias, permiten sugerir que la falta de efecto hipnótico-

sedativo y amnésico de MDZ observado en estudios clínicos y preclínicos, podría ser consecuencia de varias alteraciones a nivel de la transmisión GABAérgica inducidas por el consumo crónico/abstinencia al etanol, tales como una disminución en la expresión de la subunidad $\alpha 1$, una reducción en la liberación de GABA o de un desacople del R-GABA-A.

Como se mencionó previamente el ABL es una estructura crucial en el procesamiento y almacenamiento de memorias aversivas, incluido el proceso de labilización-reconsolidación (Baldi y col., 2015). En esta tesis hemos demostrado que el ABL participa en el proceso de reconsolidación de una memoria de miedo robusta generada durante la abstinencia al etanol. Así, la infusión intra-ABL de PROP después de la evocación promovió a la disrupción de la traza original en ratas ETOH pretratadas con DCS. En cierto modo este resultado era de esperar, dado que DCS restablece la capacidad dinámica de la memoria. Respecto a la fase de desestabilización de la memoria, Jarome y col. (2011) han determinado mediante estudios farmacológicos y moleculares que el ABL participa de dicho proceso inducido por la evocación de una memoria de miedo. En esta línea, Espejo y col., (2016) reportaron que la administración intra-ABL de DCS antes de la reactivación facilita el efecto interferente del MDZ en los animales sometidos a una experiencia estresante previa al condicionamiento. Dichos autores proponen que el ABL estaría involucrado en la resistencia a la labilización de una memoria de miedo robusta luego de su evocación. Tal como ya se indicó, la abstinencia al etanol y la experiencia de un evento estresante previo al condicionamiento inducen un estado de hiperexcitabilidad en el ABL, que facilita la generación de memorias de miedo robustas y resistentes al procesamiento postevocación. Por lo tanto, podría esperarse que el ABL esté involucrado en la resistencia a la fase de desestabilización de la memoria aversiva en animales ETOH. El estudio de los mecanismos implicados en la labilización de la memoria aversiva luego de su recuerdo refuerza este supuesto, debido que tanto en los animales ETOH como los estresados, la evocación de la traza no promueve la activación de las vías moleculares en el ABL requeridas para la ocurrencia de la fase de desestabilización (resultados de la presente

tesis; Espejo y col., 2016). En conclusión, ambos trabajos permiten proponer que los cambios inducidos por la instauración de un estado afectivo negativo a nivel del ABL, estarían implicados en la formación de una memoria aversiva “maladaptativa” con capacidad dinámica limitada.

Por otra parte, hemos demostrado que la evocación de una memoria de miedo en los animales ETOH desencadena una sensibilización emocional, evidenciada por un incremento en el comportamiento tipo-ansiedad y en la respuesta de congelamiento en un contexto novedoso. Es decir, el recuerdo de una traza aversiva podría potenciar el estado afectivo negativo instaurado durante la abstinencia al etanol, promoviendo una alteración de las respuestas emocionales en situaciones subsecuentes. Por lo tanto, se puede sugerir que la evocación de una memoria de miedo robusta, como la inducida por la abstinencia al etanol, podría limitar las estrategias comportamentales del animal frente a experiencias futuras.

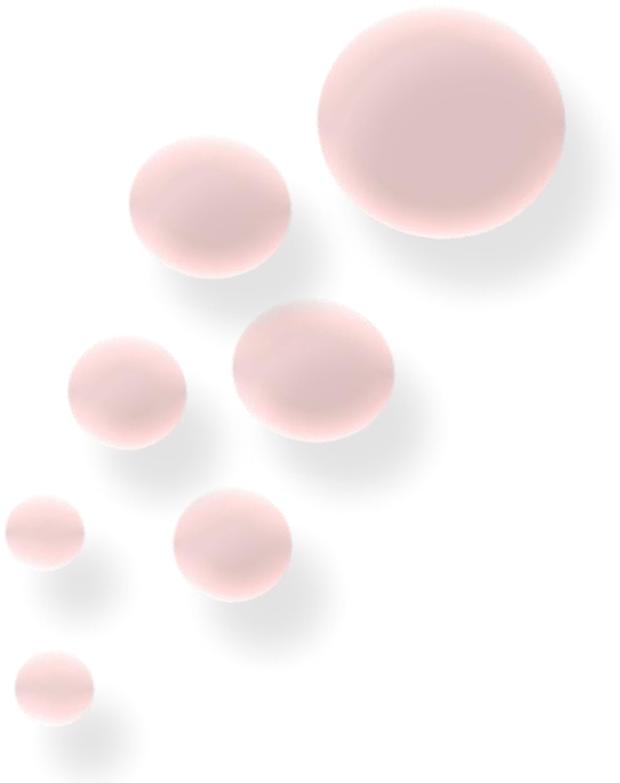
De manera interesante, los hallazgos de esta tesis ponen de manifiesto que las secuelas “emocionales” observadas en los animales ETOH por efecto de la evocación de una memoria de miedo contextual son dependientes de la ocurrencia de la fase de desestabilización de la traza. Es decir, el recuerdo de una memoria aversiva con capacidad dinámica limitada parece inducir alteraciones en la modulación de respuestas emocionales subsecuentes. Por lo tanto, podemos sugerir que la importancia del proceso de labilización no se restringe a permitir acceder y modificar la traza original, sino que su ocurrencia afectaría el modo en que se adapta el animal frente a situaciones posteriores al recuerdo de una memoria de miedo robusta. En conclusión, nuestros resultados permiten proponer un rol funcional a la fase de desestabilización de una memoria aversiva “maladaptativa”, como la inducida por la abstinencia al etanol.

Teniendo en cuenta el papel fundamental de las experiencias emocionales negativas en el desarrollo y mantenimiento de los trastornos psiquiátricos y la drogadicción, uno de los principales resultados de esta tesis sugiere que el bloqueo del proceso de reconsolidación de una memoria de miedo mediante el tratamiento DCS/PROP, además de atenuar la respuesta de miedo condicionado, resulta efectivo para impedir que el recuerdo subsecuente promueva a una respuesta tipo-ansiedad en los animales ETOH. En otras palabras, la interferencia de la reconsolidación de una memoria “traumática” permite reducir el impacto emocional negativo que promueve el recuerdo de dicha traza “maladaptativa”.

En resumen, de acuerdo a la hipótesis inicialmente planteada, el consumo crónico/abstinencia al etanol desencadena alteraciones en los mecanismos neurobiológicos implicados en el proceso de desestabilización de la memoria en el ABL, promoviendo la generación de una memoria aversiva resistente a interferencia del proceso de reconsolidación luego de la evocación. Además, el recuerdo de dicha traza induce la instauración de un estado interno de tipo aversivo (símil-ansiógeno), el cual potencialmente afectaría las propiedades motivacionales del etanol facilitando el consumo subsecuente. Por último, demostramos que el bloqueo del proceso de reconsolidación de una memoria aversiva revierte las secuelas emocionales inducidas por la evocación de dicha traza.

Los hallazgos de la presente tesis permiten contribuir al conocimiento y caracterización de la evocación de una memoria de miedo como un factor involucrado en el mantenimiento de la adicción al alcohol, y además abren el camino para indagar nuevas estrategias con potencialidad terapéutica para el tratamiento del alcoholismo. Por último, nuestras evidencias brindan una base científica para futuras investigaciones que permitan elucidar los mecanismos involucrados en la influencia de memorias “maladaptativas” sobre la persistencia de los desórdenes psiquiátricos y la drogadicción.

BIBLIOGRAFÍA



- Abraham AD, Neve KA, Lattal KM (2014): Dopamine and extinction: a convergence of theory with fear and reward circuitry. *Neurobiol Learn Mem* 108:65-77.
- Agren T, Engman J, Frick A, Bjorkstrand J, Larsson EM, Furmark T, et al (2012): Disruption of reconsolidation erases a fear memory trace in the human amygdala. *Science* 337:1550-1552.
- Alberini CM (2005): Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 28:51-56.
- Albrecht A, Caliskan G, Oitzl MS, Heinemann U, Stork O (2013): Long-lasting increase of corticosterone after fear memory reactivation: anxiolytic effects and network activity modulation in the ventral hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 38:386-394.
- Anton RF, O'Malley SS, Ciraulo DA, Cisler RA, Couper D, Donovan DM, et al (2006): Combined pharmacotherapies and behavioral interventions for alcohol dependence: the combine study: a randomized controlled trial. *JAMA* 295:2003-2017.
- Arguello AA, Hodges MA, Wells AM, Lara H, 3rd, Xie X, Fuchs RA (2014): Involvement of amygdalar protein kinase A, but not calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, in the reconsolidation of cocaine-related contextual memories in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 231:55-65.
- Asociación Americana de Psiquiatría (DSM IV, 1994). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition. American Psychiatric Press. Washington, DC.
- Aufrere G, LeBouris B, Beauge F (1997): Ethanol intake after chronic intoxication by inhalation of ethanol vapor in rats: Behavioral dependence. *Alcohol* 14:247-253.
- Baldi E, Bucherelli C (2015): Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 53:160-190.
- Baldwin HA, Rassnick S, Rivier J, Koob GF, Britton KT (1991): CRF antagonist reverses the "anxiogenic" response to ethanol withdrawal in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 103:227-232.
- Banerjee SP, Sharma VK, Khanna JM (1978): Alterations in beta-adrenergic receptor binding during ethanol withdrawal. *Nature* 276:407-409.
- Baratti CM, Boccia MM, Blake MG, Acosta GB (2008): Reactivated memory of an inhibitory avoidance response in mice is sensitive to a nitric oxide synthase inhibitor. *Neurobiol Learn Mem* 89:426-440.

- Becker HC (1999): Alcohol Withdrawal: Neuroadaptation and Sensitization. In: Neural Mechanisms of the Alcohol Abuse Cycle). *CNS Spectrums*.
- Becker HC (2012): Effects of alcohol dependence and withdrawal on stress responsiveness and alcohol consumption. *Alcohol Res* 34:448-458.
- Ben Mamou C, Gamache K, Nader K (2006): NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nat Neurosci* 9:1237-1239.
- Ben-Yakov A, Dudai Y, Mayford MR (2015): Memory Retrieval in Mice and Men. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7.
- Berardi A, Trezza V, Palmery M, Trabace L, Cuomo V, Campolongo P (2014): An updated animal model capturing both the cognitive and emotional features of post-traumatic stress disorder (PTSD). *Front Behav Neurosci* 8:142.
- Bernardin F, Maheut-Bosser A, Paille F (2014): Cognitive impairments in alcohol-dependent subjects. *Front Psychiatry* 5:78.
- Bertotto ME, Bustos SG, Molina VA, Martijena ID (2006): Influence of ethanol withdrawal on fear memory: Effect of D-cycloserine. *Neuroscience* 142:979-990.
- Bertotto ME, Bussolino DF, Molina VA, Martijena ID (2010): Increased voluntary ethanol consumption and c-Fos expression in selected brain areas induced by fear memory retrieval in ethanol withdrawn rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 20:568-581.
- Bertotto ME, Maldonado NM, Bignante EA, Gorosito SV, Cambiasso MJ, Molina VA, et al (2011): ERK activation in the amygdala and hippocampus induced by fear conditioning in ethanol withdrawn rats: modulation by MK-801. *Eur Neuropsychopharmacol* 21:892-904.
- Besnard A, Caboche J, Laroche S (2012): Reconsolidation of memory: a decade of debate. *Prog Neurobiol* 99:61-80.
- Blanchard RJ, Blanchard DC (1969): Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol* 67:370-375.
- Boccia M, Freudenthal R, Blake M, de la Fuente V, Acosta G, Baratti C, et al (2007): Activation of hippocampal nuclear factor-kappa B by retrieval is required for memory reconsolidation. *J Neurosci* 27:13436-13445.
- Bonin RP, De Koninck Y (2015): Reconsolidation and the regulation of plasticity: moving beyond memory. *Trends Neurosci* 38:336-344.

- Boudreau AC, Milovanovic M, Conrad KL, Nelson C, Ferrario CR, Wolf ME (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.
- Bouton ME (2002): Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biol Psychiatry* 52:976-986.
- Breese GR, Chu K, Dayas CV, Funk D, Knapp DJ, Koob GF, et al (2005): Stress enhancement of craving during sobriety: a risk for relapse. *Alcohol Clin Exp Res* 29:185-195.
- Broadwater M, Spear LP (2013): Consequences of ethanol exposure on cued and contextual fear conditioning and extinction differ depending on timing of exposure during adolescence or adulthood. *Behav Brain Res* 256:10-19.
- Brunet A, Orr SP, Tremblay J, Robertson K, Nader K, Pitman RK (2008): Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder. *J Psychiatr Res* 42:503-506.
- Brunet A, Poundja J, Tremblay J, Bui E, Thomas E, Orr SP, et al (2011): Trauma reactivation under the influence of propranolol decreases posttraumatic stress symptoms and disorder: 3 open-label trials. *J Clin Psychopharmacol* 31:547-550.
- Bustos SG, Giachero M, Maldonado H, Molina VA (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 SG, Maldonado H, Molina VA (2006): Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. *Neuroscience* 139:831-842.
- Bustos SG, Maldonado H, Molina VA (2009): Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology* 34:446-457.
- Cagetti E, Liang J, Spigelman I, Olsen RW (2003): Withdrawal from chronic intermittent ethanol treatment changes subunit composition, reduces synaptic function, and decreases behavioral responses to positive allosteric modulators of GABAA receptors. *Mol Pharmacol* 63:53-64.
- Cain CK, Blouin AM, Barad M (2004): Adrenergic transmission facilitates extinction of conditional fear in mice. *Learn Mem* 11:179-187.
- Camí J, Farré M (2003): Drug addiction. *N Engl J Med* 349:975-986.

- Cappell H, Herman P (1972): Alcohol and tension reduction: a review. *Q J Stud Alcohol* 33:33-64.
- Castaneda R, Cushman P (1989): Alcohol withdrawal: a review of clinical management. *Journal of Clinical Psychiatry* 50:278-284.
- Charney D, Grillon C, Bremner J (1998): The Neurobiological Basis of Anxiety and Fear: Circuits, Mechanisms, and Neurochemical Interactions. *Neuroscientist* 4:35-44.
- Cloninger C (1987): Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism. . *Science* 236:410-416.
- Cox W, Mertz J (1985): Do rats prefer water, near beer, or beer with ethanol?. *Bulletin of the Psychonomic Society* 23:335-338.
- Crawford JP (1978): The anatomy of emotion. *Med Hypotheses* 4:311-323.
- Crestani AP, Zaccouteguy Boos F, Haubrich J, Ordonez Sierra R, Santana F, Molina JM, et al (2015): Memory reconsolidation may be disrupted by a distractor stimulus presented during reactivation. *Sci Rep* 5:13633.
- Cruz AP, Frei F, Graeff FG (1994): Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 49:171-176.
- Das RK, Lawn W, Kamboj SK (2015): Rewriting the valuation and salience of alcohol-related stimuli via memory reconsolidation. *Transl Psychiatry* 5:e645.
- Davis M (1992): The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci* 15:353-375.
- Davis M (1997): Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9:382-402.
- Davis M, Rainnie D, Cassell M (1994): Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci* 17:208-214.
- Davis M, Whalen PJ (2001): The amygdala: vigilance and emotion. *Mol Psychiatry* 6:13-34.
- De Oliveira Alvares L, Crestani AP, Cassini LF, Haubrich J, Santana F, Quillfeldt JA (2013): Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience* 244:42-48.
- De Soto C, O'Donnell W, De Soto J (1989): Long-term recovery in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 13:693-697.
- De Witte P, Pinto E, Anseau M, Verbanck P (2003): Alcohol and withdrawal: from animal research to clinical issues. *Neurosci Biobehav Rev* 27:189-197.

- Debiec J, Bush DE, LeDoux JE (2011): Noradrenergic enhancement of reconsolidation in the amygdala impairs extinction of conditioned fear in rats--a possible mechanism for the persistence of traumatic memories in PTSD. *Depress Anxiety* 28:186-193.
- Debiec J, Doyere V, Nader K, Ledoux JE (2006): Directly reactivated, but not indirectly reactivated, memories undergo reconsolidation in the amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3428-3433.
- Debiec J, Ledoux JE (2004): Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. *Neuroscience* 129:267-272.
- Devaud LL, Purdy RH, Finn DA, Morrow AL (1996): Sensitization of gamma-aminobutyric acidA receptors to neuroactive steroids in rats during ethanol withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther* 278:510-517.
- Diaz MR, Christian DT, Anderson NJ, McCool BA (2011): Chronic ethanol and withdrawal differentially modulate lateral/basolateral amygdala paracapsular and local GABAergic synapses. *J Pharmacol Exp Ther* 337:162-170.
- Diaz-Mataix L, Debiec J, LeDoux JE, Doyere V (2011): Sensory-specific associations stored in the lateral amygdala allow for selective alteration of fear memories. *J Neurosci* 31:9538-9543.
- Diaz-Mataix L, Ruiz Martinez RC, Schafe GE, LeDoux JE, Doyere V (2013): Detection of a temporal error triggers reconsolidation of amygdala-dependent memories. *Curr Biol* 23:467-472.
- Doyere V, Debiec J, Monfils MH, Schafe GE, LeDoux JE (2007): Synapse-specific reconsolidation of distinct fear memories in the lateral amygdala. *Nat Neurosci* 10:414-416.
- Dudai Y (2002): Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol* 12:211-216.
- Dudai Y (2002): *Memory from A to Z : keywords, concepts, and beyond*. Oxford, UK. ; New York: Oxford University Press.
- Dudai Y (2006): Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Curr Opin Neurobiol* 16:174-178.
- Dudai Y, Eisenberg M (2004): Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44:93-100.
- Duvarci S, Nader K, LeDoux JE (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.

- Eisenberg M, Kobil T, Berman DE, Dudai Y (2003): Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science* 301:1102-1104.
- Espejo PJ, Ortiz V, Martijena ID, Molina VA (2016): Stress-induced resistance to the fear memory labilization/reconsolidation process. Involvement of the basolateral amygdala complex. *Neuropharmacology* 109:349-356.
- Fanselow MS (1998): Pavlovian conditioning, negative feedback, and blocking: mechanisms that regulate association formation. *Neuron* 20:625-627.
- Fendt M (2001): Injections of the NMDA receptor antagonist aminophosphonopentanoic acid into the lateral nucleus of the amygdala block the expression of fear-potentiated startle and freezing. *J Neurosci* 21:4111-4115.
- Ferrer Monti RI, Giachero M, Alfei JM, Bueno AM, Cuadra G, Molina VA (2016): An appetitive experience after fear memory destabilization attenuates fear retention: involvement GluN2B-NMDA receptors in the Basolateral Amygdala Complex. *Learn Mem* 23:465-478.
- Finnie PS, Nader K (2012): The role of metaplasticity mechanisms in regulating memory destabilization and reconsolidation. *Neurosci Biobehav Rev* 36:1667-1707.
- Floyd DW, Friedman DP, Daunais JB, Pierre PJ, Grant KA, McCool BA (2004): Long-term ethanol self-administration by cynomolgus macaques alters the pharmacology and expression of GABAA receptors in basolateral amygdala. *J Pharmacol Exp Ther* 311:1071-1079.
- Floyd DW, Jung KY, McCool BA (2003): Chronic ethanol ingestion facilitates N-methyl-D-aspartate receptor function and expression in rat lateral/basolateral amygdala neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 307:1020-1029.
- Font L, Cunningham CL (2012): Post-retrieval propranolol treatment does not modulate reconsolidation or extinction of ethanol-induced conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav* 101:222-230.
- Fox HC, Bergquist KL, Hong KI, Sinha R (2007): Stress-induced and alcohol cue-induced craving in recently abstinent alcohol-dependent individuals. *Alcohol Clin Exp Res* 31:395-403.
- Frankland PW, Ding HK, Takahashi E, Suzuki A, Kida S, Silva AJ (2006): Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learn Mem* 13:451-457.

- Fustiñana MS, 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.
- Gallate JE, Morley KC, Ambermoon P, McGregor IS (2003): The consequences of beer consumption in rats: acute anxiolytic and ataxic effects and withdrawal-induced anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* 166:51-60.
- Gazarini L, Stern CA, Piornedo RR, Takahashi RN, Bertoglio LJ (2014): PTSD-like memory generated through enhanced noradrenergic activity is mitigated by a dual step pharmacological intervention targeting its reconsolidation. *Int J Neuropsychopharmacol* 18.
- George DT, Gilman J, Hersh J, Thorsell A, Herion D, Geyer C, et al (2008): Neurokinin 1 receptor antagonism as a possible therapy for alcoholism. *Science* 319:1536-1539.
- Giachero M, Bustos SG, Calfa G, Molina VA (2013): 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.
- Gilman JM, Hommer DW (2008): Modulation of brain response to emotional images by alcohol cues in alcohol-dependent patients. *Addict Biol* 13:423-434.
- Gilpin NW, Koob GF (2010): Effects of beta-adrenoceptor antagonists on alcohol drinking by alcohol-dependent rats. *Psychopharmacology (Berl)* 212:431-439.
- Hall J, Thomas KL, Everitt BJ (2001): 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.
- Handley SL, McBlane JW (1993): An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods* 29:129-138.
- Haubrich J, Crestani AP, Cassini LF, Santana F, Sierra RO, Alvares Lde O, et al (2015): Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. *Neuropsychopharmacology* 40:315-326.
- Hawley W, Grissom E, Keskitalo L, Hastings T, Dohanich G (2011): Sexual motivation and anxiety-like behaviors of male rats after exposure to a trauma followed by situational reminders. *Physiol Behav* 102:181-187.

- Hawley WR, Grissom EM, Patel JM, Hodges KS, Dohanich GP (2013): Reactivation of an aversive memory modulates learning strategy preference in male rats. *Stress* 16:73-86.
- Heilig M, Egli M, Crabbe JC, Becker HC (2010): Acute withdrawal, protracted abstinence and negative affect in alcoholism: are they linked? *Addict Biol* 15:169-184.
- Heldt SA, Ressler KJ (2007): Training-induced changes in the expression of GABAA-associated genes in the amygdala after the acquisition and extinction of Pavlovian fear. *Eur J Neurosci* 26:3631-3644.
- Hoffman AN, Parga A, Paode PR, Watterson LR, Nikulina EM, Hammer RP, Jr., et al (2015): Chronic stress enhanced fear memories are associated with increased amygdala zif268 mRNA expression and are resistant to reconsolidation. *Neurobiol Learn Mem* 120:61-68.
- Holdstock L, de Wit H (1998): Individual differences in the biphasic effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 22:1903-1911.
- Holmes A, Fitzgerald PJ, MacPherson KP, DeBrouse L, Colacicco G, Flynn SM, et al (2012): Chronic alcohol remodels prefrontal neurons and disrupts NMDAR-mediated fear extinction encoding. *Nat Neurosci* 15:1359-1361.
- Holmes A, Spanagel R, Krystal JH (2013): Glutamatergic targets for new alcohol medications. *Psychopharmacology (Berl)* 229:539-554.
- Hong I, Kim J, Lee S, Ko HG, Nader K, Kaang BK, et al (2013): AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:8218-8223.
- Isoardi NA, Bertotto ME, Martijena ID, Molina VA, Carrer HF (2007): Lack of feedback inhibition on rat basolateral amygdala following stress or withdrawal from sedative-hypnotic drugs. *Eur J Neurosci* 26:1036-1044.
- Iwata J, LeDoux JE, Meeley MP, Arneric S, Reis DJ (1986): Intrinsic neurons in the amygdaloid field projected to by the medial geniculate body mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. *Brain Res* 383:195-214.
- James W (1890): *The principles of psychology*. Henry Holt, New York, NY.
- Jarome TJ (2013): The role of a CaMKII/PKA-protein degradation-GluR2 pathway in the control of memory updating following retrieval. *University of Wisconsin-Milwaukee Theses and Dissertations*. Paper 232.

- Jarome TJ, Ferrara NC, Kwapis JL, Helmstetter FJ (2016): CaMKII regulates proteasome phosphorylation and activity and promotes memory destabilization following retrieval. *Neurobiol Learn Mem* 128:103-109.
- Jarome TJ, Helmstetter FJ (2013): The ubiquitin-proteasome system as a critical regulator of synaptic plasticity and long-term memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 105:107-116.
- Jarome TJ, Kwapis JL, Werner CT, Parsons RG, Gafford GM, Helmstetter FJ (2012): The timing of multiple retrieval events can alter GluR1 phosphorylation and the requirement for protein synthesis in fear memory reconsolidation. *Learn Mem* 19:300-306.
- Jarome TJ, Werner CT, Kwapis JL, Helmstetter FJ (2011): Activity dependent protein degradation is critical for the formation and stability of fear memory in the amygdala. *PLoS One* 6:e24349.
- Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE, LeDoux JE (2011): Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell* 147:509-524.
- Kalev-Zylinska ML, During MJ (2007): Paradoxical facilitatory effect of low-dose alcohol consumption on memory mediated by NMDA receptors. *J Neurosci* 27:10456-10467.
- Kalivas PW, O'Brien C (2008): Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* 33:166-180.
- Kandel ER (2001): The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294:1030-1038.
- Kapp BS, Whalen PJ, Supple WF, Pascoe JP, Aggleton JP (1992): Amygdaloid contributions to conditioned arousal and sensory information processing. In: *The amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction*. New York, NY, US: Wiley-Liss.
- Kindt M, Soeter M, Vervliet B (2009): Beyond extinction: erasing human fear responses and preventing the return of fear. *Nat Neurosci* 12:256-258.
- Koob GF (1996): Drug addiction: the yin and yang of hedonic homeostasis. *Neuron* 16:893-896.
- Koob GF (2000): Neurobiology of addiction. Toward the development of new therapies. *Ann N Y Acad Sci* 909:170-185.
- Koob GF (2008): A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* 59:11-34.
- Koob GF, Le Moal M (2001): Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24:97-129.
- Koob GF, Volkow N (2010): Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35:217-238.

- Korte SM, De Boer SF, Bohus B (1999): Fear-potential in the elevated plus-maze test depends on stressor controllability and fear conditioning. *Stress* 3:27-40.
- Korte SM, De Boer SF (2003): A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur J Pharmacol* 463:163-175.
- Kritman M, Maroun M (2013): Inhibition of the PI3 kinase cascade in corticolimbic circuit: temporal and differential effects on contextual fear and extinction. *Int J Neuropsychopharmacol* 16:825-833.
- Krystal JH, Petrakis IL, Mason G, Trevisan L, D'Souza DC (2003): N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and alcoholism: reward, dependence, treatment, and vulnerability. *Pharmacol Ther* 99:79-94.
- Kumar S, Porcu P, Werner DF, Matthews DB, Diaz-Granados JL, Helfand RS, et al (2009): The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacology (Berl)* 205:529-564.
- Kuriyama K, Muramatsu M, Aiso M, Ueno E (1981): Alteration in beta-adrenergic receptor binding in brain, lung and heart during morphine and alcohol dependence and withdrawal. *Neuropharmacology* 20:659-666.
- Leaderbrand K, Corcoran KA, Radulovic J (2013): Co-activation of NR2A and NR2B subunits induces resistance to fear extinction. *Neurobiol Learn Mem* 113:35-40.
- LeDoux JE (1993): Emotional memory systems in the brain. *Behav Brain Res* 58:69-79.
- LeDoux JE (1995): Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol* 46:209-235.
- LeDoux JE (2000): Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.
- LeDoux JE (2007): The amygdala. *Curr Biol* 17:R868-874.
- LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM (1990): The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci* 10:1062-1069.
- Lee JL (2010): Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Front Behav Neurosci* 4:168.
- Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL (2004): Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304:839-843.
- Lee JL, Hynds RE (2013): Divergent cellular pathways of hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Hippocampus* 23:233-244.

- Lee JL, Milton AL, Everitt BJ (2006): Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *J Neurosci* 26:10051-10056.
- Lee SH, Choi JH, Lee N, Lee HR, Kim JI, Yu NK, et al (2008): Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science* 319:1253-1256.
- Lewis DJ (1979): Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol Bull* 86:1054-1083.
- Lewis DJ, Bregman NJ, Mahan JJ, Jr. (1972): Cue-dependent amnesia in rats. *J Comp Physiol Psychol* 81:243-247.
- Li Y, Meloni EG, Carlezon WA, Jr., Milad MR, Pitman RK, Nader K, et al (2013): Learning and reconsolidation implicate different synaptic mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:4798-4803.
- Liang J, Zhang N, Cagetti E, Houser CR, Olsen RW, Spigelman I (2006): Chronic intermittent ethanol-induced switch of ethanol actions from extrasynaptic to synaptic hippocampal GABAA receptors. *J Neurosci* 26:1749-1758.
- Lim S, Vos T, Flaxman A, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, et al (2012): A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380:2224–2260.
- Lindemeyer AK, Liang J, Marty VN, Meyer EM, Suryanarayanan A, Olsen RW, et al (2014): Ethanol-induced plasticity of GABAA receptors in the basolateral amygdala. *Neurochem Res* 39:1162-1170.
- Lopez JF, Akil H, Watson SJ (1999): Neural circuits mediating stress. *Biol Psychiatry* 46:1461-1471.
- Lorenzo P, Ladera J, Leza J, Lizasoain I (1998): Drogodependencias. *Editorial Panamericana*.
- Louvar H, Maccari S, Ducrocq F, Thomas P, Darnaudery M (2005): Long-term behavioural alterations in female rats after a single intense footshock followed by situational reminders. *Psychoneuroendocrinology* 30:316-324.
- Maclean RR, Datta S (2007): The relationship between anxiety and sleep-wake behavior after stressor exposure in the rat. *Brain Res* 1164:72-80.
- Maddox SA, Schafe GE (2011): Epigenetic alterations in the lateral amygdala are required for reconsolidation of a Pavlovian fear memory. *Learn Mem* 18:579-593.

- Maddox SA, Watts CS, Schafe GE (2013): p300/CBP histone acetyltransferase activity is required for newly acquired and reactivated fear memories in the lateral amygdala. *Learn Mem* 20:109-119.
- Makkar SR, Zhang SQ, Cranney J (2010): Behavioral and neural analysis of GABA in the acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of fear memory. *Neuropsychopharmacology* 35:1625-1652.
- Maldonado H (2008): La memoria animal. Buenos Aires. *Eudeba*.
- Mamiya N, Fukushima H, Suzuki A, Matsuyama Z, Homma S, Frankland PW, et al (2009): Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *J Neurosci* 29:402-413.
- Mao SC, Lin HC, Gean PW (2008): Augmentation of fear extinction by D-cycloserine is blocked by proteasome inhibitors. *Neuropsychopharmacology* 33:3085-3095.
- Maren S (1999): Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *Trends Neurosci* 22:561-567.
- Maren S (2001): Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* 24:897-931.
- Maren S (2005): Building and burying fear memories in the brain. *Neuroscientist* 11:89-99.
- Markou A, Kosten TR, Koob GF (1998): Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology* 18:135-174.
- Martijena ID, Lacerra C, Bustos SG, Molina VA (2001): Chronic benzodiazepine administration facilitates the subsequent development of ethanol dependence. *Brain Res* 891:236-246.
- McCool BA, Christian DT, Diaz MR, Lack AK (2010): Glutamate plasticity in the drunken amygdala: the making of an anxious synapse. *Int Rev Neurobiol* 91:205-233.
- McCool BA, Frye GD, Pulido MD, Botting SK (2003): Effects of chronic ethanol consumption on rat GABA(A) and strychnine-sensitive glycine receptors expressed by lateral/basolateral amygdala neurons. *Brain Res* 963:165-177.
- McDonald AJ, Mascagni F (2004): Parvalbumin-containing interneurons in the basolateral amygdala express high levels of the alpha1 subunit of the GABAA receptor. *J Comp Neurol* 473:137-146.
- McEwen BS (2003): Mood disorders and allostatic load. *Biol Psychiatry* 54:200-207.

- McGaugh JL (1983): Preserving the presence of the past. Hormonal influences on memory storage. *Am Psychol* 38:161-174.
- McGaugh JL (2000): Memory--a century of consolidation. *Science* 287:248-251.
- 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.
- Metten P, Crabbe J (1996): Dependence and withdrawal. Pharmacological effects of ethanol on the nervous system (Deitrich RA, Erwin VG, eds), pp 269-290. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Milad MR, Quirk GJ Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annu Rev Psychol* 63:129-151.
- Milekic MH, Alberini CM (2002): Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron* 36:521-525.
- Miller WR, Harris RJ (2000): A simple scale of Gorski's warning signs for relapse. *J Stud Alcohol* 61:759-765.
- Milton AL, Everitt BJ (2012): The persistence of maladaptive memory: addiction, drug memories and anti-relapse treatments. *Neurosci Biobehav Rev* 36:1119-1139.
- Milton AL, Merlo E, Ratano P, Gregory BL, Dumbreck JK, Everitt BJ (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 JR, Miller RR, Lewis DJ (1968): Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 160:554-555.
- Mohler H, Fritschy JM, Rudolph U (2002): A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 300:2-8.
- Monfils MH, Cowansage KK, Klann E, LeDoux JE (2009): Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. *Science* 324:951-955.
- Mossberg D, Liljeberg P, Borg S (1985): Clinical conditions in alcoholics during long-term abstinence: a descriptive, longitudinal treatment study. *Alcohol* 2:551-553.
- Motanis H, Maroun M (2012): Differential involvement of protein synthesis and actin rearrangement in the reacquisition of contextual fear conditioning. *Hippocampus* 22:494-500.
- Muravieva EV, Alberini CM (2010): Limited efficacy of propranolol on the reconsolidation of fear memories. *Learn Mem* 17:306-313.

- Myers KM, Davis M (2002): Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* 36:567-584.
- Nader K, Hardt O (2009): A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 10:224-234.
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE (2000): Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722-726.
- Nestler E, Hyman S, Malenka R (2001): Mood and Emotion. En: Molecular Neuropharmacology. A foundation for clinical neuroscience. The McGraw-Hill Companies, New York, pp, 327-354.
- Obara I, Bell RL, Goulding SP, Reyes CM, Larson LA, Ary AW, et al (2009): Differential effects of chronic ethanol consumption and withdrawal on homer/glutamate receptor expression in subregions of the accumbens and amygdala of P rats. *Alcohol Clin Exp Res* 33:1924-1934.
- Orru A, Lobina C, Maccioni P, Gessa GL, Carai MA, Colombo G (2007): Repeated exposure to alcoholic beer does not induce long-lasting changes in alcohol self-administration and intake in Sardinian alcohol-preferring and Sardinian non-preferring rats. *Alcohol Alcohol* 42:513-524.
- Osona NA (2011): An annual topic highlight: alcohol and liver, 2011. *World J Gastroenterol* 17:2455.
- Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013): NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14:383-400.
- Papadeas S, Grobin AC, Morrow AL (2001): Chronic ethanol consumption differentially alters GABA(A) receptor alpha1 and alpha4 subunit peptide expression and GABA(A) receptor-mediated $^{36}Cl^{-}$ uptake in mesocorticolimbic regions of rat brain. *Alcohol Clin Exp Res* 25:1270-1275.
- Paredes A (1989): Benzodiazepine in the treatment of alcoholism. In: Recent development in alcoholism: treatment research (Vol: 7). *Plenum Press, New York and London*.
- Pare D, Quirk GJ, Ledoux JE (2004): New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiol* 92:1-9.
- Paxinos G, Watson C (2009): The rat brain in stereotaxic coordinates: 6th edition. *San Diego: Academic Press*.
- Pedreira ME, Maldonado H (2003): Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* 38:863-869.
- Pedreira ME, Perez-Cuesta LM, Maldonado H (2004): Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction. *Learn Mem* 11:579-585.

- Pellow S, File SE (1986): Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 24:525-529.
- Pittenger C, Duman RS (2008): Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:88-109.
- Pla A, Pascual M, Renau-Piqueras J, Guerri C (2014): TLR4 mediates the impairment of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways induced by ethanol treatment in brain. *Cell Death Dis* 5:e1066.
- Plattner F, Hernandez A, Kistler TM, Pozo K, Zhong P, Yuen EY, et al (2014): Memory enhancement by targeting Cdk5 regulation of NR2B. *Neuron* 81:1070-1083.
- Ploski JE, Monsey MS, Nguyen T, DiLeone RJ, Schafe GE (2011): The neuronal PAS domain protein 4 (Npas4) is required for new and reactivated fear memories. *PLoS One* 6:e23760.
- Pohorecky L, Brick J (1990): Pharmacology of ethanol. In: Psychotropic drugs of abuse. *Pergamon Press*.
- Pynoos RS, Ritzmann RF, Steinberg AM, Goenjian A, Prisecaru I (1996): A behavioral animal model of posttraumatic stress disorder featuring repeated exposure to situational reminders. *Biol Psychiatry* 39:129-134.
- Quiñones-Laracuenta K, Hernandez-Rodriguez MY, Bravo-Rivera C, Melendez RI, Quirk GJ (2013): The effect of repeated exposure to ethanol on pre-existing fear memories in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 232:3615-3622.
- Quirk GJ, Pare D, Richardson R, Herry C, Monfils MH, Schiller D, et al (2010): Erasing fear memories with extinction training. *J Neurosci* 30:14993-14997.
- Rasmussen DD, Mitton DR, Green J, Puchalski S (2001): Chronic daily ethanol and withdrawal: 2. Behavioral changes during prolonged abstinence. *Alcohol Clin Exp Res* 25:999-1005.
- Rehberg K, Bergado-Acosta JR, Koch JC, Stork O (2010): Disruption of fear memory consolidation and reconsolidation by actin filament arrest in the basolateral amygdala. *Neurobiol Learn Mem* 94:117-126.
- Richardson R, Riccio DC, Jamis M, Cabosky J, Skoczen T (1982): Modification of reactivated memory through "counterconditioning". *Am J Psychol* 95:67-84.

- Rimondini R, Arlinde C, Sommer W, Heilig M (2002): Long-lasting increase in voluntary ethanol consumption and transcriptional regulation in the rat brain after intermittent exposure to alcohol. *FASEB J* 16:27-35.
- Robinson MJ, Armson M, Franklin KB (2011): The effect of propranolol and midazolam on the reconsolidation of a morphine place preference in chronically treated rats. *Front Behav Neurosci* 5:42.
- Rodgers RJ, Cole JC (1994): The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In *Ethology and Psychopharmacology* (ed. Cooper S. J. and Hendrie C. A.), pp. 9-44. John Wiley and Sons Ltd., New York.
- Rodriguez-Ortiz C, De la Cruz V, Gutiérrez R, F. B-R (2006): Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learn Mem* 12:533-537.
- Rodriguez-Romaguera J, Sotres-Bayon F, Mueller D, Quirk GJ (2009): Systemic propranolol acts centrally to reduce conditioned fear in rats without impairing extinction. *Biol Psychiatry* 65:887-892.
- Roosendaal B, McEwen BS, Chattarji S (2009): Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* 10:423-433.
- Rosenkranz JA, Grace AA (1999): Modulation of basolateral amygdala neuronal firing and afferent drive by dopamine receptor activation in vivo. *J Neurosci* 19:11027-11039.
- Rudy JW, O'Reilly RC (2001): Conjunctive representations, the hippocampus, and contextual fear conditioning. *Cogn Affect Behav Neurosci* 1:66-82.
- Samson HH, Denning C, Chappelle AM (1996): The use of nonalcoholic beer as the vehicle for ethanol consumption in rats. *Alcohol* 13:365-368.
- Saladin ME, Gray KM, McRae-Clark AL, Larowe SD, Yeatts SD, Baker NL, et al (2013): A double blind, placebo-controlled study of the effects of post-retrieval propranolol on reconsolidation of memory for craving and cue reactivity in cocaine dependent humans. *Psychopharmacology (Berl)* 226:721-737.
- Sanders MJ, Wiltgen BJ, Fanselow MS (2003): The place of the hippocampus in fear conditioning. *Eur J Pharmacol* 463:217-223.

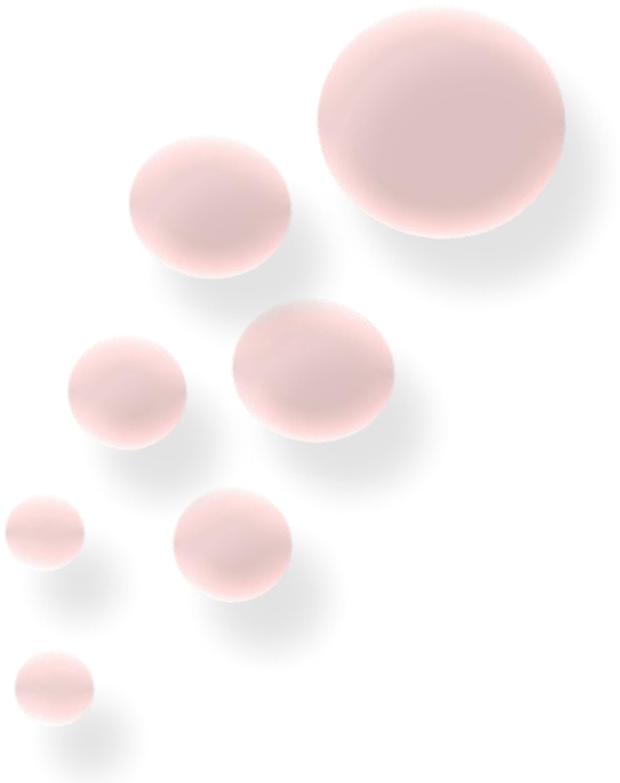
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000): How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21:55-89.
- Sara SJ (2000): Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* 7:73-84.
- Sara SJ, Hars B (2006): In memory of consolidation. *Learn Mem* 13:515-521.
- Schafe GE, Nader K, Blair HT, LeDoux JE (2001): Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci* 24:540-546.
- Schiller D, Kanen JW, LeDoux JE, Monfils MH, Phelps EA (2013): Extinction during reconsolidation of threat memory diminishes prefrontal cortex involvement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:20040-20045.
- Schiller D, Monfils MH, Raio CM, Johnson DC, Ledoux JE, Phelps EA (2010): Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. *Nature* 463:49-53.
- Schwabe L, Nader K, Wolf OT, Beaudry T, Pruessner JC (2012): Neural signature of reconsolidation impairments by propranolol in humans. *Biol Psychiatry* 71:380-386.
- Sellers E, Kalant H (1976): Alcohol intoxication and withdrawal. *N Engl J Med* 294:757-762.
- Sevenster D, Beckers T, Kindt M (2013): Prediction error governs pharmacologically induced amnesia for learned fear. *Science* 339:830-833.
- Siegmund A, Wotjak CT (2007): A mouse model of posttraumatic stress disorder that distinguishes between conditioned and sensitised fear. *J Psychiatr Res* 41:848-860.
- Sinha R (2009): Modeling stress and drug craving in the laboratory: implications for addiction treatment development. *Addict Biol* 14:84-98.
- Sinha R, Li CS (2007): Imaging stress- and cue-induced drug and alcohol craving: association with relapse and clinical implications. *Drug Alcohol Rev* 26:25-31.
- Soeter M, Kindt M (2013): High trait anxiety: a challenge for disrupting fear memory reconsolidation. *PLoS One* 8:e75239.
- Sommer WH, Rimondini R, Hansson AC, Hipskind PA, Gehlert DR, Barr CS, et al (2008): Upregulation of voluntary alcohol intake, behavioral sensitivity to stress, and amygdala crhr1 expression following a history of dependence. *Biol Psychiatry* 63:139-145.
- Sorg BA (2012): Reconsolidation of drug memories. *Neurosci Biobehav Rev* 36:1400-1417.

- Spanagel R (2009): Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev* 89:649-705.
- Stiedl O, Spiess J (1997): Effect of tone-dependent fear conditioning on heart rate and behavior of C57BL/6N mice. *Behav Neurosci* 111:703-711.
- Stoica L, Zhu PJ, Huang W, Zhou H, Kozma SC, Costa-Mattioli M (2011): Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:3791-3796.
- Suryanarayanan A, Liang J, Meyer EM, Lindemeyer AK, Chandra D, Homanics GE, et al (2011): Subunit Compensation and Plasticity of Synaptic GABA(A) Receptors Induced by Ethanol in alpha4 Subunit Knockout Mice. *Front Neurosci* 5:110.
- Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S (2004): Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24:4787-4795.
- Sweatt J (2009): Mechanisms of Memory. Second Edition. *Accademic Press, Elsevier*.
- Taylor JR, Torregrossa MM (2015): Pharmacological disruption of maladaptive memory. *Handb Exp Pharmacol* 228:381-415.
- Thorpe WH (1963): The concepts of learning and their relation to those of instinct. Physiological mechanism in animal behavior symposium. *Soc Exp Biol* 4:387-408.
- Tipps ME, Raybuck JD, Lattal KM (2014): Substance abuse, memory, and post-traumatic stress disorder. *Neurobiol Learn Mem*. 21:380-393.
- Tronel S, Milekic MH, Alberini CM (2005): Linking new information to a reactivated memory requires consolidation and not reconsolidation mechanisms. *PLoS Biol* 3:e293.
- Tronson NC, Taylor JR (2007): Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 8:262-275.
- Tronson NC, Taylor JR (2013): Addiction: a drug-induced disorder of memory reconsolidation. *Curr Opin Neurobiol* 23:573-580.
- Tronson NC, Wiseman SL, Neve RL, Nestler EJ, Olausson P, Taylor JR (2012): Distinctive roles for amygdalar CREB in reconsolidation and extinction of fear memory. *Learn Mem* 19:178-181.
- Tronson NC, Wiseman SL, Olausson P, Taylor JR (2006): Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. *Nat Neurosci* 9:167-169.

- Valdez GR, Roberts AJ, Chan K, Davis H, Brennan M, Zorrilla EP, et al (2002): Increased ethanol self-administration and anxiety-like behavior during acute ethanol withdrawal and protracted abstinence: regulation by corticotropin-releasing factor. *Alcohol Clin Exp Res* 26:1494-1501.
- Valdez GR, Zorrilla EP, Roberts AJ, Koob GF (2003): Antagonism of corticotropin-releasing factor attenuates the enhanced responsiveness to stress observed during protracted ethanol abstinence. *Alcohol* 29:55-60.
- Van Dijken HH, Mos J, van der Heyden JA, Tilders FJ (1992): Characterization of stress-induced long-term behavioural changes in rats: evidence in favor of anxiety. *Physiol Behav* 52:945-951.
- Vetere G, Piserchia V, Borreca A, Novembre G, Aceti M, Ammassari-Teule M (2013): Reactivating fear memory under propranolol resets pre-trauma levels of dendritic spines in basolateral amygdala but not dorsal hippocampus neurons. *Front Behav Neurosci* 7:211.
- Walker DL, Ressler KJ, Lu KT, Davis M (2002): Facilitation of conditioned fear extinction by systemic administration or intra-amygdala infusions of D-cycloserine as assessed with fear-potentiated startle in rats. *J Neurosci* 22:2343-2351.
- Wang SH, 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.
- Weiss F, Parsons LH, Schulteis G, Hyttia P, Lorang MT, Bloom FE, et al (1996): Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats. *J Neurosci* 16:3474-3485.
- Wells AM, Arguello AA, Xie X, Blanton MA, Lasseter HC, Reittinger AM, et al (2013): Extracellular signal-regulated kinase in the basolateral amygdala, but not the nucleus accumbens core, is critical for context-response-cocaine memory reconsolidation in rats. *Neuropsychopharmacology* 38:753-762.
- Werner CT, Milovanovic M, Christian DT, Loweth JA, Wolf ME (2015): Response of the ubiquitin-proteasome system to memory retrieval after extended-access cocaine or saline self-administration. *Neuropsychopharmacology* 40:3006-3014.
- WHO, World Health Organization (2004). WHO Global Status Report on Alcohol 2004. Geneva: WHO Department of Mental Health and Substance Abuse.

- Wiltgen BJ, Godsil BP, Peng Z, Saab F, June HL, Linn ML, et al (2009): The alpha1 subunit of the GABA(A) receptor modulates fear learning and plasticity in the lateral amygdala. *Front Behav Neurosci* 3:37.
- Wood NE, Rosasco ML, Suris AM, Spring JD, Marin MF, Lasko NB, et al (2015): Pharmacological blockade of memory reconsolidation in posttraumatic stress disorder: three negative psychophysiological studies. *Psychiatry Res* 225:31-39.
- Wouda JA, Diergaarde L, Riga D, van Mourik Y, Schoffelmeer AN, De Vries TJ (2010): Disruption of Long-Term Alcohol-Related Memory Reconsolidation: Role of beta-Adrenoceptors and NMDA Receptors. *Front Behav Neurosci* 4:179.
- Zhang S, Cranney J (2008): The role of GABA and anxiety in the reconsolidation of conditioned fear. *Behav Neurosci* 122:1295-1305.
- Zhao LY, Sun LL, Shi J, Li P, Zhang Y, Lu L (2011): Effects of beta-adrenergic receptor blockade on drug-related memory reconsolidation in abstinent heroin addicts. *Drug Alcohol Depend* 118:224-229.

TRABAJOS CIENTÍFICOS



Parte de los resultados de la presente tesis fueron publicados o se encuentran en preparación. Se indica también el trabajo publicado realizado en colaboración por la tesista.

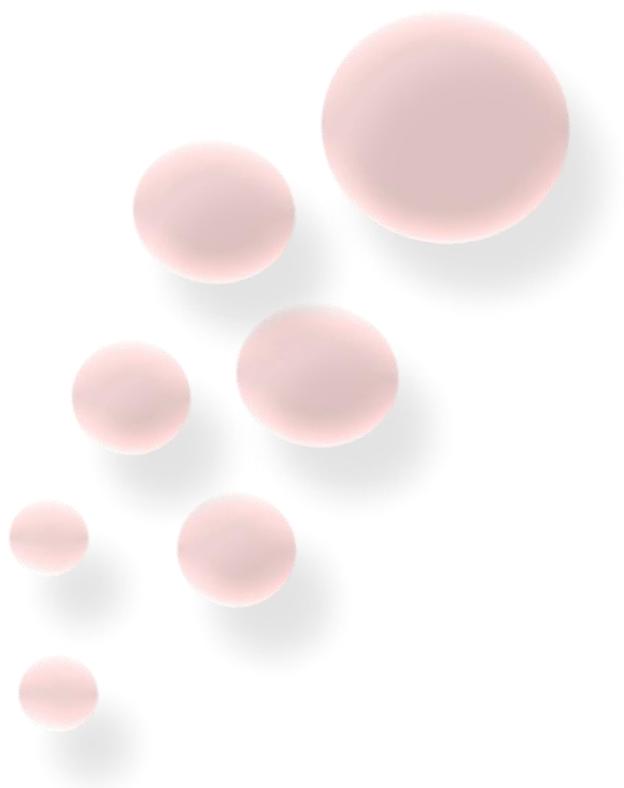
Ortiz V, Giachero M, Espejo PJ, Molina VA, Martijena ID (2015): The effect of Midazolam and Propranolol on fear memory reconsolidation in ethanol-withdrawn rats: influence of D-cycloserine. *Int J Neuropsychopharmacol*.18(4).

Espejo PJ, Ortiz V, Martijena ID, Molina VA (2016): Stress-induced resistance to the fear memory labilization/reconsolidation process. Involvement of the basolateral amygdala complex. *Neuropharmacology* 109:349-356.

Ortiz V, Molina VA, Martijena ID (2016): Effect of a positive reinforcing stimulus on fear memory reconsolidation in ethanol withdrawn rats: Influence of D-cycloserine. *Behav Brain Res* 315:66-70.

Ortiz V, Molina VA, Martijena ID: Emotional-like consequences generated by fear memory recall are dependent on the labilization process: influence of ethanol withdrawal. (manuscrito en redacción).

ANEXO



Experimento	Parámetro Evaluado	Grupo	Media	E.E.M
Ia	Congelamiento durante la reactivación (s)	CON-SAL	111,22	8,47
		CON-MDZ	103,20	7,57
		ETOH-SAL	91,88	6,58
		ETOH-MDZ	104,63	6,38
	Congelamiento durante el Test1 (s)	CON-SAL	370,67	14,16
		CON-MDZ	231,20	10,97
		ETOH-SAL	351,25	12,15
		ETOH-MDZ	379,38	13,86
	Congelamiento durante el Test2 (s)	CON-SAL	309,89	19,04
		CON-MDZ	199,00	13,52
		ETOH-SAL	315,00	11,01
		ETOH-MDZ	349,63	17,84
Ib	Congelamiento durante la reactivación (s)	CON-SAL	215,17	4,47
		CON-MDZ	187,00	20,14
		ETOH-SAL	195,83	3,87
		ETOH-MDZ	209,33	21,44
	Congelamiento durante el Test1 (s)	CON-SAL	377,00	18,56
		CON-MDZ	234,17	5,87
		ETOH-SAL	381,50	8,88
		ETOH-MDZ	377,00	10,80
	Congelamiento durante el Test2 (s)	CON-SAL	329,50	10,05
		CON-MDZ	223,33	10,29
		ETOH-SAL	351,67	6,73
		ETOH-MDZ	346,50	7,51
Ic	Congelamiento durante el Test de los grupos NR (s)	CON-SAL	352,71	15,08
		CON-MDZ	373,71	15,91
		ETOH-SAL	351,57	8,25
		ETOH-MDZ	356,38	18,40
II	Congelamiento durante la reactivación (s)	CON-SAL	207,38	7,34
		CON-PROP	208,18	9,68
		ETOH-SAL	183,00	16,13
		ETOH-PROP	192,56	10,61
	Congelamiento durante el Test1 (s)	CON-SAL	374,25	10,34
		CON-PROP	225,00	18,50
		ETOH-SAL	381,88	18,05
		ETOH-PROP	352,11	13,87
	Congelamiento durante el Test2 (s)	CON-SAL	335,25	10,14
		CON-PROP	213,36	14,38
		ETOH-SAL	362,63	15,13
		ETOH-PROP	321,56	14,04
	Congelamiento durante el Test de los grupos NR (s)	CON-SAL	388,00	23,72
		CON-PROP	401,00	14,92
		ETOH-SAL	357,56	12,00
		ETOH-PROP	378,45	15,08

Experimento	Parámetro Evaluado	Grupo	Media	E.E.M
IIIa	Congelamiento durante la reactivación (s)	CON-SAL/SAL	218,63	8,55
		CON-SAL/MDZ	203,63	10,04
		CON-DCS/SAL	215,50	9,71
		CON-DCS/MDZ	198,30	13,91
		ETOH-SAL/SAL	204,75	10,19
		ETOH-SAL/MDZ	202,00	13,63
		ETOH-DCS/SAL	201,78	11,84
		ETOH-DCS/MDZ	203,70	13,94
	Congelamiento durante el Test1 (s)	CON-SAL/SAL	372,63	17,44
		CON-SAL/MDZ	249,25	7,22
		CON-DCS/SAL	390,88	10,05
		CON-DCS/MDZ	245,50	15,52
		ETOH-SAL/SAL	370,75	15,25
		ETOH-SAL/MDZ	363,25	12,13
		ETOH-DCS/SAL	398,56	13,28
	ETOH-DCS/MDZ	382,70	13,44	
	Congelamiento durante el Test2 (s)	CON-SAL/SAL	318,25	17,82
		CON-SAL/MDZ	232,88	14,40
		CON-DCS/SAL	332,75	13,44
		CON-DCS/MDZ	225,10	11,66
		ETOH-SAL/SAL	342,13	13,09
		ETOH-SAL/MDZ	334,88	8,80
		ETOH-DCS/SAL	369,22	11,88
		ETOH-DCS/MDZ	348,90	20,94
	Congelamiento durante el Test de los grupos NR (s)	CON-SAL/SAL	394,40	31,33
		CON-SAL/MDZ	369,20	19,22
		CON-DCS/SAL	385,20	17,54
		CON-DCS/MDZ	357,20	12,31
ETOH-SAL/SAL		369,20	11,77	
ETOH-SAL/MDZ		356,20	27,79	
ETOH-DCS/SAL		386,80	12,98	
ETOH-DCS/MDZ		390,60	9,33	
IIIb	Congelamiento durante la reactivación (s)	CON-SAL/SAL	213,86	3,97
		CON-SAL/PROP	206,86	9,55
		CON-DCS/SAL	207,43	12,55
		CON-DCS/PROP	217,50	18,22
		ETOH-SAL/SAL	200,75	10,61
		ETOH-SAL/PROP	206,25	14,86
		ETOH-DCS/SAL	187,75	15,91
		ETOH-DCS/PROP	202,78	11,14
	Congelamiento durante el Test1 (s)	CON-SAL/SAL	368,14	9,64
		CON-SAL/PROP	269,29	12,13
		CON-DCS/SAL	384,43	16,32
		CON-DCS/PROP	254,25	21,04
		ETOH-SAL/SAL	391,75	14,32
		ETOH-SAL/PROP	383,13	12,05

Experimento	Parámetro Evaluado	Grupo	Media	E.E.M
IIIb	Congelamiento durante el Test1 (s)	ETOH-DCS/SAL	391,00	16,23
		ETOH-DCS/PROP	237,89	18,19
	Congelamiento durante el Test2 (s)	CON-SAL/SAL	326,71	6,33
		CON-SAL/PROP	239,29	11,78
		CON-DCS/SAL	326,14	17,58
		CON-DCS/PROP	229,50	18,86
		ETOH-SAL/SAL	363,38	14,72
		ETOH-SAL/PROP	339,88	12,80
		ETOH-DCS/SAL	367,63	16,63
	Congelamiento durante el Test de los grupos NR (s)	ETOH-DCS/PROP	228,44	14,01
		CON-SAL/SAL	380,14	23,71
		CON-SAL/PROP	393,43	14,67
		CON-DCS/SAL	385,83	14,34
		CON-DCS/PROP	383,50	10,06
		ETOH-SAL/SAL	363,43	8,94
		ETOH-SAL/PROP	394,67	13,86
IV	α 1: Expresión Total (D.O)	ETOH-DCS/SAL	386,80	12,98
		ETOH-DCS/PROP	396,80	12,51
	α 1: Expresión en Superficie (D.O)	CON	1,99	0,10
		ETOH	1,46	0,09
V	Congelamiento durante la reactivación (s)	CON	1,68	0,12
		ETOH	1,22	0,10
		Agua	224,33	16,57
	Congelamiento durante el Test1 (s)	CSA-15 min	192,29	6,87
		CSA-7 h	205,00	5,75
		Agua	422,33	31,24
	Congelamiento durante el Test2 (s)	CSA-15 min	232,86	18,15
		CSA-7 h	417,00	11,91
		Agua	351,33	21,36
VI	Congelamiento durante la reactivación (s)	CSA-15 min	206,57	20,44
		CSA-7 h	371,00	8,68
		CON-SAL/CSA	178,40	9,28
		CON-DCS/CSA	199,00	11,40
	Congelamiento durante el Test1 (s)	ETOH-SAL/CSA	187,88	8,28
		ETOH-DCS/CSA	189,08	6,09
		CON-R-SAL/CSA	197,20	19,89
		CON-R-DCS/CSA	242,33	12,58
		ETOH-R-SAL/CSA	367,75	15,12
		ETOH-R-DCS/CSA	233,58	13,10
		CON-NR-SAL/CSA	384,78	14,31
		CON-NR-DCS/CSA	385,22	10,34
	Congelamiento durante el Test2 (s)	ETOH-NR-SAL/CSA	365,11	15,82
ETOH-NR-DCS/CSA		407,44	10,61	
Congelamiento durante el Test2 (s)	CON-R-SAL/CSA	197,30	17,62	
	CON-R-DCS/CSA	219,92	15,38	

Experimento	Parámetro Evaluado	Grupo	Media	E.E.M
VI	Congelamiento durante el Test2 (s)	ETOH-R-SAL/CSA	349,25	14,60
		ETOH-R-DCS/CSA	219,58	12,86
		CON-NR-SAL/CSA	357,22	13,09
		CON-NR-DCS/CSA	355,33	11,27
		ETOH-NR-SAL/CSA	344,44	17,10
		ETOH-NR-DCS/CSA	382,44	11,85
VII	Congelamiento durante la reactivación (s)	CON-SAL/SAL	186,71	10,90
		CON-SAL/PROP	192,33	11,45
		CON-DCS/SAL	198,71	11,30
		CON-DCS/PROP	202,57	7,16
		ETOH-SAL/SAL	206,29	6,46
		ETOH-SAL/PROP	176,00	7,18
		ETOH-DCS/SAL	200,00	15,42
		ETOH-DCS/PROP	212,71	8,63
	Congelamiento durante el Test1 (s)	CON-SAL/SAL	335,71	14,68
		CON-SAL/PROP	204,67	7,45
		CON-DCS/SAL	376,71	12,55
		CON-DCS/PROP	227,14	9,70
		ETOH-SAL/SAL	379,71	9,58
		ETOH-SAL/PROP	350,67	13,53
		ETOH-DCS/SAL	366,00	12,23
		ETOH-DCS/PROP	191,57	19,06
	Congelamiento durante el Test2 (s)	CON-SAL/SAL	335,71	14,68
		CON-SAL/PROP	204,67	7,45
		CON-DCS/SAL	376,71	12,55
		CON-DCS/PROP	227,14	9,70
		ETOH-SAL/SAL	379,71	9,58
		ETOH-SAL/PROP	350,67	13,53
		ETOH-DCS/SAL	366,00	12,23
		ETOH-DCS/PROP	191,57	19,06
	Congelamiento durante el Test de los grupos NR (s)	CON-SAL/SAL	350,20	16,18
		CON-SAL/PROP	348,60	17,30
		CON-DCS/SAL	383,00	4,49
		CON-DCS/PROP	366,20	21,00
ETOH-SAL/SAL		359,67	14,60	
ETOH-SAL/PROP		381,20	9,28	
ETOH-DCS/SAL		368,20	13,99	
ETOH-DCS/PROP		361,00	15,06	
VIII	Congelamiento durante la reactivación (s)	CON-DCS/SAL	181,00	10,73
		CON-DCS/MDZ	199,71	16,13
		ETOH-DCS/SAL	194,38	10,36
		ETOH-DCS/MDZ	171,90	6,47
	Congelamiento durante el Test1 (s)	CON-DCS/SAL	359,14	13,57
		CON-DCS/MDZ	252,86	10,80
		ETOH-DCS/SAL	356,25	10,92
		ETOH-DCS/MDZ	342,40	8,21

Experimento	Parámetro Evaluado	Grupo	Media	E.E.M
VIII	Congelamiento durante el Test2 (s)	CON-DCS/SAL	342,29	18,31
		CON-DCS/MDZ	232,57	10,57
		ETOH-DCS/SAL	318,00	6,22
		ETOH-DCS/MDZ	326,10	10,28
IX	Congelamiento en la reactivación (s)	CON	198,83	9,90
		ETOH	193,67	7,64
	%Tiempo en BA	CON-R	32,35	2,90
		CON-NR	25,33	3,50
		ETOH-R	11,54	1,67
	Entradas en BA (n°)	ETOH-NR	24,91	2,83
		CON-R	5,17	0,39
		CON-NR	4,18	0,48
		ETOH-R	2,60	0,38
	Entradas en BC (n°)	ETOH-NR	4,45	0,43
		CON-R	6,08	0,29
		CON-NR	6,45	0,31
ETOH-R		6,67	0,37	
X	Congelamiento en la reactivación (s)	ETOH-NR	7,09	0,28
		CON	175,42	5,53
	Congelamiento en contexto novedoso (s)	ETOH	160,42	10,26
		CON-R	85,83	8,45
		CON-NR	73,11	5,29
XIa	%Tiempo en BA	ETOH-R	147,33	9,33
		ETOH-NR	61,70	6,55
	Entradas en BA (n°)	VEH	31,71	3,76
		NIMO	33,80	3,88
	Entradas en BC (n°)	VEH	4,78	0,46
		NIMO	4,00	0,44
	Congelamiento en la reactivación (s)	VEH	5,22	0,28
		NIMO	5,67	0,29
	%Tiempo en BA	VEH	213,71	9,06
		NIMO	222,00	7,87
		NAIVE	31,94	1,81
	Entradas en BA (n°)	VEH	33,11	3,00
NIMO		12,34	3,09	
NAIVE		5,44	0,63	
Entradas en BC (n°)	VEH	5,00	0,53	
	NIMO	2,75	0,67	
	NAIVE	5,78	0,15	
		VEH	5,43	0,20
		NIMO	5,75	0,49

Experimento	Parámetro Evaluado	Grupo	Media	E.E.M
XIb	%Tiempo en BA	SAL	33,58	6,38
		DCS	29,80	3,19
	Entradas en BA (n°)	SAL	4,80	0,58
		DCS	4,71	0,52
	Entradas en BC (n°)	SAL	5,40	0,51
		DCS	5,86	0,40
	Congelamiento en la reactivación (s)	SAL	205,46	8,19
		DCS	189,77	4,68
	%Tiempo en BA	NAIVE	31,14	2,34
		SAL	10,63	1,53
		DCS	30,45	2,87
	Entradas en BA (n°)	NAIVE	5,13	0,47
		SAL	2,08	0,33
		DCS	4,77	0,32
	Entradas en BC (n°)	NAIVE	5,33	0,19
SAL		4,92	0,35	
DCS		5,15	0,25	
XII	Congelamiento en la reactivación (s)	CON-DCS/SAL	204,60	11,10
		CON-DCS/PROP	209,78	10,66
		ETOH-DCS/SAL	209,08	7,80
		ETOH-DCS/PROP	213,27	7,83
	Congelamiento durante el Test (s)	CON-DCS/SAL	190,60	15,20
		CON-DCS/PROP	141,22	8,72
		ETOH-DCS/SAL	212,67	11,41
		ETOH-DCS/PROP	142,55	6,12
	%Tiempo en BA	CON-DCS/SAL	34,87	2,45
		CON-DCS/PROP	32,41	3,38
		ETOH-DCS/SAL	15,15	2,33
		ETOH-DCS/PROP	32,12	2,72
	Entradas en BA (n°)	CON-DCS/SAL	5,40	0,43
		CON-DCS/PROP	5,67	0,41
		ETOH-DCS/SAL	2,92	0,42
		ETOH-DCS/PROP	5,27	0,36
	Entradas en BC (n°)	CON-DCS/SAL	5,70	0,30
		CON-DCS/PROP	5,89	0,20
		ETOH-DCS/SAL	6,17	0,27
		ETOH-DCS/PROP	6,00	0,23
	%Tiempo en BA (grupos sin reactivación)	CON-DCS/SAL	31,22	2,36
		CON-DCS/PROP	30,21	3,32
		ETOH-DCS/SAL	32,78	2,89
		ETOH-DCS/PROP	28,24	2,34
Entradas en BA (n°, grupos sin reactivación)	CON-DCS/SAL	4,57	0,30	
	CON-DCS/PROP	4,50	0,42	
	ETOH-DCS/SAL	5,29	0,52	
	ETOH-DCS/PROP	5,17	0,48	

Experimento	Parámetro Evaluado	Grupo	Media	E.E.M
XII	Entradas en BC (n°, grupos sin reactivación)	CON-DCS/SAL	5,86	0,34
		CON-DCS/PROP	5,63	0,38
		ETOH-DCS/SAL	5,29	0,42
		ETOH-DCS/PROP	6,67	0,56
XIII	Congelamiento en la reactivación (s)	CON	192,60	10,03
		ETOH	191,00	10,78
	GluN2B/Tubulina (D.O)	CON-NR	0,75	0,11
		CON-R	1,42	0,14
		ETOH-NR	0,93	0,15
		ETOH-R	0,92	0,10
XIV	Congelamiento en la reactivación (s)	CON	178,67	11,04
		ETOH	202,80	16,99
	PPubiq/Actina (D.O)	CON-NR	0,69	0,05
		CON-R	1,42	0,21
		ETOH-NR	1,00	0,08
		ETOH-R	0,86	0,11
XVa	Actividad Proteosomal (% del grupo NR)	NR	100,32	13,12
		60 min	164,68	25,89
		90 min	128,45	21,54
		120 min	88,06	5,29
XVb	Congelamiento en la reactivación (s)	CON	185,00	15,43
		ETOH	195,25	5,50
	Actividad Proteosomal (% del grupo CON-NR)	CON-NR	98,95	2,86
		CON-R	145,28	9,91
		ETOH-NR	106,74	8,77
		ETOH-R	81,09	10,34