

## TESIS DOCTORAL

***“Análisis Ontogenético de las Bases Neurobiológicas del Aprendizaje Contextual en roedores, a través de un abordaje comportamental, farmacológico y estructural”***

**Biól. M. Victoria Pisano**



**Laboratorio de Neurofisiología**  
**Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra**  
INIMEC – CONICET – UNC

**Córdoba – Argentina**

**2016**



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



## UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra

INIMEC – CONICET – UNC

### DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS

*Análisis Ontogenético de las Bases Neurobiológicas  
del Aprendizaje Contextual en roedores,  
a través de un abordaje comportamental,  
farmacológico y estructural*

**Tesista: Biól. Ma. Victoria Pisano**

**Directora: Dra. Ma. Gabriela Paglini**

**Co-directora: Dra. Paula Abate**

Córdoba, Argentina

2016

## **COMISIÓN ASESORA**

*Dra. María Gabriela Paglini*

Instituto de Investigación Médica  
"Mercedes y Martín Ferreyra" INIMEC-  
CONICET-UNC.

*Dra. Liliana M. Cancela*

Instituto de Farmacología Experimental  
de Córdoba - Facultad de Ciencias  
Químicas – CONICET – UNC.

*Dr. Pablo López*

Instituto de Investigación Médica  
"Mercedes y Martín Ferreyra" INIMEC-  
CONICET-UNC.

*Dra. Paula Abate*

Instituto de Investigación Médica  
"Mercedes y Martín Ferreyra" INIMEC-  
CONICET-UNC.

## **DEFENSA ORAL Y PÚBLICA**

**Lugar y Fecha:**

**Calificación:**

### **TRIBUNAL**

Firma: .....

Aclaración: .....

Firma: .....

Aclaración: .....

Firma: .....

Aclaración: .....

***A los que llenaron de colores  
cada uno de los días que se cuentan en esta tesis,  
mi querida comunidad.***

***Favito, Solecita, Pepi, Colega, Dami, Guille, Gaby, Belita y Eve***



# **Agradecimientos**

*Porque ha sido un proceso colectivo, con tantos momentos como personas las que fueron parte, agradezco lo compartido en esta temporada de aprendizaje. Cada momento y cada lugar fueron sin duda los adecuados.*

*A quiénes me guiaron, agradezco su participación y sus comentarios para ayudarme a mejorar y entender el objeto de estudio que compartimos, mostrándome sus enfoques y experiencia: **Lili Cancela, Pablo López y María Eugenia Pedreira**, gracias Comisión Asesora. Y a través de ustedes, agradezco al **Doctorado en Neurociencias** por el espacio, vale la pena que la apuesta siga creciendo y mejorando. Cuenten conmigo para eso.*

***Paulita Abate**, querida compañera, siempre conté con tu apoyo y sentí tu confianza en el camino. Gracias por los aportes en la tesis y por los encuentros en las calles, por tu lucha y compromiso.*

***Gabita** corazón, han sido tantas las veces que te agradecí que esta sección es toda tuya. En cada ratito, en cada mail que nos mandamos, diariamente, he sentido la necesidad de agradecerte. Tu cariño y compañía durante todos estos años. La contención, la tolerancia. Las enseñanzas y la libertad que me regalaste. Me defendiste y alentaste cada día para adentro, y cada vez que fue necesario para afuera. Aprendí de vos infinitas cosas. Ante todo la alegría, ante todo la solidaridad y a sacar el mayor provecho de cada momento, a caminar para adelante, a guiarnos por el cariño. A volver a comenzar cuando sea necesario, con más fuerza cada vez. Cuidaste siempre que el espacio que compartimos me permitiera reforzarme a mí misma y expresarme libremente, así sólo se consigue crecer. Haces mucho por el otro, tuve la suerte de encontrarte. Mi jefa infinita, mi familia de cada día en ese querido laboratorio que, no por azar, está y estará siempre lleno de personas valiosas a tu lado. Con muchísimo amor te digo gracias Gabita querida.*

***Coleguita**, me agarraste la mano y me llevaste de viaje. Agradecida por lo que aprendí a tu lado, por cómo y cuánto me has ayudado. Cada tardecita de bioterio,*

*cada conversación, han sido descubrimientos. Tu corazón es más grande que tu cabeza, que eso ya es mucho. Gracias por impulsarme, por contagiarme tu curiosidad y por enseñarme a construir. Has sido muy importante en este proceso. Compartimos hermosos momentos Carlitos querido. Te tendré siempre cerca en mi andar.*

*He tenido los mejores compañeros de camino y hermanos de la vida en esta etapa. Soñamos juntos con una comunidad que queremos conseguir, que ya de soñarla es lindo. **Favito**, de oro plata fierro cobre iridio y todo lo que brille, mi gran amigo, siempre firme a mi lado, siempre con palabras de amor. **Solecita**, cuánta conexión entre nuestros corazones desde el primer día, amiga hermana. **Guille** querido, solidario y generoso, has sido mi gran apoyo. Al **Dami** lindo, gracias, cada día por algo nuevo, por las perspectivas coloridas que me llevas a construir. **Pepita**, que me has ayudado sobretodo a entender, gracias amiga por tus cuidados. Sí que nos hemos divertido y caminado al lado **Belita** linda, **Eve** querida. **Pimpollito Mir**, hermanito desde los comienzos, muchas gracias por estar a mi lado, por mostrarme todas las cosas que se pueden hacer con amor y energía.*

*Al **Instituto Ferreyra**, a su patio tan amigable. A sus pasillos, a lo aprendido en ellos, a cada aporte de cada compañero, gracias.*

*Me han cuidado todos. Siempre y mucho. Porque cada vez que me cruzo con **Pablito Helguera** me quedo más contenta, sus palabras son de cariño. A los amigos **Josecito W.**, **Vicky R.** pura alegría, **Anita V.**, **Emi Z.**, **Eric S.**, **Nahuel Z.**, **Gonza M.**, pendientes y preocupados siempre entre nosotros. **Lucas C.Z.**, **Maca F.**, **Seba S.**, **Florcita D.**, **Seba M.**, **Anahí B.**, **Majo P.**, a todos los compañeros, gracias. **Gustavo P.**, **Ceci C.**, **Mauricio M.**, **Laura V.**, **Nico U.**, **Julia C.**, **Dolo C.**, **Agus A.**, **Mariana B.**, **Andy G.**, **Caro T.**, **Andre R.**, **Jime C.**, siempre dispuestos cuando necesito conversar con ustedes, me han brindado su conocimiento, las puertas de sus espacios estuvieron y están siempre abiertas. Me han ayudado tanto el **Gonza Q.**, generoso corazón y **Mariano B.**, con las imágenes de la tesis y con los análisis de las espinas, muchas gracias a ellos. A los amigos con los que compartí los comienzos, **Luján**, **Iván**, **Laurita**, **Cris**, gracias, guardo hermosos recuerdos de cada etapa en el Ferre, **Ceci M.**, compañera de los primeros días.*

*Agradezco la familia que formamos adentro de él. En particular, a las sonrisas de **Silvina, Graciela y Susana**. En particular a **Pato** querido, a **Eli, Joaqui, Romi, Milu, Jesi**, mis amigos del bioterio, por su compañía, por sus cuidados, su ayuda en el desarrollo de mis experimentos, a **Adri B. y Sergio O.** A **Sole de Olmos** por sus aportes y acompañamiento en la preparación de muestras. A mi querida **Betty H.** que tanto me enseñó cuando comencé a trabajar con animales. A cuánta gente linda del Ferre, gracias.*

*La alegría que tengo de volver a compartir mis días en el Instituto es inmensa, quién me conoce lo sabe. Y qué decir de **Mel**, de la suerte que tengo de que sea ella quién me guíe en este nuevo proyecto. Me recibe con una sonrisa cada día, se la devuelvo cada vez y entendemos que será así el modo de caminar. Tengo tanto más que escuchar de ella, y esto por suerte recién empieza, agradecida por eso. Qué decir de **Benja**, orgullosa digo “mi nuevo compañero”. De él ya estoy aprendiendo. Nos alcanzó con un día para hermanarnos, uno. Su apoyo ha sido valioso, han sido un regalo en estos días especiales. Feliz de compartir la siguiente temporada con estos inmensos corazones, sólo lo lindo saldrá de esta unión. Voy a hacer todo por esta oportunidad.*

*Al **Dr. Albrieu** lo pongo así para que se enoje, sino no nos podemos comunicar. Muy contenta de tenerte de compañero, al menos así te llamo aunque jamás lo fuimos. No nos pasan los años a nosotros. Al **Viro** completo agradezco, hasta a los fantasmas. Pero sin **Pedrito** no sería lo mismo. Gracias por sus puertas siempre abiertas para mí.*

*La familia, la de la sangre, la que me encuentra en casa. La que en esta etapa me tuvo ante todo entendimiento. Y mucha paciencia. Y me dio siempre amor. Los pilares y los escalones. Mi **mamá Vivi** y mi **papá Robert** me ayudaron a alcanzar cada deseo. Sin su apoyo no hubiese podido, y sin su confianza no hubiese sido fácil construir la propia. Gracias por decirme siempre que sí, que lo haga, y que vaya por mi camino, que ellos me llevan cuando necesite.*

***Flori y Gonchi**, a ustedes los hermanos va mi amor, y los agradecimientos más sinceros. Compartimos sólo nosotros sabemos cuanto, y nos ayudamos sólo nosotros*

sabemos cuanto. La alegría de tenerlos en la vida, agradecida por su apoyo. **Gus**, mi familia y la que me ofreces a través de **Nacho** y **Santi**, para que estemos siempre cerca. De ellos, de los más pequeños, aprendí de un nuevo amor, sin dudas el más sentido. Amo a mi familia. Gracias a las primas y tías, tíos y primos, por su especial compañía. A la **Bali** mi tesoro, el cielo en la tierra, gracias. Por cada bendición. Puro empujarme pa adelante mi abuela Bali.

A los **amigos todos** debo agradecerles.

Otros que me han cuidado mucho han sido ellos. Y tengo infinito para agradecer, porque me han dado amor en todas sus formas. Guada, Flaquita, Ro y su manada enterita con León a la cabeza. Con los que más aprendí a abrir el corazón, que por suerte es una acción irreversible, Marquitos U., a la Fundación Sí. A Pao y su familia, Eros, Tizi y a Agus, mi angelito, ellos me enseñaron acerca de la valentía.

A Facu, Jime, Mauri, Katy, gracias por estar bien cerquita y a mano. Cuántas cosas nos encuentran hoy. Nos encuentran agrupados por suerte. Gracias por su cariño y amistad intensa, tenía un lugar en el corazón que los estaba esperando.

Nico, mi Kuzmi querido. Me enseñas cada día a ser mejor cada día, que se trabajan uno a uno, que se superan uno a uno. Y que no hay límites. La templanza como don más valioso y que todo se alcanza con confianza, y con la ayuda de los demás. Mi corazón está con vos y en mi casa tengo un altar con tu nombre iluminado. No se apaga más y me quedo con lo aprendido para el resto del camino. Nico fuerte, entero, sabio y grande. Te tengo cerquita y sonrío cada vez que te nombro.

El amor existe en cualquier oportunidad, lo digo porque pasa. Sino pregúntenle a Fer, Lucre, Román, Nati, Rouse, Juli, Lauri, Guille, Luz, Ariel, Seba, Andrés. Ellos también saben que los sentimientos más lindos pueden brotar, desde cualquier sala, desde cualquier lugar. Aunque la ideología está dividida, cada vez que riego los tengo presentes. Gracias amigos por habernos cuidado en los momentos más sensibles. A los malvones, Namaste.



*Por la música que siempre suena. Mi querido veci Santi, gracias hermano por los espacios y los momentos, mi músico preferido. Me levanto tarareando las canciones tuyas, las que me mostraste de los amigos de Córdoba, las de los nenes, pensando en el negrito Fata, en el Chicho, en los patios y las nohecitas lindas que pasamos. En que no dejen de sonar, que no me falten nunca. Las guitarreadas son el mejor lugar en el que me quiero encontrar. Gracias a los amigos que me dan su música, en mi casa la guitarrita los espera y los recibe siempre afinada.*

*A los **compañeros** de cada espacio.*

*Y hoy hay espacio para moverse lindo, por eso digo gracias a los **JINes** (Jóvenes Investigadores en Neurociencias) por estar ocupándolo. A mis amigos que buscan expresar la neurociencia poniéndola al alcance del otro, intentando encender curiosidades. Por la dedicación y el esfuerzo se alcanzaron muchos objetivos, en los colegios, los jardines, la peatonal, los encuentros. Somos un producto de un momento histórico de la ciencia en nuestro país, en el que se intentó romper con barreras académicas y ponerse al alcance, al servicio, y entre la gente. Gracias a ese pensamiento existimos como grupo. Y así, tuvimos una casa que fue la UNC, apoyo y ayuda para lograr objetivos de llegar a más gente y de manera más creativa. Pudimos hacer teatro ambulante, música, fotografía y danza para contar neurociencia, y aprender de cada proceso. Ya van 8 años. Nos empujó y ayudó sobretodo la UNC, pero bajo las ganas de Carolina Scotto y de Pancho Tamarit. Es importante agradecerles, nuestro grupo existe gracias a que ellos estuvieron a nuestro lado, y gracias a sus gestiones. Más ciencia, más libertad. Ojalá en el futuro haya JINes ocupándose de este espacio y cuidando la UNC desde adentro.*

*Quiero agradecer a otro nuevo espacio que formamos con los compañeros **CyUA** (Científicos y Universitarios Autoconvocados). Cada día se hace mas necesario que estemos juntos. De la lucha colectiva emerge más fuerza. Gracias por compartir las calles y por caminar bajo la misma bandera, sólo unidos se alcanzan los sueños. La patria es el otro y hacia allá vamos.*

*Al último párrafo se lo dedico a mi querida casa, la **UNC**. A ella me debo. Cada herramienta, cada posibilidad, me la ha brindado. Siempre tuve un lugar. Tengo una casa enorme con mil espacios e infinitos patios que siento míos. En ella encontré a los JINes, al Ferre, a los CyUA, allí descubrí la Ciencia, en ella la estudio y desarrollo, tuve grandes educadores, grandes modelos, lindos amigos, música, Deodoros, historia. Porque no se ha quedado al costado del momento histórico en el que vivimos, por llevar las insignias que me representan. Por ser inclusiva, por llevar los colores de la patria grande, por su dinamismo y crecimiento, por trabajar su calidad, por su responsabilidad social. Gracias a la UNC pública y de todos.*

*En pocos días, después de 9 años de camino firme, nuestra querida UNC pasa a estar en manos de una nueva gestión, cuyas políticas universitarias son lamentablemente conocidas por los que formamos parte de esta casa. A Pancho le voy a agradecer todo su trabajo y esfuerzo. Hoy, a casi 100 años de la reforma universitaria, a mi querida Universidad Nacional de Córdoba, me brindo.*

*Córdoba, 20 de Marzo de 2016*

*“La juventud vive siempre en trance de heroísmo.*

*Es desinteresada, es pura.*

*No ha tenido tiempo aún de contaminarse. No se equivoca nunca en la elección  
de sus propios maestros.*

*Ante los jóvenes no se hace mérito adulando o comprando.*

*Hay que dejar que ellos mismos elijan sus maestros y directores, seguros de que  
el acierto ha de coronar sus determinaciones.*

*En adelante solo podrán ser maestros en la futura república universitaria los  
verdaderos constructores de alma, los creadores de verdad, de belleza y de bien.”*

Los jóvenes universitarios de Córdoba  
Manifiesto Liminar, Córdoba, 1918.

## **Resumen**

Numerosas investigaciones en la última década han contribuido al avance en el estudio del aprendizaje y la memoria, que comprenden un área de gran relevancia en el campo de las Neurociencias. El *aprendizaje contextual*, que involucra la capacidad de asociar eventos con el contexto en el que se desarrollan, permite la flexibilidad comportamental y cognitiva necesarias para que los individuos respondan de manera adecuada y específica en función del contexto en el que estas experiencias ocurren. Se ha establecido que este tipo de aprendizaje depende del *hipocampo* (HPC) que es la estructura encargada de procesar y reorganizar la información que compone al contexto, en una representación configuracional del mismo, para que esté disponible para ser asociado con estímulos específicos que se presenten en ese contexto, y no en contextos alternativos. El hipocampo participa en la adquisición y consolidación del aprendizaje contextual a través de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos *N-Metil-D-Aspartato* (NMDAr). El rol específico que se ha propuesto para los receptores NMDA en el aprendizaje contextual es el de la formación de la representación configuracional del contexto. Por otra parte, la interacción entre los NMDAr y proteínas asociadas a la plasticidad sináptica, como PSD-95, es clave para la funcionalidad y localización apropiada de los receptores en la sinapsis, así como para inducir cascadas de señalización que deriven en modificaciones a largo plazo en la transmisión sináptica, como el remodelado de espinas dendríticas.

Algunos autores proponen que la capacidad de adquirir ciertos aprendizajes que dependen del hipocampo, como el aprendizaje contextual, *no emerge hasta después del destete en la rata* (hacia el día postnatal 23 – PN23). Se han propuesto dos explicaciones de la capacidad tardía en desarrollar este tipo de aprendizaje, por un lado, diversos autores sostienen que hay dos sistemas de memoria que se encuentran disociados durante la ontogenia: el sistema de *memoria a corto plazo*, que sustenta el aprendizaje contextual que ocurre inmediatamente después del condicionamiento, pero pierde información rápidamente (presente en sujetos menores de PN23), y el sistema de *memoria a largo plazo*, que retiene información indefinidamente pero requiere de un periodo de consolidación que se produce horas después del

entrenamiento (presente en roedores desde el PN23 en adelante); y, por otro lado, ciertos autores sostienen que la falta de respuesta de miedo en los paradigmas utilizados en crías se deben a una diferencia en los sistemas sensoriales y motores de los roedores más pequeños, por lo que las claves presentes en los contextos de entrenamiento para estas edades carecen de saliencia y no pueden ser advertidas por los sujetos menores.

Existe una variante del procedimiento de condicionamiento contextual que se denomina ***Facilitación del Condicionamiento por Pre-Exposición al Contexto (FCPC)***. Este procedimiento se compone de tres fases: pre-exposición, condicionamiento y evaluación. La ventaja de este esquema de aprendizaje sobre el procedimiento tradicional de condicionamiento contextual, reside en que *permite evaluar el rol del hipocampo específicamente en la adquisición de la memoria contextual*, lo que ocurriría en la fase de pre-exposición.

A través del uso de este paradigma, y realizando un análisis exhaustivo del patrón de respuestas que los animales realizan en la evaluación del test FCPC, además de la incorporación de grupos controles adicionales que dan muestra de los niveles de actividad basal de cada variable medida en el FCPC, pudimos comparar la capacidad de aprender acerca del contexto en roedores de PN17 y de PN23, además de manipular farmacológicamente a los NMDAr en ambas edades y así poder comprender los mecanismos que median a este aprendizaje. Estudiamos además, la posible relación entre la adquisición de este aprendizaje con la plasticidad sináptica estructural analizando las diferencias en el número y morfología de espinas dendríticas en sujetos de diferentes condiciones de entrenamiento en el FCPC. La incorporación de nuevas pautas de conducta en el análisis de la ontogenia del aprendizaje contextual, nos permitió detectar *evidencias de este aprendizaje en animales pre-destetados*, en donde se postula que el aprendizaje contextual es independiente de contexto. A su vez, ampliar el espectro de conductas a evaluar nos permitió observar que existen algunos parámetros comportamentales que serían más sensibles para el estudio de este paradigma de aprendizaje, incluso en sujetos destetados. Por otro lado, la incorporación de nuevos grupos experimentales sin experiencias previas en el contexto, o bien, el empleo de intensidades de descarga eléctrica menores que las

generalmente utilizadas, serían de utilidad como parámetros para futuros estudios, en los que las condiciones de bienestar animal serían contempladas. Estos resultados se asociaron a la implicancia de mecanismos mediados por NMDAr en ambas edades estudiadas. Se pudo observar, a través de estudios farmacológicos y bioquímicos, que los sujetos pre-destetados (PN17) son capaces de procesar la información contextual compartiendo características, a este nivel, con animales mayores a quienes se le atribuyen funciones superiores de procesamiento de información, por haber logrado un desarrollo y maduración de los sistemas implicados en este aprendizaje. Pudimos en esta tesis, además, verificar un mecanismo temporal que manifiesta la interacción de proteínas que participan en la plasticidad sináptica, específicamente de la subunidad NR2B de los NMDAr, en su sitio fosforilado NR2BY1472, determinando la composición de los NMDAr y de este modo su función, en sujetos destetados y, de manera interesante, en sujetos de la edad anterior al destete. Otras proteínas relacionadas con plasticidad sináptica, tales como PSD-95 y el complejo "Cdk5/p35, fueron evaluadas tras el entrenamiento en la primera fase del procedimiento FCPC, sin obtener evidencias de que ocurran modificaciones en la expresión de las mismas en sinaptosomas de HPC dorsal. En un modelo de ratones Thy1-GFP que expresan la proteína verde fluorescente selectivamente en algunas regiones del Sistema Nervioso Central (SNC), como el HPC, pudimos en primer lugar, replicar algunos de los fenómenos observados en el FCPC para variables sensibles de condicionamiento, así como también encontrar el efecto de facilitación descrito para este paradigma y, en los mismos, relacionar al entrenamiento realizado con un aumento en la densidad de espinas dendríticas en dendritas apicales de neuronas piramidales de HPC dorsal, que se consideran estructuras que subyacen a la plasticidad estructural, y que se encuentran íntimamente relacionadas a mecanismos inducidos por NMDAr.

## ***Summary***

In the last decade, extensive research in Neuroscience has contributed to the study of learning and memory. *Contextual learning* involves the ability to associate discrete events with the context in which they operate and allows individuals to respond adequately and specifically to the context where these experiences occur.

It has been established that contextual learning depends on the *hippocampus* (HPC) that is the responsible structure for processing and reorganizing the information contained in the context, in a new configurational representation that will be available to associate specific stimuli present in that context, and not in alternative settings. The hippocampus is involved in the acquisition and consolidation of contextual learning through the ionotropic N-methyl-D-Aspartate glutamate receptors (NMDAr). The interaction between NMDAr and proteins associated with synaptic plasticity, such as PSD-95, is crucial for a proper functionality and localization of these receptors in the synapse, as well as to induce signaling cascades that results in long term modifications of the synaptic transmission and even in the remodeling of the density and structure of dendritic spines.

Some authors propose that the ability to acquire certain types of learning that depends on the HPC, like context conditioning, does not emerge until weaning in the rat (around postnatal day 23 - PN23), at least when the defining features of the context lack explicit and salient olfactory cues. Contextual learning deficits in preweaning have been associated with functional immaturity of the dorsal HPC, or with an incomplete innervation between the HPC and the amygdala, both structures required for associative learning, that develops late in ontogeny.

Several procedures are employed to study contextual learning, like fear conditioning, in which subjects are trained to associate the context as a conditioned stimulus that anticipates the incidence of an unconditioned stimulus consisting generally a foot shock in this procedure. There is a variant of this paradigm called ***Context Pre-exposure Facilitation Effect*** (CPFE). This procedure consists of three phases: pre-exposure, conditioning and testing. The advantage of this scheme over the

traditional procedure is that it allows to study the role of the hippocampus in the acquisition of contextual learning, that takes place in the pre-exposure phase. The dependent variable typically analyzed in these studies is the percentage of time that the rat is immobile (freezing) during the testing session. The common result is that non pre-exposed subjects do not show any evidence of fear (the so-called “immediate shock-deficit”), which is alleviated by the pre-exposure treatment.

The present study examined the CPFE on PD17 and PD23 by means of the analysis of multiple dependent variables, including fecal boli and an exhaustive ethogram of the behavioral repertoire of the rat. Also, we included a non-shocked control group to analyze whether the behavioral pattern of the animals treated with the footshock at conditioning differed from the respective control condition of the same age group. Several studies have demonstrated that NMDAr are necessary for the formation of the conjunctive representation of the context, during the acquisition of memory in weaning rats. Previous studies using the CPFE procedure showed that MK-801 infusion (NMDAr antagonist) caused the same levels of conditioning between pre-exposed and non pre-exposed PD23 animals. In this study we demonstrated that, not only PD23 rats but also preweaning PD17 subjects show contextual memory, evidenced through the use of multiple dependent variables. Also, we showed that non pre-exposed conditioned subject also demonstrated fear responses. We found that the inhibition of NMDAr in pre-exposed-conditioned animals resulted in the same behavioral pattern that non pre-exposed-conditioned animals in PD23, and attenuates some fear responses in PD17. Furthermore, we observed that the fear memory of the non pre-exposed animals is dependent of NMDAr. We conclude that NMDAr inhibition (MK-801 injection) modify the expression of the fear memory, but does not eliminate the conditioned fear.

We also found in our study a temporary dynamic in the expression of NR2B, a specific subunit of the NMDAr that is involved in synaptic plasticity, after the training in the pre-exposure phase of the CPFE, at both ages, PN23 and PN17. Another proteins related to plasticity, such as Cdk5, p35 and PSD-95 were evaluated in our model.

Transgenic Thy1-GFP mice selectively express the green fluorescent protein in hippocampal pyramidal neurons. We were able to replicate in this model some of the

phenomena observed in the CPFE and the behavioral pattern expressed in response to conditioning for some dependent variables, such as grooming and fecal boli number. In CPFE-trained mice, we found the typical facilitation effect described for this paradigm. After the training we observed an increase in dendritic spines density of pre-exposed subjects, independently of the conditioning training administered. It is known that dendritic spines underlies the structural plasticity induced by NMDAr in learning processes. In sum, we associate a behavioral model of contextual fear learning, evidenced not only in PN23 but also in PN17 subjects, to a temporary expression of NMDAr subunit, NR2B, involved in the structural remodeling of dendritic spines, that were increased in the pre-exposure condition.



# ***Abreviaturas***

A: Amígdala

ABP: Proteínas de Unión a Actina

AMPAr: Receptores  $\alpha$ -Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4-Isoxazo-Propionato

AP2: Proteína Adaptadora de Clatrina 2

ATP: Adenosina Tri-Fosfato

BLA: Núcleo Basolateral de la Amígdala

CA: Cuerno de Amón (regiones del Hipocampo: CA1 – CA2 – CA3)

CamKII: Proteína Quinasa Calmodulina dependiente de Calcio II

Cdk5: Ciclina Dependiente de Quinasa 5

CE: Núcleo Central de la Amígdala

CK2: Quinasa Caseína 2

CPf: Corteza Prefrontal

EC: Estímulo Condicionado

EI: Estímulo Incondicionado

EPSC: Corriente Post Sináptica Excitatoria

EPSP: Potencial Post Sináptico Excitatorio

FCPC: Paradigma de Facilitación del Condicionamiento por Pre-exposición al Contexto

FTA: Núcleo Fronto-Temporal de la Amígdala

G-actina: Actina Globular

GFP: Proteína Verde Fluorescente

GK: Guanilato Quinasa

HPC: Hipocampo

HPCd: Hipocampo Dorsal

HPCv: Hipocampo Ventral

ip.: Inyección Intraperitoneal

IP: Inmunoprecipitado

LA: Núcleo Lateral de la Amígdala

LTD: Depresión a Largo Plazo

LTP: Potenciación a largo plazo

MK-801: Dizocilpina

MWM: Test de Morris (Morris Water Maze)

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

NMDAr: Receptores N-Metil-D-Aspartato

NP: No Pre-expuestos

P: Pre-expuestos

PAG: Núcleo de la Sustancia Gris Periacueductal

PKA: Proteína Quinasa A

PKC: Proteína Quinasa C

PN: Postnatal

PSD: Densidad Post Sináptica

PSD-95: Proteína de la Densidad Post Sináptica de 95KDa

RAM: Test de Brazos en Radio (Radial Arm Maze)

RasGAP: Proteína activadora de GTPasas de Ras

Ras-GRF1: Factor de liberación del Nuclótido Guanina Específico de Ras

RC: Respuesta Condicionada

REL: Retículo Endoplásmico Liso

RER: Retículo Endoplásmico Rugoso

RI: Respuesta Incondicionada

SAP102: Proteína Asociada a la Sinapsis 102

SFKs: Familia de Proteínas Quinasas Src

SN: Sobrenadante del Inmunoprecipitado

SNC: Sistema Nervioso Central

TARP: Proteína Transmembrana Regulatoria de AMPA

# INDICE

COMISIÓN ASESORA .....	1
DEFENSA ORAL Y PÚBLICA.....	1
Agradecimientos.....	3
Resumen .....	9
Summary .....	12
Abreviaturas.....	15
INDICE .....	17
INTRODUCCIÓN .....	20
<b>1.1 Aprendizaje.....</b>	<b>21</b>
Aprendizaje Asociativo .....	21
Componentes del condicionamiento clásico .....	23
Paradigma general de condicionamiento Pavloviano .....	23
El CONTEXTO como estímulo condicionado (EC) .....	25
Neurobiología del aprendizaje asociativo.....	27
Rol de la Amígdala en la formación de las asociaciones entre estímulos.....	27
Rol del Hipocampo en el procesamiento de la información contextual.....	30
Paradigma de Facilitación del Condicionamiento por Pre-exposición al Contexto (FCPC) .....	32
Estructura del Hipocampo .....	35
Tipos celulares que componen al Hipocampo .....	37
Desarrollo y Maduración del Hipocampo .....	38
<b>1.2 Ontogenia del aprendizaje contextual.....</b>	<b>43</b>
<b>1.3 Receptores glutamatérgicos N-Metyl-D-Aspartato (NMDA) .....</b>	<b>46</b>
Diversidad en la composición de los NMDAr y su expresión .....	47
Diferencias en el tipo y ubicación de los receptores NMDA durante el desarrollo ontogenético.....	52
Métodos generalmente utilizados para lesionar o silenciar la acción del HPC durante el aprendizaje contextual, a través de la manipulación de los NMDAR.....	54
Interacción de los NMDAR con proteínas regulatorias .....	57
NMDAr – PSD95 .....	58
NMDAr - Cdk5/p35.....	61
NMDAr – Src.....	63
<b>1.4. Plasticidad sináptica funcional y estructural.....</b>	<b>66</b>
Plasticidad sináptica asociada al aprendizaje y la memoria.....	66
Espinas dendríticas.....	69
Estructura de las espinas dendríticas .....	69
Composición de las espinas dendríticas .....	71
Espinogénesis: Tres Posibles Modelos .....	74
Factores importantes para la plasticidad de las espinas dendríticas .....	76
Implicancias de estos factores sobre el aprendizaje y la memoria .....	77
CONSTRUCCIÓN DE LA HIPÓTESIS.....	81
OBJETIVOS.....	85
<b>3.1 Objetivo General.....</b>	<b>85</b>

<b>3.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>85</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>87</b>
<b>4.1 Procedimientos generales.....</b>	<b>88</b>
(a) Animales de experimentación .....	88
a.1 Ratas cepa Wistar .....	88
a.2 Ratones Thy1-GFP .....	89
a.2.1 Genotipificación de los ratones Thy1-GFP .....	89
Obtención de la Muestra de Tejido.....	90
Extracción y purificación del ADN genómico.....	90
Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	91
(b) Aparatos .....	91
(c) Tratamientos farmacológicos.....	92
(d) Análisis bioquímicos.....	92
Preparación de la Fracción Sinaptosomal.....	92
Análisis de Western Blot.....	93
(e) Ensayo de Inmunoprecipitación.....	94
(f) Anticuerpos .....	95
(g) Fijación de los Cerebros.....	95
(h) Adquisición y análisis de imágenes .....	96
(i) Análisis estadístico .....	97
<b>4.2 Metodología específica .....</b>	<b>97</b>
Serie experimental 1: Evaluación del efecto de Facilitación del Condicionamiento contextual por Pre-exposición al Contexto, en ratas destetadas y pre-destetadas.....	97
Serie experimental 2: Evaluación del efecto de la inhibición de los receptores NMDA en el paradigma de Facilitación del Condicionamiento por Pre-exposición al Contexto (FCPC), en sujetos destetados y pre-destetados.....	100
Experimentos 2a y 2b: MK-801 previo a la sesión de preexposición del FCPC.....	101
Experimento 2c: MK-801 previo a la sesión de condicionamiento del FCPC.....	103
Serie experimental 3: Evaluación de los cambios bioquímicos en la expresión de la subunidad NR2B y de su estado fosforilado activo, NR2BY1472, así como los de proteínas claves en la adquisición del aprendizaje contextual como PSD-95, Cdk5 y su activador específico p35, en el hipocampo dorsal de sujetos de PN23 y PN17, en respuesta a la exposición a un contexto novedoso, y la interacción entre este grupo de proteínas.....	104
Experimentos 3a y 3b: Evaluación de la expresión en sinaptosomas de NR2B, NR2BY1472, PSD-95, Cdk5 y p35, en sujetos preexpuestos a un contexto novedoso, tanto de PN23 (Experimento 3a) como de PN17 (Experimento 3b). .....	105
Experimento 3c: Inmunoprecipitación de los complejos PSD-95/NR2B y PSD-95/Cdk5, en sujetos preexpuestos a un contexto novedoso de PN23. ....	107
Serie experimental 4: Evaluación del número y tipo de espinas dendríticas en el Hipocampo dorsal, de ratones entrenados en el paradigma FCPC.....	108
Experimento 4a: FCPC en ratones Thy1-GFP .....	109
Experimento 4b: Análisis de la densidad y morfología de espinas dendríticas de .....	110
neuronas piramidales de CA1 en el HPCd de ratones Thy1-GFP.....	110
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>111</b>
<b>5.1 Serie experimental 1: Evaluación del efecto de Facilitación del Condicionamiento contextual por Pre-exposición al Contexto, en ratas destetadas y pre-destetadas. ....</b>	<b>111</b>
Experimento 1a – PN23.....	111

Experimento 1b – PN17 .....	115
<b>5.2 Serie experimental 2: Evaluación del efecto de la inhibición de los receptores NMDA en el paradigma de Facilitación del Condicionamiento por Pre-exposición al Contexto (FCPC), en sujetos destetados y pre-destetados.....</b>	<b>120</b>
Experimento 2a – MK-801 en la fase de Pre-exposición en sujetos de PN23 .....	120
Experimento 2b – MK-801 en la fase de Pre-exposición en sujetos de PN17 .....	124
Experimento 2c – MK-801 en la fase de Condicionamiento en sujetos de PN23.....	128
<b>5.3 Serie experimental 3: Evaluación de los cambios bioquímicos en la expresión de la subunidad NR2B y de su estado fosforilado activo, NR2BY1472, así como los de proteínas claves en la adquisición del aprendizaje contextual como PSD-95, cdk5 y su activador específico p35, y de la interacción entre las mismas, en el hipocampo dorsal de sujetos de PN23 y PN17, en respuesta a la exposición a un contexto novedoso. ....</b>	<b>132</b>
Experimento 3a – PN23 .....	133
Experimento 3b – PN17 .....	135
Experimento 3c – PN23: Inmunoprecipitación de PSD-95.....	138
<b>5.4 Serie experimental 4: Evaluación del número y tipo de espinas dendríticas en el hipocampo dorsal, de ratones entrenados en el paradigma FCPC. ....</b>	<b>140</b>
Experimento 4a – FCPC en ratones Thy1-GFP.....	140
Experimento 4b – Análisis de la densidad y morfología de espinas dendríticas de neuronas piramidales de CA1 en el HPCd de ratones Thy1-GFP .....	143
a. Densidad de espinas dendríticas.....	144
b. Morfología de espinas dendríticas: .....	146
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>148</b>
<b>6.1 Evidencias de aprendizaje contextual en crías de rata de PN17 y PN23, y análisis de modificación del comportamiento en el contexto de entrenamiento por la acción de una descarga eléctrica inmediata, en relación a los eventos previos de pre-exposición. ....</b>	<b>151</b>
<b>6.2 Modulación del FCPC por la acción de los NMDAr en ratas pre y post-destetadas: abordaje a través de la manipulación farmacológica.....</b>	<b>158</b>
<b>6.3 Dinámica de NR2B y de su actividad específica mediada por la fosforilación NR2B-Y1472 en el HPCd, durante la adquisición del aprendizaje contextual, en respuesta a la pre-exposición en ratas pre y post-destetadas. ....</b>	<b>165</b>
<b>6.4 Plasticidad sináptica estructural en respuesta al FCPC. ....</b>	<b>170</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>175</b>
<b>PUBLICACIONES.....</b>	<b>194</b>

# 1

## Introducción

A lo largo de todo el siglo XX, la investigación en ***aprendizaje y memoria*** ha sido una parte integral del estudio de la Psicobiología, que continúa con gran auge en la actualidad. Los trabajos sobre aprendizaje ofrecen importantes nociones acerca de los mecanismos mediante los cuales una ***experiencia*** puede conducir a cambios duraderos en el comportamiento, así como también puede dejar una huella en el sistema nervioso mediante la formación de nuevas conexiones, ya sea creando, eliminando o reforzando los contactos entre neuronas; específicamente en las espinas dendríticas que son el sitio donde reside la plasticidad estructural, las cuales se crean, se retraen o se refuerzan para poner de manifiesto lo aprendido de esa experiencia.

A su vez, los estudios en aprendizaje brindan técnicas y metodologías que son de utilidad en la interpretación de procesos en diversos campos afines, tales como Fisiología, Neurociencias, Psicofarmacología, Medicina, entre otros. Tales factores colocan al ***aprendizaje*** en la convergencia de muchos métodos de investigación del comportamiento; y su estudio, por lo tanto, agrupa a diversas disciplinas que intentan describir, desde abordajes distintos que actúan a diferentes escalas, los mecanismos a través de los cuales las experiencias se traducen en respuestas fisiológicas y/o comportamentales.

Esta tesis intenta, a través de enfoques múltiples, abordar el estudio del aprendizaje desde una perspectiva **ontogenética**, haciendo énfasis en tres puntos claves de comparación: el nivel comportamental, el nivel bioquímico y el nivel estructural.

## 1.1 Aprendizaje

Se ha definido al *aprendizaje* desde diversos aspectos, funcionalmente como cambios en el comportamiento que resultan de la experiencia, mecanicistamente como cambios en el organismo que resultan de la experiencia (De Houwer et al., 2013), como una adaptación ontogenética, refiriéndose a cambios en el comportamiento de un organismo que resultan por la ocurrencia de regularidades en el medio ambiente del organismo, al cual se adapta a través de estos cambios (Tarpay, 1997).

Uniendo estas propuestas, podemos definir al aprendizaje como un *cambio inferido en el organismo, que resulta de la experiencia, y que influencia, de una forma relativamente permanente, al potencial comportamiento adaptativo subsecuente que desarrollará el organismo*. De este modo, el aprendizaje es una capacidad que, en mayor o menor medida, es poseída por todas las especies animales, ya que constituye un mecanismo fundamental y necesario de adaptación al medio ambiente (Norman et al., 2001; Aguado, 2003).

### Aprendizaje Asociativo

La pregunta acerca de *cómo la información sensorial se transforma, a través del aprendizaje, en comportamientos adaptativos* es una cuestión fundamental y una pregunta central en el campo de las Neurociencias.

Si dos estímulos son presentados de manera contingente, o cercanos en el tiempo, cada uno de ellos lleva a la percepción de sensaciones que, al ocurrir de forma

conjunta, las mismas se convierten en **asociaciones**. Así, cuando la primera sensación o estímulo se presenta, desencadena la memoria del segundo estímulo, al cual fue asociado. Este concepto se encuentra enmarcado en el denominado “**Condicionamiento Clásico**” o “**Condicionamiento Pavloviano**” ya que fue estudiado y definido a través de investigaciones realizadas en modelos animales por el fisiólogo *Ivan P. Pavlov*, en el año 1927.

El aprendizaje de las relaciones que existen entre eventos y los estímulos presentes en el medio ambiente que los pueden predecir, es esencial para la sobrevivencia de organismos en todo el reino animal. Existe una forma particular de condicionamiento Pavloviano denominada **condicionamiento de miedo** que ha recibido considerable atención en las últimas décadas (Fendt et al., 2005; Fanselow y LeDoux, 1999; Maren, 2001). De manera sencilla, implica que el aprendizaje acerca de ciertos estímulos presentes en el ambiente puede predecir eventos aversivos para el organismo, y es el mecanismo a través del cual se aprende a temer a ciertos lugares, animales, objetos, personas, etc.

Desde una perspectiva **evolutiva**, se considera que este tipo de aprendizaje se conserva a través de las especies para promover la supervivencia ante amenazas presentes o futuras del entorno (Maren, 2001).

Debido al gran interés que existe en comprender la neurobiología del aprendizaje de miedo condicionado, se han mapeado los circuitos neurobiológicos que subyacen a este condicionamiento, así como también se han identificado procesos de plasticidad sináptica que ocurren en estos circuitos, y, a través de manipulaciones genéticas y bioquímicas, se ha avanzado en profundizar en el entendimiento de la maquinaria molecular requerida para la adquisición de este aprendizaje, así como también del almacenamiento de estas memorias de miedo. Estos avances representan un paso importante para el conocimiento de los sustratos neurales que subyacen a esta forma adaptativa y rápidamente adquirida de aprendizaje asociativo (Fanselow, 1994).



## Componentes del condicionamiento clásico

Existen ciertos componentes del condicionamiento clásico (o Pavloviano), que son importantes de definir para comprender los fundamentos y las metodologías que se utilizan en el estudio del aprendizaje asociativo.

El **estímulo incondicionado (EI)** se define como un estímulo biológicamente relevante, altamente predecible, que tiene la potencialidad de evocar reacciones o respuestas reflexivas no aprendidas, que el organismo no puede controlar, denominadas **respuestas incondicionadas (RI)**.

Por otro lado, el **estímulo condicionado (EC)**, es un estímulo inocuo, biológicamente débil, que cuando es presentado en contigüidad y/o contingencia con el EI, se forma una asociación que permite que el EC desencadene una serie de **respuestas condicionadas (RC)** indicativas de aprendizaje. Es decir, la RC es una respuesta aprendida, no refleja, que se evoca por la ocurrencia de un EC que predice la ocurrencia de un EI. Este mecanismo se denomina condicionamiento clásico *excitatorio*.

En el marco del aprendizaje de miedo condicionado, los paradigmas realizados en modelos de roedores generalmente utilizan en sus procedimientos un EC que puede estar representado por una clave sensorial, como una luz o un tono, y el EI como una descarga eléctrica moderada. La RC generalmente medida en este paradigma es una respuesta de inmovilización y la RI es lo que realiza el animal posterior a la descarga eléctrica (sobresalto, aumento de vocalizaciones, etc.) (Tarpay 1997; Domjan 1999).

### *Paradigma general de condicionamiento Pavloviano*

El condicionamiento de miedo Pavloviano se ha convertido en uno de los modelos estándar que se utilizan para estudiar los mecanismos neurales, genéticos y ontogenéticos que median los procesos de aprendizaje en roedores.

El procedimiento se encuentra representado en la Figura 1, la forma más simple es colocar a una rata o ratón en una cámara (caja de condicionamiento), presentarle o no una clave discreta (según si corresponde a un procedimiento de condicionamiento a claves o a condicionamiento contextual, respectivamente), como una luz o un tono (EC), y entregarle posteriormente una o más descargas eléctricas moderadas (EI) a través del piso de la caja de condicionamiento, que consiste en una gradilla de acero inoxidable por donde circulará la corriente. Luego de la descarga, el animal va a permanecer inmóvil, en una postura típica de arqueamiento de su espalda y manteniendo la cola rígida, lo que se denomina respuesta de congelamiento (RC). Esta respuesta de congelamiento frente a las claves señalizadoras presentadas (luz o tono, o, en el caso que no se presente ninguna, a las claves de la caja) -las cuáles se asociaron previamente con la descarga eléctrica- provee una medida de memoria a corto plazo (por ejemplo Fanselow, 1980). Además, cuando el roedor es re-expuesto a la caja de condicionamiento o a las claves utilizadas como EC, incluso meses posteriores al entrenamiento, va a responder ejecutando la conducta de inmovilización, por lo que la respuesta puede ser utilizada como una medida de memoria a largo plazo (Gale et al., 2004; Quinn et al., 2005; Hunt et al., 2007).

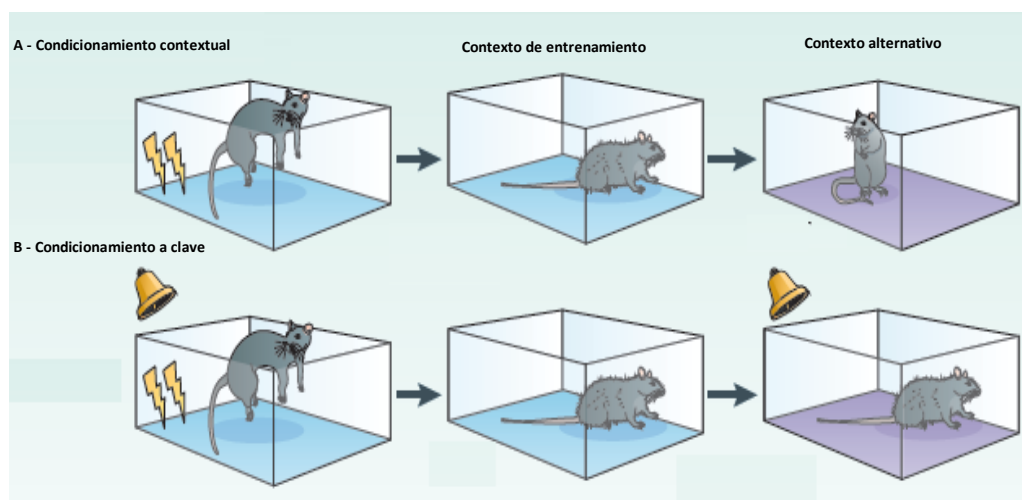


Fig.1: **Paradigma de condicionamiento de miedo. A)** Contextual. **B)** A clave discreta (tono). Cuando se asocia un contexto o una clave (tono) a una descarga eléctrica, el animal responde realizando una respuesta de inmovilización, que será observada sólo en el contexto de condicionamiento y no en un contexto alternativo, o en respuesta a la clave específica con la que se realizó el condicionamiento. Modificado de Maren et al. 2013.

## *El CONTEXTO como estímulo condicionado (EC)*

Los *contextos* rodean y le adjudican significados a los eventos que acontecen en el ambiente de un organismo, siendo esenciales para recapitular el pasado, interpretar el presente y anticipar el futuro. Así, la capacidad de contextualizar la información permite la flexibilidad comportamental y cognitiva.

Los estudios realizados en ensayos de condicionamiento de miedo Pavloviano en roedores y humanos sugieren que hay un circuito neural que incluye al Hipocampo (HPC), Amígdala (A) y a la corteza prefrontal (CPf), que está involucrado en el aprendizaje y los procesos mnemónicos que permiten el comportamiento dependiente de contexto. Disfunciones en este circuito podrían estar involucradas en distintas psicopatologías como estrés post traumático, desórdenes relacionados al abuso de sustancias y de ansiedad, entre otros (Maren et al., 2013). Estos circuitos serán descritos en secciones posteriores de esta tesis.

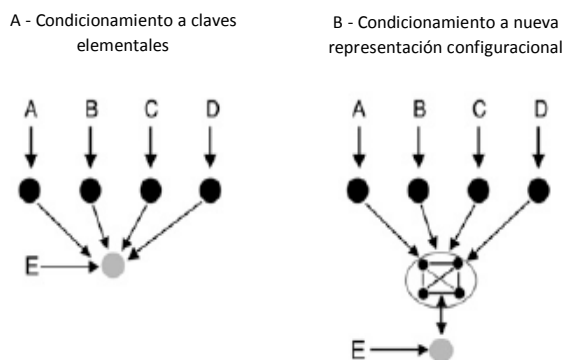
El *contexto*, el *entorno* o el *medio ambiente*, tiene una función clave para los organismos, ya que es esencial para abstraer representaciones e información acerca de situaciones que ocurren en él (Chang et al., 2009). De este modo, el contexto permite las representaciones flexibles y recuperación de la información, teniendo un rol central en resolver la ambigüedad, lo que es necesario para el comportamiento adaptativo. La inhabilidad de contextualizar la información, puede conducir a disfunciones psicológicas tales como percepciones equivocadas o respuestas inapropiadas que contribuyen a psicopatologías específicas. Por este motivo, el entendimiento de cómo los organismos procesan la información contextual, así como también cómo las representaciones contextuales se codifican en el cerebro, es un desafío para la ciencia.

El contexto se puede definir de diversas formas. *Ampliamente*, como un conjunto de circunstancias que ocurren y se encuentran alrededor de un evento. En la literatura, el contexto generalmente se diferencia de las “*claves*” discretas que están presentes en el mismo, siendo los contextos multi-sensoriales, estables y de representación continuada. Las claves discretas, por su parte, son usualmente de corta duración y pueden ocurrir una o varias veces en la presencia del contexto. Existe un componente espacial exteroceptivo del contexto (un lugar físico y los elementos físicos

que lo componen), un componente temporal (momento o frecuencia), un componente interoceptivo (estado hormonal o fisiológico como el estrés, por ejemplo) y un componente social y cultural (Revilla et al., 2014).

El contexto también se puede definir *funcionalmente*. Los modelos de aprendizaje asociativo consideran que el contexto juega un rol importante en la modulación de la adquisición del aprendizaje y su expresión, así como también en la recuperación de la memoria cuando los contextos de entrenamiento y de evaluación son similares, en los paradigmas de condicionamiento en modelos animales. El contexto puede funcionar como un EC prediciendo la ocurrencia de un EI biológicamente relevante, estableciendo las relaciones o configuraciones específicas esperadas entre EC-EI.

Existen dos interpretaciones acerca de cómo se forman las asociaciones EC-EI en el aprendizaje contextual (Figura 2): a través de *representaciones elementales* que ocurren por asociación directa de claves individuales presentes en el contexto, siendo cada una interpretada como un EC, con el EI; o a través de la formación de una *representación configuracional* que implica la construcción de una nueva configuración que será el EC que entrará en asociación con el EI cuando este se presente de manera contigua. Esta nueva representación no se vería afectada por la modificación de algunos de los componentes particulares que la conforman (Rudy, 2009).



**Fig.2: Ilustración de los sistemas de condicionamiento. A)** A claves elementales que componen el contexto, cada una de las cuales entra en asociación con el estímulo condicionado (E). **B)** Formación de una nueva representación configuracional del contexto, el cual entra en asociación con el estímulo condicionado (E). Modificado de Rudy, 2009.

Cada una de estas interpretaciones, *elemental vs. configuracional*, podrían involucrar, según diversas hipótesis, a diferentes sistemas neurobiológicos como sustrato (Rudy, 2009; Langston et al., 2010). A grandes rasgos, el modelo elemental asume independencia del HPC, mientras que el modelo configuracional es dependiente del mismo (Maren, Phan, y Liberzon 2013), lo cual será revisado en una sección siguiente de esta tesis.

### *Neurobiología del aprendizaje asociativo*

Diversos investigadores han propuesto que el condicionamiento de miedo contextual es un producto de dos procesos de aprendizaje independientes, (a) la construcción de una representación conjuntiva de los elementos discretos del contexto; y (b) la asociación de esta representación unitaria con un evento aversivo. En estos procesos, se asume que el primero depende críticamente de un circuito que involucra a la formación hipocampal, y que el proceso asociativo no lo hace, siendo la A el núcleo que lo sustenta (Barrientos et al., 2002; Rudy, 2009).

Brevemente, los estudios realizados utilizando lesiones hipocampales indican que esta estructura está involucrada en codificar las representaciones contextuales, y que las asociaciones contexto-El por sí mismas, no son interferidas por el daño ocasionado al mismo. Está establecido que la A es crítica para el codificado, almacenamiento y la recuperación directa de las asociaciones entre claves o representación contextual y los estímulos aversivos (Gale et al. 2004; Michael S Fanselow y Poulos 2005). Vamos a describir, a continuación, en detalle a los circuitos que subyacen a cada una de las etapas del condicionamiento de miedo contextual.

### Rol de la Amígdala en la formación de las asociaciones entre estímulos.

El análisis de los circuitos neurobiológicos que subyacen al aprendizaje de miedo se han concentrado principalmente en describir la anatomía intrínseca de la A,

como núcleo central de la formación de las asociaciones necesarias entre los estímulos que representan la adquisición de este aprendizaje, mapeando las aferencias sensoriales y los eferentes motores que inervan a la misma (Maren, 2001). Existen diversas y numerosas evidencias que indican que la A es el sitio de formación y almacenamiento de las asociaciones EC – EI durante el condicionamiento de miedo Pavloviano, obtenidas a partir de estudios que emplearon lesiones permanentes o reversibles de la A, así como también se ha detectado este rol a través de registros de patrones de disparos electrofisiológicos (Maren 2001; Maren, Phan, y Liberzon 2013).

La A se encuentra en la porción anterior del lóbulo temporal-medial, anatómicamente, la A recibe estímulos sensoriales de diversas áreas del cerebro (tálamo, neocorteza, corteza olfatoria, HPC) y envía proyecciones a diversas estructuras somato-motoras y autonómicas que median las respuestas específicas de miedo (Kim y Jung, 2006). Está compuesta por varios núcleos morfológica y funcionalmente diferentes entre sí, incluyendo a la amígdala lateral (LA), basolateral (BLA), basomedial (que conforman los tres a la amígdala frontotemporal – FTA, que recibe ese nombre ya que es la interconexión entre cortezas temporales y frontales) y el núcleo central (CE). Las evidencias anatómicas y comportamentales (obtenidas a través de estudios de lesiones, principalmente) entre los núcleos que componen a la FTA vs. el núcleo CE, indican que los mismos constituyen dos subsistemas diferentes, importantes para el condicionamiento de miedo. El primer subsistema (FTA) constituye a la interfase sensorial primaria de la A que involucra la adquisición y la formación de la asociación entre estímulos. El segundo subsistema (CE) constituye la interfase final común hacia los sistemas generadores de la respuesta de miedo aprendida.

El circuito establecido en la literatura se resume en la Figura 3. Brevemente, estímulos variados y diversos que conforman al **EC**, provenientes tanto del hipotálamo, HPC y/o áreas corticales específicas, dependiendo de la naturaleza del estímulo (corteza y tálamo auditivos para estímulos auditivos, HPC para estímulos contextuales, corteza perirrinal para información visual, entre otros), llegan -vía *proyecciones glutamatérgicas*- al núcleo **BLA** de la FTA. A su vez, información acerca del estímulo aversivo, **EI**, llega también a la **BLA** a través de vías talámicas y corticales paralelas. De este modo, neuronas que se encuentran en el **BLA** responden individualmente a

estímulos auditivos, visuales y somáticos (provenientes del EI), siendo la misma un sitio de convergencia entre los EC-EI y la responsable de la integración de la información de una gran variedad de dominios sensoriales.

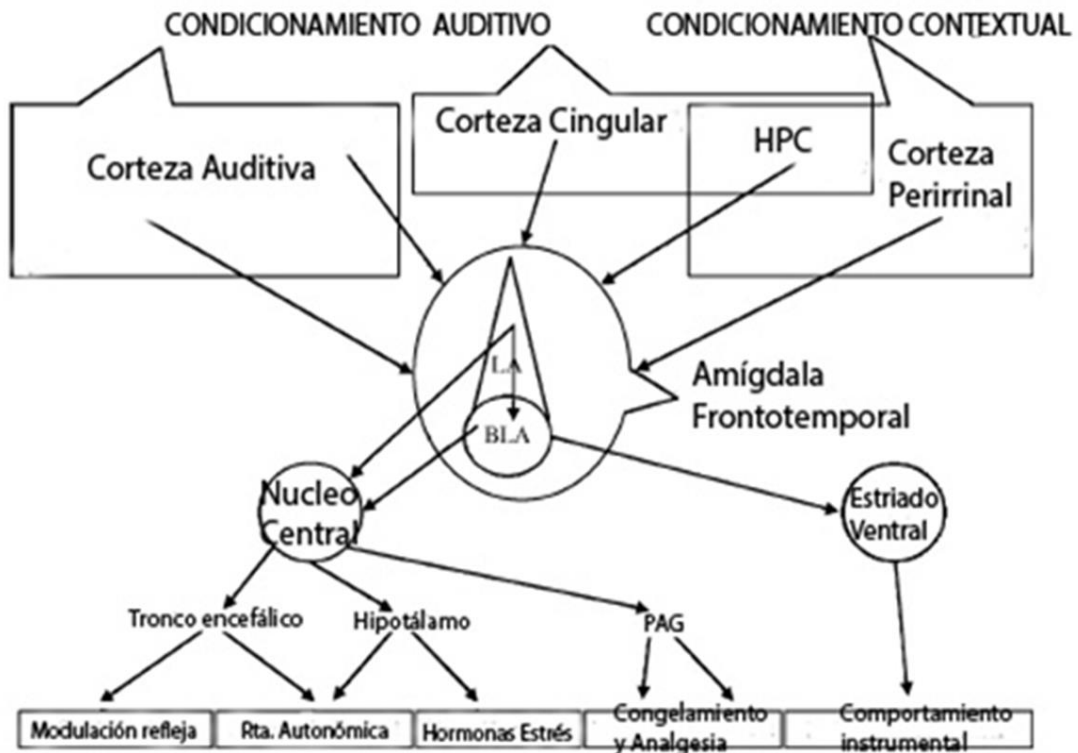


Fig.3: **Circuitos generales de los diferentes tipos de aprendizaje.** Se esquematizan las principales estructuras involucradas en el aprendizaje asociativo, tanto de huella, auditivo, y contextual: Corteza Auditiva, Corteza Cingular, HPC, Corteza Entorrinal, de donde provienen los principales estímulos que llevan información que converge en la A - BLA y LA (FTA), de donde se desprenden las señales, vía CE, para generar las respuestas específicas de miedo condicionado (congelamiento, analgesia, rta. hormonal de estrés, respuestas autonómicas), a nivel del tronco encefálico, PAG e Hipotálamo. Modificado de Quinn et al. 2005.

Una vez que la FTA se encuentra lo suficientemente activada por las claves que conforman a la asociación, la principal vía de salida para la generación de las respuestas de miedo condicionado se inicia a través del CE, que proyecta a un amplio rango de regiones cerebrales. Entre ellas, las respuestas autonómicas se desencadenan

por proyecciones directas de CE hacia el tronco cerebral, modulando reflejos simples como el sobresalto, y hacia el hipotálamo conduciendo a un aumento en la actividad del eje pituitario-adrenal. Además, proyecciones monosinápticas hacia el núcleo de la sustancia gris periacueductal (PAG) que descienden hacia motoneuronas del asta ventral de la espina dorsal, median la respuesta de *congelamiento* (generalmente utilizada como variable dependiente en los paradigmas de condicionamiento de miedo); y, a través de proyecciones monosinápticas desde SGP hacia el asta dorsal de la espina, se produce una respuesta de *analgesia*, mediada por el sistema opioide, que es de particular importancia ya que provee una regulación por retroalimentación negativa, de la información ascendente del dolor que sustenta el condicionamiento de miedo (Young et al., 1994; Fanselow, 1994). Esta regulación es eficaz en mantener el nivel de miedo apropiado al nivel de amenaza y direcciona el miedo específicamente hacia los predictores de los estímulos aversivos (Maren, 2001; Fanselow y Dong, 2010; Fanselow y Poulos, 2005; Hunt et al., 2007).

#### Rol del Hipocampo en el procesamiento de la información contextual

En un experimento típico de condicionamiento de miedo, los roedores adquieren el aprendizaje no solamente al EC emparejado al EI, sino también a las claves contextuales asociadas al EI. Como se mencionó en la sección anterior, el condicionamiento de miedo tanto a *claves discretas*, como a *claves contextuales*, requiere de acción de neuronas de la A. Sin embargo, los mecanismos neurales involucrados en procesar la información de estos tipos diferentes de estímulos, antes de que se asocien al EI, son diferentes. Así, los estímulos que acarrear información de *claves discretas* que conforman el EC llegan a la A vía proyecciones directas de áreas sensoriales primarias del tálamo y la corteza; mientras que la información que concierne al *contexto* se transmite a la A, a través de vías multi-sensoriales de diversas regiones cerebrales. Se le ha atribuido al **HPC** la responsabilidad de ensamblar las representaciones contextuales y de transmitir las a la A para la asociación con el EI (Fanselow y Poulos, 2005). Los estudios neurobiológicos que indican que el HPC tiene



un rol central en el procesamiento de la información contextual, han llegado a estas conclusiones a través de diversos mecanismos.

Las primeras claves que involucran al HPC en el condicionamiento de miedo al contexto, provienen de una serie de estudios que realizan lesiones ya sea momentos previos (lesiones anterógradas) o posteriores (lesiones retrógradas) al entrenamiento, en un paradigma específico. Por ejemplo, se ha observado que lesiones electrolíticas en el HPC, específicamente del segmento dorsal (HPCd: Hipocampo dorsal), bloquea tanto la adquisición, como la expresión de miedo contextual (J. J. Kim y Fanselow 1992; Jerry W Rudy y Morledge 1994; Bast, Zhang y Feldon 2003). Este déficit se observa cuando la lesión se realiza después del condicionamiento (lesiones retrógradas hasta 1 día posterior al entrenamiento) pero no es evidente si la misma se realiza tardíamente (a los 30 días o más, posteriores al emparejamiento). Este patrón de amnesia gradual temporaria, en donde la memoria reciente es más susceptible al daño hipocampal que la memoria remota, es a su vez observable en humanos luego de lesiones en el HPC (Bayley et al. 2005; Maren, Phan y Liberzon 2013). Por otro lado, se ha observado que, si las lesiones hipocampales se realizan antes del condicionamiento (anterógradas), las mismas no necesariamente interrumpen el aprendizaje de miedo, aunque las evidencias de aprendizaje se observen en menor medida y de una manera menos eficiente. Esto sugiere que los elementos que componen al contexto se representan en otras estructuras independientes del HPC y son suficientes para el aprendizaje de miedo, pero, cuando el HPC está intacto, las mismas participan del mecanismo mediado y dependiente del HPC, para formar una representación configuracional (Maren et al., 1997; Maren, 2001; Wiltgen et al., 2005; Fanselow, 2000). Entonces, los déficits en la memoria de miedo condicionado, luego de lesiones hipocampales, parecen ser debidos a interrupciones en la formación y almacenamiento de la representación configuracional por sí misma (codificación del contexto), y no por un déficit en la formación de la asociación de las claves que lo componen con el El (condicionamiento de contexto).

La literatura conjunta, incluyendo lesiones hipocampales realizadas antes y después del condicionamiento, establecen que el aprendizaje de miedo contextual se sustentaría a través de dos procesos: (1) por asociaciones de claves independientes

que forman al contexto y se asocian con el estímulo aversivo independientemente, lo cual no requiere la intervención del HPC y se denomina “sistema para-hipocampal” (Rudy, 2009; Matus-Amat et al., 2007), compuesto por cortezas asociativas que incluyen la entorrinal, postrinal y perirrinal en roedores, lo cual ocurre en ausencia de HPC, por ejemplo al intervenirlos por lesiones anterógradas; o (2) la formación hipocampal integra la información obtenida a partir de las claves contextuales, una nueva representación que se asocia con el estímulo aversivo, a través del “sistema hipocampal” (M S Fanselow 2000; Michael S. Fanselow y LeDoux 1999; J W Rudy y O’Reilly 1999; Jerry W Rudy 2009). En este caso, las lesiones retrógradas impiden el condicionamiento contextual ya que, en el animal intacto, el condicionamiento de la configuración contextual ensombrece al condicionamiento de claves discretas, y esta representación se pierde cuando el HPC es subsecuentemente dañado (Maren, Aharonov y Fanselow 1997; Maren, Phan y Liberzon 2013; Jerry W Rudy 2009).

Una forma de abordar esta hipótesis es a través de la ***pre-exposición al contexto*** en el paradigma de condicionamiento, lo cual elimina el efecto producido por las lesiones hipocampales. Más aún, la inactivación farmacológica del HPC durante la fase de pre-exposición, interrumpe el efecto de la misma. Existe una variante del paradigma clásico de condicionamiento de miedo Pavloviano que permite estudiar específicamente el rol del HPC en el efecto de pre-exposición donde ocurre la formación de la representación contextual. Este paradigma, que será descrito en una sección siguiente, es el que utilizamos como modelo comportamental de aprendizaje contextual en el desarrollo de esta tesis, se denomina “**Facilitación del condicionamiento por pre-exposición al contexto**” y lo abreviaremos, por sus siglas, como FCPC de ahora en adelante.

#### *Paradigma de Facilitación del Condicionamiento por Pre-exposición al Contexto (FCPC)*

El grupo de investigación del Dr. Fanselow y colaboradores, propusieron una variante de los paradigmas clásicos de condicionamiento de miedo Pavloviano,

denominado *FCPC* (Figura 4), para estudiar las bases neurobiológicas del aprendizaje de contexto, el cual se basa en la separación temporal de cada una de las fases que comprende el entrenamiento en un paradigma de este tipo: adquisición del aprendizaje contextual, condicionamiento y evaluación (Fanselow 1990, Wiltgen et al. 2001).

Este procedimiento se compone de tres fases: ***pre-exposición***, ***condicionamiento*** y ***evaluación***. En la primera fase a un grupo de animales se le permite que explore libremente el contexto por un periodo corto de tiempo (cinco minutos aproximadamente). En la segunda fase, que habitualmente se lleva a cabo 24 horas después de la primera, se coloca nuevamente a los animales en el contexto e inmediatamente (antes de los 9 segundos) reciben una descarga eléctrica moderada. En la última fase, de evaluación, se coloca a los animales en el contexto y se analiza la respuesta de miedo que emiten después de este tratamiento, la cual se compara con la de un grupo control que no tuvo experiencia con el contexto en la fase de pre-exposición (Figura 4).

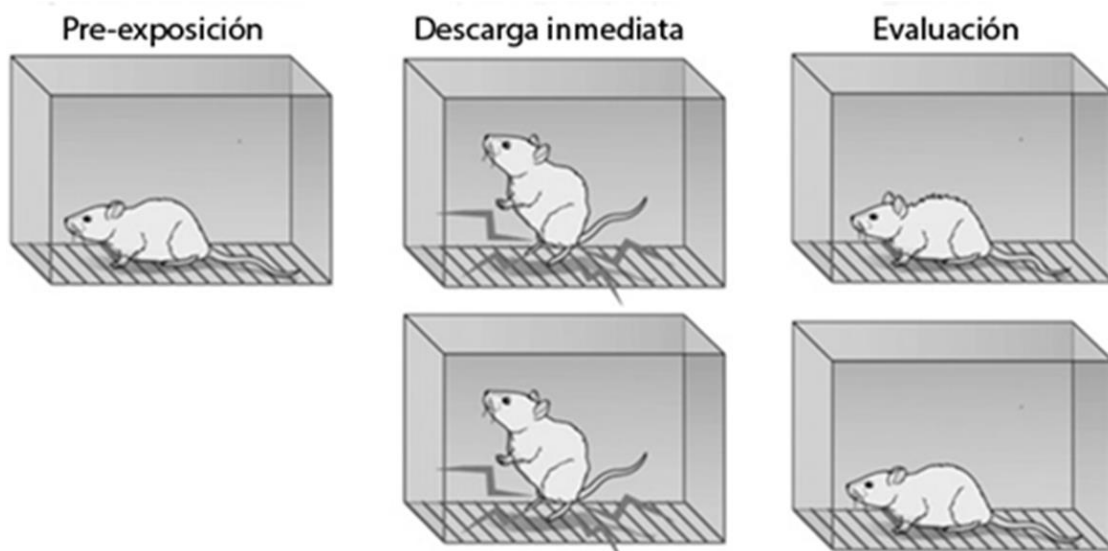


Fig.4: **Paradigma FCPC**. Esquema del paradigma FCPC, en donde se grafican las 3 etapas que componen al procedimiento, las cuáles se encuentran separadas temporalmente (24hs en general). Se esquematiza la condición pre-expuestos vs no pre-expuestos que se observan en la etapa inicial del procedimiento. Modificado de Rudy et. al, 2009.

Lo que se observa generalmente es que *la respuesta de miedo en la fase de evaluación es mayor en el grupo pre-expuesto que en el no pre-expuesto al contexto*. La explicación más aceptada de este resultado se apoya en la hipótesis de que, durante la pre-exposición, el grupo pre-expuesto tiene oportunidad de formar una representación configuracional del contexto. Esta representación le permite, en la fase de condicionamiento, reconocer el contexto, y adquirir una respuesta de miedo que se emitirá específicamente en el mismo (y no en un contexto alternativo). El grupo no pre-expuesto, al no tener disponible la representación configuracional del mismo, no es capaz de asociar el contexto con la descarga eléctrica, lo que se refleja en una ausencia o disminución de la respuesta de miedo el día de evaluación. Este efecto se conoce como “*déficit de la descarga inmediata*” (Fanselow 1990).

La ventaja de este esquema de aprendizaje sobre el procedimiento tradicional de condicionamiento contextual, reside en que el mismo permite evaluar el rol del HPC específicamente en la adquisición de la memoria contextual, lo que ocurre en la fase de pre-exposición.

La mayoría de los estudios que han utilizado esta variante del condicionamiento contextual consideran la respuesta de congelamiento (***inmovilización o freezing***) como única variable dependiente (Landeira-Fernandez et al., 2006; Young y Fanselow, 1992; Sanders et al., 2003; Bevins et al., 1997; Bevins y Ayres, 1994; Tang et al., 2001; Ponnusamy et al., 2007).

Un factor que resulta crítico en el análisis del efecto de facilitación del condicionamiento contextual, es la *magnitud de la descarga eléctrica* que se utiliza durante el condicionamiento. Se ha observado que una descarga eléctrica inmediata (sin exposición previa al contexto de experimentación) de 1mA durante 2 segundos es suficiente para inducir cierto nivel de condicionamiento en ratas adultas. Este aprendizaje se manifiesta en diversas variables dependientes, como la respuesta de congelamiento o el número de bolos fecales medidos en la fase de prueba. El análisis para detectar evidencias de condicionamiento en la condición de descarga inmediata es más complejo que el que habitualmente se realiza en este tipo de estudios, y demanda, por ejemplo, el análisis minuto a minuto de las conductas de los animales. Bevins y colaboradores encontraron que ratas que recibieron una descarga inmediata

(1mA) mostraron un incremento en la respuesta de congelamiento al inicio de la sesión de evaluación (Bevins y Ayres, 1995). Cuando la magnitud de la descarga es menor (alrededor de 0.5mA) las ratas entrenadas en la condición de descarga inmediata no expresan respuestas condicionadas de miedo (Bevins y Ayres, 1995; Bevins et al., 1997).

Este parámetro (intensidad de descarga eléctrica) y la medición de múltiples variables dependientes en la evaluación del paradigma FCPC, aparte del congelamiento como principal variable de evaluación en este campo, serán analizados y discutidos en secciones posteriores de la tesis, ya que son de crucial relevancia, no sólo por las conclusiones a las que diferentes grupos de investigación arribamos, sino para el diseño de paradigmas que no requieran condicionamientos con intensidades elevadas, contribuyendo de esta manera a generar metodologías que contemplen al mejoramiento de las condiciones de los animales de experimentación.

### *Estructura del Hipocampo*

El HPC ha recibido una gran atención en los últimos 50 años, ha sido sujeto de debate y protagonista de una amplia cantidad de estudios de investigación. Existen ciertas controversias aún acerca de la función general básica del mismo y, muchas de éstas controversias, están en relación a su anatomía.

A través de estudios de expresión de genes y patrones de proyecciones anatómicas, se ha observado que hay un eje diferencial dorso/ventral que sugiere que el mismo se puede dividir en estructuras separadas, y que existe una sección central en la que las características anatómicas se solapan con las vecinas, la heterogeneidad que separa al HPC en dos subestructuras: el HPC cognitivo (dorsal - HPCd) relacionado con la memoria declarativa y el HPC emocional (ventral - HPCv) que se relaciona con la regulación de respuestas de estrés y ansiedad que pueden conducir a desórdenes afectivos, como la depresión (Fanselow y Dong, 2010). Existen evidencias suficientes que indican la existencia de ambas funciones en el HPC.

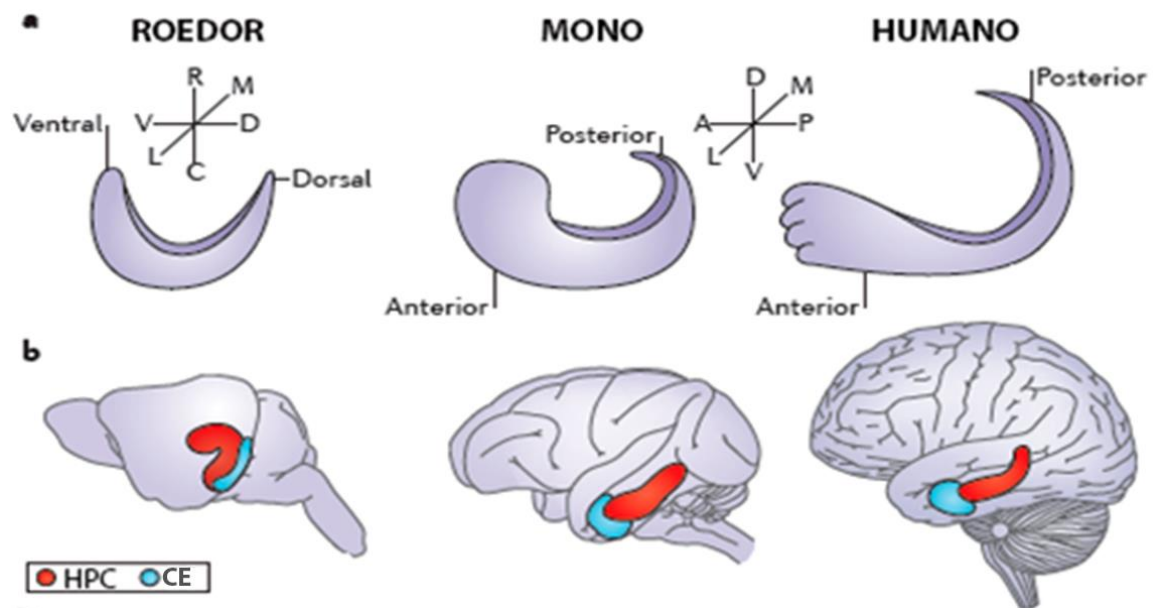


Fig.5: **Comparación de la anatomía del HPC a través de las especies.** **A)** Ilustraciones de la orientación del eje longitudinal del HPC en roedores, monos y humanos. **B)** HPC y corteza entorhinal (CE). **C)** Esquema de corte transversal de HPC en los tres grupos. A: anterior, C: caudal, D: dorsal, DG: giro dentado, L: lateral, M: medial, P: posterior, R: rostral, V: ventral. Modificado de Strange et al. 2014.

El HPC es una estructura que se encuentra en el lóbulo temporal medial, íntimamente relacionada a la memoria episódica (memoria a largo plazo que contiene información acerca de eventos que son accesibles a la evocación consciente) y a la navegación espacial, como se mencionó anteriormente, que se consideran sus principales funciones. Su estructura se conserva en los mamíferos y tiene una morfología centrada en un eje dorso-ventral en roedores, que se corresponde con un eje posterior-anterior en humanos (Figura 5). Los segmentos dorsales y ventrales tienen un patrón de conectividad diferencial hacia áreas corticales y subcorticales. Este patrón diferencial no es absoluto sino gradual. Sin embargo, estudios de lesiones específicas en una u otra porción del HPC han determinado la especificidad de funciones en relación a esta conectividad gradual. Así, se ha demostrado que lesiones restringidas al HPCd, y no lesiones de tamaño similar en el HPCv, interrumpen el aprendizaje espacial (Strange et al., 2014). Por otro lado, la región ventral del HPC media respuestas emocionales, por poseer la misma una más densa conectividad con la A (van Groen y Wyss, 1990; Canteras y Swanson, 1992; Strange et al., 2014), y con

los núcleos autonómicos y endócrinos hipotalámicos, poseyendo un rol selectivo en la respuesta endócrina al estrés (Shipton et al., 2014; Fanselow y Dong, 2010; Bannerman et al., 2004).

### Tipos celulares que componen al Hipocampo

El nombre “hipocampo” proviene por la similitud de dicha región cerebral con el pez de mar (caballito de mar o hipocampo). Se encuentra localizado en el lóbulo temporal del cerebro y en estrecha comunicación con diversas regiones de la corteza cerebral en lo que se denomina sistema o formación hipocampal, constituido por el HPC (propriadamente dicho), el giro dentado, subiculum y la corteza entorrinal (Andersen 2006).

En el HPC propriadamente dicho, una capa de **células piramidales** (denominada capa principal) describe una trayectoria en forma de “C” invertida en la que se distinguen tres regiones denominadas “Cuerno de Amón” (CA): CA1, CA2 y CA3. Las células piramidales de CA3 son las más grandes, conformando de este modo la capa más gruesa de esta estructura.

Además, se pueden distinguir tres capas corticales: la capa stratum oriens, la capa stratum radiatum y stratum lacunosum-moleculare.

Cada **célula piramidal** tiene un árbol dendrítico apical que se extiende a través del stratum radiatum y del stratum lacunosum-moleculare y también presentan un árbol dendrítico basal que se extiende en el stratum oriens.

En el giro dentado se encuentran: una capa principal de **células granulares**, una **capa molecular celular**, ubicada sobre la anterior y una capa de **células polimórficas** o hilus, ubicada debajo de la capa principal (Figura 6) (Burwell et al. 2004; Neves, Cooke, y Bliss 2008).

El criterio primordial para incluir a las estructuras corticales dentro de la formación hipocampal, es *poseer una estructura trilaminar*. Estas estructuras se encuentran conectadas por un gran circuito unilateral que comienza en las células

granulares del giro dentado y envían proyecciones a CA3. En respuesta, las células piramidales de CA3 envían proyecciones unilaterales a CA1. Las neuronas de esta capa proyectan al subiculum y corteza entorrinal. La corteza entorrinal, es la estructura que provee las principales proyecciones hacia el HPC (proyecta a toda la formación hipocampal: giro dentado, CA3, CA1 y subiculum). Dicha corteza, proyecta al giro dentado a través del vía perforante y así provee la entrada de aferentes críticas de cortezas asociativas hacia el HPC. El pasaje de las fibras perforantes desde la corteza entorrinal forma conexiones excitatorias con las células granulares del giro dentado. Las células granulares llevan los axones que forman la vía de las fibras musgosas (“mossy fibers”, del inglés), la cual conecta con las células piramidales de CA3. Las células piramidales de la región de CA3 proyectan a las células piramidales de CA1 por el pasaje de las colaterales de Schaffer. Las colaterales de Schaffer forman sinapsis a distintos niveles de las dendritas de células de CA1 cerca del cuerpo celular y sitios más distantes. Las conexiones formadas por las colaterales de Schaffer se llaman “sinapsis en passant” debido a que los axones de CA3 continúan pasando a través del striatum radiatum, haciendo contacto con dendritas de muchas otras células piramidales. Además, el HPC recibe otras aferencias más débiles como las provenientes de los núcleos del rafe, del locus coeruleus, amígdala y tálamo (Neves, Cooke y Bliss 2008; Van Groen y Wyss 1990; Martinez, Klann y Tejada-Simon 2007).

### Desarrollo y Maduración del Hipocampo

Debido a que esta tesis se centra en el estudio de la ontogenia del aprendizaje contextual, y que el HPC es una estructura fundamental en el procesamiento de la información de este tipo, como se mencionó anteriormente, es importante comentar acerca de los tiempos en los cuales el mismo adquiere su completa maduración tanto a nivel estructural como funcional.



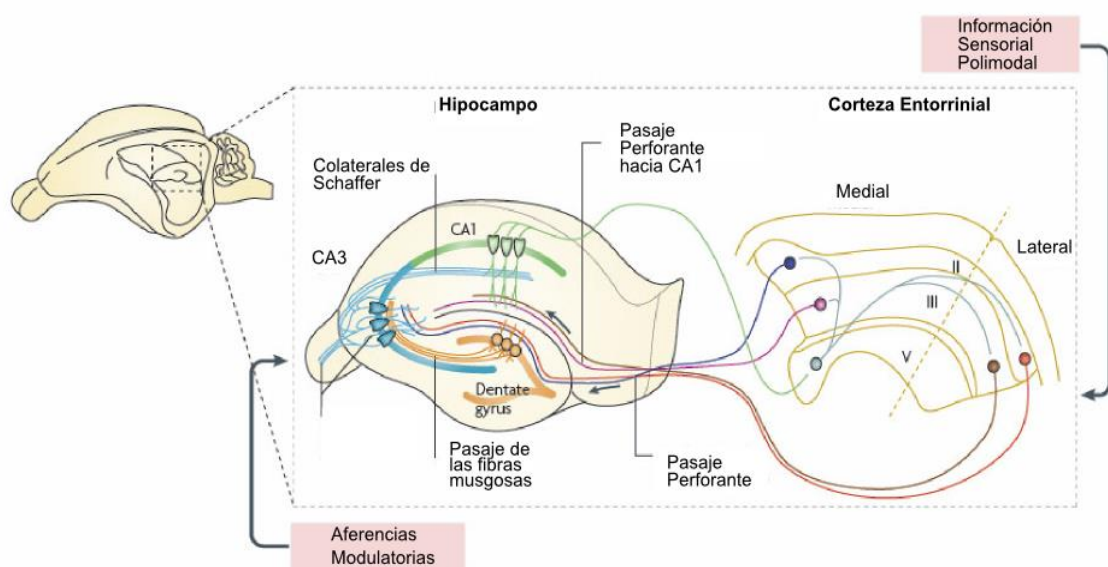


Fig.6: **Anatomía básica del Hipocampo.** Tradicionalmente, el diagrama de inervación del hipocampo es presentado como un circuito trisináptico. La inervación principal es llevada a cabo por axones de la vía perforante, que transportan información sensorial polimodal de neuronas de la capa II de la corteza entorrinal hacia el giro dentado. Los axones de la vía perforante forman contactos sinápticos excitatorios con dendritas de células granulares. Estas últimas, proyectan a través de sus axones (fibras musgosas), a dendritas apicales de neuronas piramidales de CA3 quienes luego proyectan ipsilateralmente a células piramidales de CA1 a través de las colaterales de Schaffer y contralateralmente a células piramidales de CA3 y CA1, a través de conexiones comisurales. Además del circuito secuencial trisináptico, también hay una densa red asociativa interconectando células de CA3 del mismo lado. Las células piramidales de CA3 también son inervadas por aferencias de células de la corteza entorrinal de la capa II. Las dendritas apicales distales de las neuronas piramidales CA1 reciben aferencias de neuronas de la capa III de la corteza entorrinal. Modificado de Neves et al., 2008.

La habilidad de los animales de representar internamente el espacio externo, y utilizar esta representación para guiar comportamientos de navegación y orientación espacial fueron sugeridas por primera vez en el año 1948 por Tolman (Tolman 1948), en su propuesta de la “teoría del mapa cognitivo” (O’Keefe, Nadel y Willner 1979).

Desde entonces, una serie de sistemas en el HPC, y en regiones subyacentes del lóbulo temporal medial, se han ido describiendo y, a partir de ellos, se han construido bloques básicos que pueden sostener y contribuir a la funcionalidad de este sistema, durante el desarrollo (Ainge y Langston 2012).

La formación hipocampal de los roedores contiene diversos tipos de neuronas cuya activación está dirigida a la posición del animal en el espacio y a la orientación, constituyendo un “mapa cognitivo” del contexto, que le permite al animal tanto localizarse a sí mismo como dirigirse a un sitio específico. Existen cuatro tipos de células principales que desempeñan esta función: las *células de lugar* (“place cells”, del inglés) que se encuentran en el HPC, combinadas con las *células de la cuadrícula* (“grid cells”, del inglés) (Fyhn et al., 2008; Hafting et al., 2008), las *células de direccionamiento de la cabeza* (“head direction cells”, del inglés) (Taube, Muller y Ranck 1990; Sargolini et al. 2006) y las *células de los bordes* (“border cells”, del inglés) (Savelli y Knierim 2014; Solstad et al. 2008).

Un gran número de investigaciones se han dirigido a estudiar las propiedades de las células de lugar, haciendo énfasis en cómo responden las mismas a entornos diferentes, familiares o no, a los cambios de las características físicas de los entornos (Burgess y O’Keefe 1996; Colgin, Moser y Moser 2008), y a los consecuentes cambios en las demandas cognitivas ante los mismos (Langston et al. 2010; Ainge y Langston 2012). Si bien esta información está bien documentada, y una gran cantidad de estudios en memoria espacial en roedores adultos se han publicado hasta la fecha, poco se ha estudiado acerca de cómo esta memoria se desarrolla en animales infantiles; y en general, los estudios que abordan este ítem lo han abordado a través de los mismos paradigmas en infantiles que en roedores adultos, enfocados en aspectos comportamentales, tales como el Test de Morris y el paradigma de condicionamiento de miedo contextual.

Se ha establecido que en roedores, el HPC se mantiene en continuo desarrollo durante las primeras cuatro semanas postnatales. El desarrollo prolongado del mismo durante el período de vida postnatal permite el estudio de funciones discretas dependientes de HPC, ya que se establecen de manera subsecuente, siendo la decodificación del contexto, a las dos semanas postnatales, la primera evidencia de actividad de esta estructura que finaliza con la habilidad de formar y recuperar memorias episódicas a largo plazo, luego de la cuarta semana de vida postnatal (Albani, McHail y Dumas 2014).

En los humanos, se ha establecido que la memoria espacial emerge alrededor de los 3 años de edad postnatal (Lourenco, Addy y Huttenlocher 2009) y en roedores, a través de tareas de aprendizaje y memoria, se ha determinado que el HPC no demuestra signos de funcionalidad (similar a los adultos) hasta el final de la tercera semana postnatal (Blair et al. 2014; Albani et al. 2014; Dumas 2005; Kraemer et al. 1995).

A partir de la década del 70, y luego del descubrimiento de las células de lugar por John O'Keefe, se han utilizado estrategias experimentales tales como los registros electrofisiológicos *in vivo*, de las descargas de potenciales de acción en el HPC de animales en libre movimiento, que han permitido avanzar en descifrar la actividad de esta estructura en la ontogenia temprana. Con estas estrategias se han podido observar *células de lugar* estables al día PN16 en el HPC, junto con *células de direccionamiento de la cabeza* y *células de la cuadrícula* en la corteza entorrinal medial (Langston et al. 2010; Wills y Cacucci 2014). Estos reportes indican que existe a esta edad un sistema de referencia geométrico que permite identificar, procesar y discernir entre contextos. Si comparamos esta información fisiológica con los perfiles comportamentales (que emergen más tardíamente) parecería que las propiedades espaciales de las neuronas maduran anticipadamente con respecto a las funcionales responsables del comportamiento espacial.

Recientemente la navegación espacial se ha explorado en los roedores en combinación con manipulaciones farmacológicas y genéticas de receptores de neurotransmisores claves en el HPC, como son los receptores AMPA y NMDA.

Brevemente, los receptores AMPA son los responsables de la despolarización postsináptica que resulta de la liberación presináptica del neurotransmisor excitatorio principal del sistema nervioso: glutamato. Se demostró a través del análisis proteómico de los receptores AMPA que hay un cambio sutil en la composición de las subunidades de los mismos entre los días PN17 y PN24, en el que los niveles de GluA1 (que se observan en mayor medida en la edad más temprana) cambian a GluA3 y se observa un aumento en la proteína reguladora transmembrana de AMPA (TARP) (T. Yuan y Bellone 2013; Hanley 2014). Estos resultados indicarían que las alteraciones sutiles en la expresión de las subunidades del receptor constituyen una modificación sináptica

que altera al HPC y provee una red que permite decodificar nueva información y desenmascarar las habilidades de navegación espacial hacia el día PN24 (Blair, Wu y Cong 2014; Albani, McHail y Dumas 2014).

Los receptores N-Metyl-D-Aspartato (NMDA), que se describirán en profundidad en otra sección de esta tesis, son críticos para la plasticidad sináptica dependiente de la actividad en el HPC (G L Collingridge y Singer 1990; R G M Morris 2013), en la estabilización de las células de lugar (Kentros et al., 2004) y en el aprendizaje y memoria espaciales (R G M Morris, Davis y Butcher 1990; Poulin et al. 2010; G L Collingridge y Singer 1990; G. Collingridge; Richard G.M. Morris 2013). Estos receptores, al igual que los AMPA, modifican la composición de sus subunidades durante la ontogenia (de predominantemente compuestos por la subunidad NR2B a contener, en mayor medida, NR2A a partir de la tercera semana postnatal en roedores), lo cual indicaría que hay una redistribución de los mismos relacionada a la edad y a la maduración del HPC que tienden a estabilizar los sistemas de memoria espacial. La modificación de las subunidades NR2 de los receptores NMDA tiene un particular impacto en las propiedades biofísicas (tiempo de apertura, sensibilidad al bloqueo, etc.) de los canales iónicos que conforman estos receptores y, principalmente, en las interacciones de estos canales con otras proteínas de señalización lo cuál será descrito en esta tesis.

En conclusión, se determina a través de la literatura de estudios tanto electrofisiológicos como estructurales que consideran a los potenciales grupos celulares y a receptores que median la plasticidad sináptica, que los cambios del HPC durante el desarrollo hacia adquirir un funcionamiento similar al observado en los adultos se concreta en la cuarta semana de vida postnatal en roedores, si bien existen mecanismos que se desarrollan y se demuestran activos en semanas anteriores (a partir de la segunda semana), o que levemente se van modificando de manera gradual, como son los cambios en la expresión de subunidades de receptores glutamatérgicos.

## 1.2 Ontogenia del aprendizaje contextual

En los últimos 30 años, numerosos reportes han explorado acerca del aprendizaje del contexto durante la infancia y el desarrollo, tanto en humanos como en modelos de roedores. Estos estudios se encuentran en dos marcos teóricos. En primer lugar, el **modelo neuro-maduracional** postula que el aprendizaje y la conducta son independientes del contexto en la ontogenia temprana. Esta hipótesis se basa en que el aprendizaje de contexto es dependiente de la función hipocampal, y que el HPC no llega a la maduración completa sino hasta la infancia tardía, que corresponde en modelos animales de rata a una edad posterior al destete, como se describió en la sección anterior. Por otro lado, el segundo modelo que aborda el estudio del aprendizaje contextual, el **modelo ecológico**, considera a los infantes como organismos completamente maduros, ya que sus capacidades cognitivas y comportamentales les permiten adaptarse de manera apropiada a las demandas del entorno específico en el que se encuentran. Este segundo modelo predice que existen variaciones ontogenéticas significativas en el aprendizaje y la memoria debido a diferencias en el desarrollo de lo que se puede percibir durante los episodios de aprendizaje. Estas diferencias podrán resultar en variaciones a diferentes edades dependiendo de la demanda específica de la tarea que se utilice como parámetro. El marco teórico de este modelo resalta que las capacidades de aprender y de retener información acerca del contexto en infantes no se consideran más débiles que en adultos, ya que las mismas les permiten a los organismos infantes responder de manera adaptativa al medio ambiente en el que se desarrollan en cada etapa ontogenética. Los principales contribuyentes a este modelo (y sus colaboradores) son el Dr. N.E. Spear en los modelos animales en roedores y C. Rovee-Collier en modelos en humanos infantes pre-verbales. En ambos modelos, estos autores han demostrado que cuando los infantes son evaluados en tareas en las que las demandas están adaptadas a sus capacidades perceptuales y motoras, son capaces de adquirir formas complejas de aprendizaje y responder adecuadamente en tareas consideradas HPC-dependientes (Revilla et al., 2014).

Si bien el debate acerca de cuál de estos enfoques es más valioso en el estudio de la Psicobiología del Desarrollo, la perspectiva neuro-maduracional aún guía la investigación de una gran parte de este campo.

En este sentido, y como se mencionó con anterioridad, algunos autores de la corriente neuro-maduracional, proponen que la capacidad de adquirir ciertos aprendizajes que dependen del HPC, como el condicionamiento de huella o el condicionamiento contextual, no emerge hasta después del destete en la rata (hacia el día postnatal 23) (Foster y Burman 2010; Jerry W Rudy 2009; Stanton 2000; Rainekei et al. 2009; Jerry W Rudy y Morledge 1994). Se han propuesto dos explicaciones para dar cuenta de las dificultades que muestran las crías de rata para adquirir aprendizaje contextual de miedo: (1) Algunos autores sostienen que hay dos sistemas de memoria que se encuentran disociados durante la ontogenia: el sistema de memoria a corto plazo, que sustenta el aprendizaje contextual que ocurre inmediatamente después del condicionamiento, pero pierde información rápidamente, y el sistema de memoria a largo plazo, que retiene información indefinidamente pero requiere de un periodo de consolidación que se produce horas después del entrenamiento. Según Rudy y colaboradores, las ratas de 17 días de vida postnatal (PN17) tienen acceso únicamente al sistema de memoria a corto plazo, siendo incapaces de construir y consolidar una representación contextual disponible a largo plazo, mientras que ratas de PN23 disponen de ambos sistemas de memoria (J. W Rudy y Morledge 1994; J. J. Kim and Fanselow 1992). (2) Otros autores sostienen que la diferencia en los niveles de respuesta de miedo contextual observados entre crías PN17 y PN23 no se debe a diferencias cualitativas en los sistemas de memoria, sino a la falta de madurez de los sistemas sensoriales de las crías más jóvenes, lo que va en el sentido del modelo ecológico. Esta hipótesis se basa en que los contextos habitualmente empleados en esta edad carecen de claves salientes (como olores) que puedan ser fácilmente percibidas por crías de PN17, ya que, a esta edad, recientemente abrieron los ojos. Existen datos que apoyan esta hipótesis, mostrando, por ejemplo, que animales de PN17 adquieren una fuerte respuesta condicionada de miedo contextual si son entrenados y evaluados en contextos que contienen claves olfativas (Pugh y Rudy 1996; Esmorís-Arranz, Méndez y Spear 2008; S M Brassler y Spear 1998; S M Brassler

and Spear 2004). Por otra parte, una serie de trabajos recientes que utilizaron el paradigma de facilitación del aprendizaje contextual (FCPC), mostraron evidencias de que, si bien el efecto de facilitación emerge hacia el día PN23 en la rata, animales que son pre-expuestos en el PN17 y posteriormente condicionados y evaluados en el PN23/PN24, expresan respuestas condicionadas de miedo. Según estos autores estos resultados sugieren que el HPC es funcional en el PN17, pero la integración de esta estructura con la amígdala se completa y madura hacia el PN23 (Foster y Burman, 2010; Schiffino et al., 2011a). Una importante crítica que se puede hacer a estos últimos estudios es que sus conclusiones se basan en experimentos en los que emplearon una magnitud de descarga muy elevada (1.5mA). Como antes se ha mencionado, una descarga de 1mA ya genera respuestas condicionadas de miedo en animales adultos entrenados en el protocolo de descarga inmediata (Bevins y Ayres, 1995). Sin embargo, para detectar esta respuesta condicionada es necesario hacer un análisis detallado de múltiples variables dependientes durante la evaluación. En ninguno de los estudios mencionados (Foster y Burman, 2010; Schiffino et al., 2011a) se analizó una variable dependiente alternativa al porcentaje de tiempo (de los cinco minutos que duró el test) que los animales emitieron la respuesta de congelamiento. Además, en estos estudios no se incluyeron grupos controles adecuados (tales como: sin descarga eléctrica) para poder concluir con certeza que el efecto de facilitación por la pre-exposición no se observa hasta el PN23. Es importante señalar que, incluso antes del PN17 se han encontrado evidencias de facilitación por pre-exposición en otros paradigmas de condicionamiento (como la aversión condicionada al sabor) (Chotro y Alonso, 2003). Finalmente, el contexto empleado en los estudios mencionados (Foster y Burman, 2010; Schiffino et al., 2011a) carece de claves olfativas distintivas que pudieran ser percibidas por las crías PN17. Por lo tanto, puede considerarse que los experimentos de estos estudios tienen ciertos problemas metodológicos que ponen en duda la validez de sus conclusiones. En la construcción de nuestra hipótesis de trabajo, discutiremos acerca de algunas consideraciones que hay que tener en cuenta en el diseño de proyectos que estudien la ontogenia del aprendizaje contextual, que harán énfasis en herramientas tomadas principalmente del modelo ecológico.

### 1.3 Receptores glutamatérgicos N-Metyl-D-Aspartato (NMDA)

A través del cerebro y la espina dorsal, el aminoácido *glutamato* media la vasta mayoría de la neurotransmisión excitatoria. El glutamato actúa en diversos receptores de membrana, incluyendo a receptores metabotrópicos y receptores ionotrópicos glutamatérgicos. Los últimos, componen canales permeables a cationes, que pueden ser subdivididos en tres grandes familias: receptores AMPA (AMPA), kainato y N-Metyl-D-Aspartato (NMDAr).

Desde su descubrimiento hace treinta años atrás, los NMDAr han atraído la atención de los neurocientíficos debido al rol central que ejercen en el sistema nervioso (Lau y Zukin, 2007). Estos canales iónicos son mediadores esenciales de la plasticidad cerebral y son capaces de convertir patrones específicos de actividad neuronal en cambios a largo plazo en la estructura (y función) de las sinapsis, que se cree son la base de las funciones cognitivas superiores, tales como el *aprendizaje y la memoria* (Strong et al., 2014; Sanhueza y Lisman, 2013; Gilmartin y Helmstetter, 2010). La disfunción de los NMDAr está relacionada en varias patologías neurológicas y desórdenes psiquiátricos, incluyendo infartos cerebrales, dolor, enfermedades neurodegenerativas, esquizofrenia, entre otros, por lo que existe un gran interés en el desarrollo de nuevas drogas que tengan a estos receptores como blancos terapéuticos. No solamente por jugar roles centrales en las funciones cerebrales como plasticidad sináptica, sino porque participan también en procesos de excitotoxicidad, estos receptores están cuidadosa y ampliamente regulados a través de diversos mecanismos, incluyendo la acción de iones como el magnesio, zinc, protones y calcio; de aminoácidos como glutamato, aspartato, glicina, D-serina, etc. (Dingledine et al., 1999; Aarts y Tymianski, 2004), entre otros mecanismos regulatorios más complejos, como la fosforilación del receptor, movimiento intramembrana, internalización, reciclado de subunidades (Tovar y Westbrook, 1999) y tráfico intracelular (Paoletti et al., 2013).

Se ha establecido que el HPC participa en la adquisición y consolidación del aprendizaje contextual a través de los NMDAr (Sanders et al., 2003; Stote y Fanselow, 2004). Estos receptores han recibido considerable atención debido a que, tanto sus



niveles de expresión, como su localización subcelular, afectan procesos que subyacen al aprendizaje y la memoria, así como también a diversas formas de plasticidad sináptica (Pérez-Otaño y Ehlers; Gardoni et al., 2009a). Se ha demostrado la participación de estos receptores en la adquisición de este aprendizaje a través del empleo de fármacos antagonistas administrados directamente en el área CA1 del HPC, y de modelos genéticos de delección (Shimizu et al., 2000; Young et al., 1994). A su vez, manipulaciones genéticas para aumentar la función de estos receptores resultan en una mejora en el desempeño de pruebas de aprendizaje contextual (Tang et al., 1999). El rol específico que se ha propuesto para los NMDAr en el aprendizaje contextual es el de la formación de la representación configuracional del contexto (Stote y Fanselow, 2004). En este sentido, el bloqueo farmacológico de los NMDAr previene el efecto del FCPC en roedores post-destetados, lo que fue hallado en sujetos adultos y esto mismo ha sido reproducido en animales post-destetados, tanto al recibir antagonistas directamente en el HPCd, como por administración sistémica. Es importante resaltar que este efecto aún no ha sido estudiado en roedores *pre-destetados*. La inhibición de los NMDAr durante la exploración del contexto de entrenamiento, previo a la ocurrencia del condicionamiento, disminuye los beneficios que otorga la exploración en sí misma, indicando que este aprendizaje es específico de contexto (Stote y Fanselow, 2004; Landeira-Fernandez et al., 2006).

Se asume que la potenciación a largo plazo (LTP) dependiente de los NMDAr en el HPC conduce a la adquisición de miedo condicionado lo que es sinónimo de aprendizaje y memoria. Consecuentemente, la manipulación de estos receptores es beneficiosa para los procesos cognitivos (Maren y Quirk, 2004; Maren, 2001; Collingridge et al., 2013a, 2013b).

#### *Diversidad en la composición de los NMDAr y su expresión*

Numerosos estudios han indicado la gran diversidad funcional y estructural que tienen los NMDAr, que es debida a la composición molecular de las subunidades que los conforman, las propiedades biofísicas y farmacológicas de cada combinación de subunidades, los complejos con los que interactúan y por su

localización subcelular. Además, durante el desarrollo, la composición de las subunidades de los mismos varía de manera regional, al igual que en condiciones patológicas específicas (Lau y Zukin, 2007; Paoletti et al., 2013). Se conoce a su vez que, incluso en sinapsis maduras, el contenido de las subunidades que forman a los canales varía dependiendo de la actividad neuronal.

La importancia de estudiar estos receptores en el marco de modelos experimentales de aprendizaje y memoria reside en que la activación de los mismos produce una cascada de eventos que resulta en la síntesis de proteínas necesarias para mantener las modificaciones sinápticas y producir cambios a largo plazo que son críticos para el aprendizaje (Barrientos et al., 2002; Stote y Fanselow, 2004), y la formación de circuitos neuronales durante el desarrollo (Dumas, 2005).

Los NMDAr se ensamblan como hetero-tetrámeros que difieren en la composición de sus subunidades. A la fecha, se conocen siete subunidades que pertenecen a tres familias de acuerdo a homologías en sus secuencias y se han identificado la subunidad **NR1**, cuatro diferentes subunidades del tipo **NR2** (NR2A, NR2B, NR2C y NR2D, siendo las variantes NR2A y NR2B las predominantes en corteza e HPC a lo largo de la vida postnatal) que son codificadas por cuatro genes diferentes, y dos subunidades del tipo **NR3** (NR3A y NR3B) codificadas a su vez, por dos genes diferentes (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004; Hansen et al., 2010; Henson et al., 2010; PAOLETTI y NEYTON, 2007). La cantidad total de aminoácidos por subunidad varía entre 900 a 1480, todas las subunidades comparten una estructura topológica compuesta por un dominio extracelular amino (N)-terminal, tres (M1, M3 y M4) y medio (loop M2) segmentos transmembrana y un dominio intracelular carboxilo (C)-terminal (CDT) (Figura 7). La diferencia en el tamaño de cada subunidad se encuentra en el largo del dominio CDT, región que está involucrada en el tráfico del receptor y en el acoplamiento a complejos de señalización. Para la formación de un receptor funcional, se necesita que el mismo esté compuesto, al menos, por dos subunidades NR1 y una combinación de NR2 y/o NR2/NR3, debido a que la activación del receptor es **dual** y requiere unirse a glicina (a través de la subunidad NR1) y a glutamato (a través de la subunidad NR2). Los NMDAr constituyen canales permeables a Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>, con un poro central que se encuentra bloqueado por Mg<sup>2+</sup> de modo voltaje-

dependiente. La propiedad más destacada de estos receptores es que comparten elementos que les permiten funcionar como canales iónicos unidos a ligandos, ya sea de manera dependientes de voltaje y/o dependientes de actividad. Esta propiedad se relaciona con el bloqueo del canal por  $Mg^{2+}$ , el cual es transitoriamente relevado cuando la membrana sináptica se despolariza. Luego de la unión al ligando, el canal aumenta la conductancia por el  $Ca^{2+}$ . La sobreestimulación de los receptores glutamatérgicos produce eventos excitotóxicos responsables de la generación de neurotoxicidad.

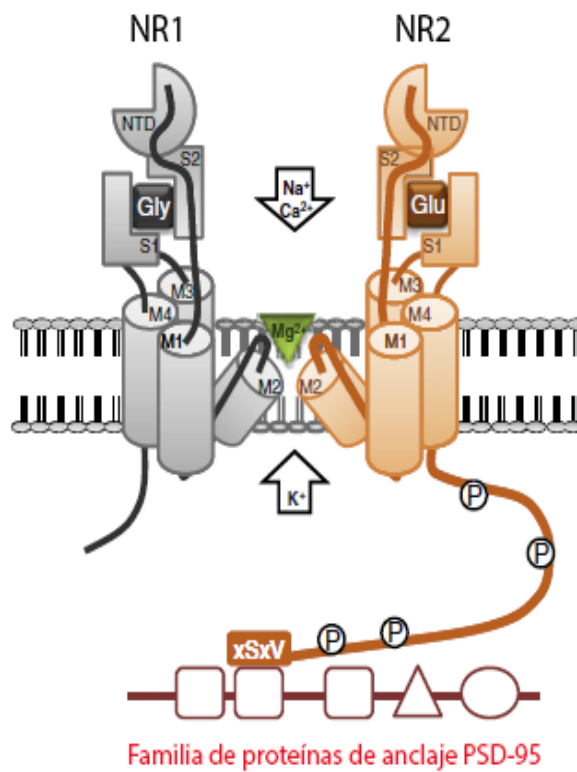


Fig.7: **Conformación de los NMDAr.** La figura esquematiza las distintas subunidades principales de los NMDAr, NR21 y NR2, las cuales son necesarias para la actividad del receptor, debido a que requieren de una activación dual (unión a glicina por NR1 y unión a glutamato por NR2). La subunidad NR2 le provee las diferentes propiedades biofísicas al receptor. La misma tiene una dominio intracelular de unión a proteínas de anclaje que regulan, a su vez, la localización subcelular de estos receptores. Modificado de Bard & Groc 2011.

Las distintas combinaciones entre las subunidades, cada una con distintas características electrofisiológicas y farmacológicas, resultan en receptores con múltiples funciones. La composición de subunidades NR2, le confiere al canal propiedades biofísicas específicas. Esta subunidad (NR2), tal como se observa en la figura 7, posee un largo dominio C-terminal, que es el sitio en el que ocurren múltiples interacciones y fosforilaciones (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004; Chen y Roche, 2007), entre estas interacciones, miembros de la familia de proteínas de anclaje PDZ, particularmente de la familia PSD-95 (Proteína de la Densidad Postsináptica de 95KDa), constituyen complejos de interacción bien caracterizados, cuyos mecanismos y función serán descritos en secciones siguientes, y están principalmente relacionados con la localización subcelular y tráfico de los receptores NMDA. Así, el contenido sináptico de los diferentes subtipos de NMDAr cambia durante procesos fisiológicos claves como el desarrollo y maduración del cerebro, las experiencias sensoriales y la plasticidad sináptica (Bard y Groc, 2011).

Además de presentar diferencias en la expresión de sus subunidades durante el desarrollo (que se describirán posteriormente), los subtipos de NMDAr varían acorde a su localización subcelular. Las diferentes subunidades del receptor se ensamblan en el retículo endoplásmico rugoso (RER) y se transportan en vesículas a las dendritas donde se insertan en las espinas, a veces directamente en la membrana sináptica, dependiendo del estímulo. Los NMDAr se transportan hacia y desde la sinapsis a través de diversos mecanismos dependiendo de la composición de sus subunidades, y, de acuerdo a su localización, existen 3 pools de NMDAr: (i) el pool sináptico, (ii) el pool extrasináptico, que se encuentran en la membrana alejados de la sinapsis y (iii) el pool no-sináptico, que reúne a los NMDAr que se encuentran en el cuerpo celular y las dendritas. El intercambio entre cada uno de estos sitios es dinámico y la proporción de receptores en cada uno de ellos está relacionado a la actividad (Groc et al., 2006; Baez et al., 2013; Cercato et al., 2014).

Típicamente los NMDAr se encuentran en sitios postsinápticos. En el cerebro adulto, los NMDAr *sinápticos* predominantes son di-heteroméricos (NR1/NR2A) o tri-heteroméricos (NR1/NR2A/NR2B). Por otra parte, los sitios *extra-* y *peri-sinápticos* se encuentran enriquecidos por los subtipos NR1/NR2B. Los NMDAr son móviles,

particularmente los subtipos que contienen NR2B, y debido a esta característica pueden difundir lateralmente a los sitios extrasinápticos, permitiendo la fina regulación del número y la composición de los mismos (Punnakkal et al., 2012; Tovar y Westbrook, 1999).

Cuando los NMDAR se activan y permiten el ingreso de los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{K}^+$ , los mismos ejercen su acción ionotrópica. Además, el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos receptores activa numerosas cascadas de señalización que le otorgan a los NMDAR un carácter metabotrópico. Si bien la respuesta de los NMDAR contribuye poco a la amplitud del pico del potencial postsináptico excitatorio (EPSP) o a la corriente (EPSC), la acción lenta de los NMDAR afecta a la duración de la respuesta sináptica que influencia la tasa de sumación durante la estimulación de alta frecuencia. Así, la prolongación de la respuesta sináptica provee una mayor ventana temporal para que actúen estímulos provenientes de vías aferentes independientes, en el mismo blanco postsináptico, permitiendo que se puedan asociar (Dumas, 2005). Se propone que la plasticidad resultante de la co-activación heterosináptica, es la base de la asociación entre estímulos correlacionados en mapas topográficos o mapas neuronales alocléricos (Nakazawa et al., 2004). De manera similar, se ha establecido que la plasticidad dependiente de NMDAR permite que las neuronas asocien un EC con EI para la generación de una RC durante el condicionamiento Pavloviano. En general, hay factores en el desarrollo que influyen la dirección, magnitud, duración y capacidad asociativa de la plasticidad sináptica que son reguladores importantes de las habilidades en el aprendizaje y la memoria. El estudio de estos fenómenos durante el desarrollo se abordarán en la siguiente sección.

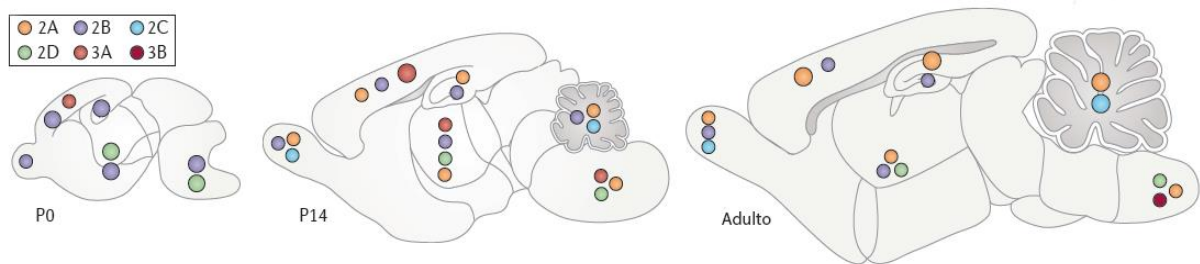
Como se describió anteriormente, la ocurrencia de LTP en el HPC, en mecanismos de aprendizaje y memoria, es inducida por la activación de los NMDAR, pero particularmente por receptores que contienen a la subunidad NR2B (Berberich et al., 2005b, 2007; Müller et al., 2013; Chen et al., 2014). Se ha demostrado que la sobreexpresión de los NR2B en la corteza cerebral y en el HPC en un modelo de ratón genéticamente modificado, media el aumento en procesos de LTP y el aprendizaje espacial dependiente de HPC, como la prueba de reconocimiento de objetos noveles y el condicionamiento de miedo contextual, además del condicionamiento a claves

(Chen et al., 2014; Tang et al., 1999). Se ha relacionado la sobreexpresión de la subunidad NR2B de los NMDAr con la ocurrencia de eventos de LTP (Wong et al., 2002). Es importante considerar que la subunidad NR2B tiene un sitio de fosforilación en la tirosina Tyr-1472 (Y1472) que se activa durante el LTP en el HPC, y se ha propuesto que es un sitio de fosforilación que modularía la plasticidad sináptica del HPC (Nakazawa et al., 2001; Brigman et al., 2010). En un protocolo de condicionamiento de miedo Pavloviano, se observó un aumento significativo en la fosforilación en Y1472-NR2B, luego de la asociación entre el contexto y la descarga eléctrica en el condicionamiento, y no en respuesta de la descarga eléctrica por sí misma, sugiriendo que no se desencadenarían cambios en la fosforilación de la subunidad NR2B en el sitio vinculado (Y1472) a la dinámica de los NMDAr en el “déficit del shock inmediato”. El mismo está descrito en la literatura como la ausencia de la formación de la representación del contexto, la cual es dependiente de HPC durante el aprendizaje contextual (Isosaka et al., 2008). Esta información propone que la acción de la subunidad NR2B es importante en la actividad mediada por los NMDAr en instancias que trascienden la presentación del EI durante el condicionamiento.

#### *Diferencias en el tipo y ubicación de los receptores NMDA durante el desarrollo ontogenético*

La composición de las subunidades de los NMDAr es plástica y resulta en una gran diversidad de subtipos del receptor. Cada subtipo presenta diferentes propiedades biofísicas y farmacológicas, además de participar en eventos de señalización específicos por su composición, por lo que existe un gran interés en determinar las funciones en el SNC de los subtipos individuales, tanto durante el desarrollo normal como en condiciones patológicas. Las modificaciones en la composición de los NMDAr ocurren en respuesta a la actividad neuronal o las experiencias sensoriales, y se pueden observar durante el desarrollo así como también en sinapsis adultas. Los cambios en la composición de los receptores pueden ser rápidos (en la escala de minutos) y tener influencias profundas en el funcionamiento de las sinapsis y redes neuronales (Paoletti et al., 2013).

Durante el desarrollo postnatal temprano, los NMDAr cambian la composición de sus subunidades, pasan de contener una mayor cantidad de subunidades NR2B en las primeras 2 semanas postnatales, a contener predominantemente NR2A. Este intercambio de subunidades ocurre en todo el SNC y está conservado evolutivamente desde anfibios hasta mamíferos, y se da en una ventana temporal que coincide con la maduración de las sinapsis y el refinamiento de circuitos. Mientras tanto, los niveles de NR1 y de ARNm de NR2A van aumentando hasta alcanzar niveles elevados en el día PN20 de la rata (Dumas, 2005; Wang et al., 2014). Por otro lado, la subunidad NR2D se expresa transientemente en neonatos y decae rápidamente restringiéndose en el adulto a niveles muy bajos y ubicados en el mesencéfalo y diencefalo. NR2C aparece tarde en el desarrollo, aumentando selectivamente en el cerebelo y bulbo olfatorio a partir del PN11. Las subunidades NR3A y NR3B también presentan perfiles ontogenéticos diferenciales. La expresión de NR3A presenta un pico en la vida postnatal temprana y declina progresivamente, mientras que NR3B aumenta lentamente a lo largo del desarrollo y, en el adulto, se expresa en niveles elevados en motoneuronas principalmente (Figura 8).



**Fig.8: Comparación de la expresión de las subunidades de NMDAr a lo largo del desarrollo en el cerebro de roedores.** Se esquematizan en la figura los cambios predominantes en la expresión de subunidades que componen a los NMDAr en el cerebro postnatal temprano (PN0), a las 2 semanas postnatales (PN14) y en el cerebro adulto, en donde se grafica el cambio de predominancia de NMDAr conteniendo principalmente a la subunidad NR2B en el desarrollo temprano, a la presencia de NMDAr conteniendo principalmente a NR2A en el adulto. Modificado de Paoletti et al. 2013.

La concentración y ubicación específicas de las subunidades NR2B, NR2D y NR3A, que se expresan elevadamente en el desarrollo temprano, sugiere fuertemente que son importantes para procesos claves como son la *sinaptogénesis* y la *maduración sináptica* (Henson et al., 2010; Pachernegg et al., 2012; Paoletti et al., 2013).

Las alteraciones en el desarrollo de la expresión de RNAm de NR2A y NR2B, ocurren en paralelo a cambios en sus niveles de proteína y a la aparición de NMDAR con baja afinidad a los antagonistas selectivos de NR2B. Además, a medida que el animal crece, los NMDAR que contienen a la subunidad NR2A se localizan en las sinapsis, mientras que los NMDAR que contienen a la subunidad NR2B se relocalizan en sitios extrasinápticos. En paralelo, la duración de la respuesta de los NMDAR disminuye, y disminuye también la plasticidad sináptica (Zhang et al., 2008b; Yuan et al., 2009; Paoletti y Neyton, 2007; Paoletti et al., 2013).

En el cerebro adulto, principalmente en estructuras relacionadas a funciones superiores, como el HPC y la corteza, las subunidades NR2A y NR2B son las predominantes en los NMDAR, indicando que las mismas tienen un rol central en la función sináptica y plasticidad.

#### *Métodos generalmente utilizados para lesionar o silenciar la acción del HPC durante el aprendizaje contextual, a través de la manipulación de los NMDAR*

A partir de los primeros reportes que indicaron que el daño al HPC dificulta o en ciertos casos impide selectivamente el condicionamiento de miedo contextual, pero no impide el condicionamiento a claves discretas, por ejemplo auditivas, el estudio del condicionamiento de miedo contextual ha sido de gran interés para muchos investigadores que se ocupan de estudiar el rol del HPC en la memoria (Barrientos et al., 2002; Kim y Fanselow, 1992). Así, se han realizado numerosas intervenciones en este sistema durante el proceso de condicionamiento, como por ejemplo el bloqueo de la síntesis de proteínas luego de la sesión de entrenamiento. Además, al ser los NMDAR los candidatos propuestos responsables de esta tarea en el HPC, se han abordado estudios para silenciar, sobreexpresar, bloquear o interferir con los mismos.



Existen diversos reportes que indican que el daño al HPC de manera *anterógrada* (previo al condicionamiento) no siempre impide el condicionamiento contextual, y que además depende de la naturaleza de la lesión: si es *electrolítica* o *neurotóxica*. Así, lesiones electrolíticas anterógradas en el HPCd impiden el aprendizaje de miedo contextual, mientras que lesiones neurotóxicas anterógradas no lo afectan. También hay datos de *lesiones retrógradas* (posteriores al condicionamiento) realizadas en el HPCd, producidas por lesiones tanto electroíticas como exitotóxicas, que produjeron un impedimento en el condicionamiento de miedo contextual. Además, la *inhibición de la síntesis de proteínas* por inyecciones de anisomicina localmente en el HPCd luego del condicionamiento previene la consolidación de la memoria de miedo para el condicionamiento al contexto pero no afecta el condicionamiento a claves discretas. Otras estrategias han sido exploradas para estudiar el rol del HPC en diversas condiciones experimentales, como el uso de Colchicina, que es una neurotoxina que depleta a las neuronas administrada en el HPCd y el HPCv, o el uso de Muscimol que provoca, mediante un daño electrolítico, una inactivación reversible del HPCd si se realiza por inyecciones locales (Ji y Maren, 2005). En general los resultados de estas pruebas comprometen al HPC en el rol de aprender acerca del contexto, si bien algunos índices de miedo en los paradigmas tradicionales no se encuentran alterados, por lo que se concluye en estos trabajos que hay otros mecanismos que median el aprendizaje cuando la función del HPC está alterada, que son comparables a los mecanismos propuestos para la asociación de estímulos discretos.

Manipulaciones farmacológicas que tienen como blanco a los NMDAr durante las diferentes sesiones de los paradigmas de condicionamiento de miedo contextual, han sido realizadas para evaluar la implicancia de los mismos en este aprendizaje. Cuando se administran drogas que antagonizan a los NMDAr en humanos, de manera crónica, se inducen cambios comportamentales que mimetizan algunos síntomas de la esquizofrenia, tales como alucinaciones o conductas paranóicas; y, en roedores, se han observado además comportamientos del tipo psicóticos y alteraciones sensoriales y motoras, como hiperactividad, además de disfunciones en el aprendizaje y la memoria (Figueredo et al., 2008; Lim et al., 2012). En general, se utilizan en manipulaciones farmacológicas a nivel local y sistémico, que bloquean o inactivan selectivamente a los

receptores. Entre ellos, la *Dizocilpina* ó **MK-801** es un agente antagonista de los NMDAr, que ejerce diversas acciones fisiológicas que involucran al SNC, como por ejemplo, actúa como anestésico y anticonvulsivo. Se conocen diferentes efectos que provocan la administración de MK-801, como la disminución en el peso corporal, alteraciones en la actividad locomotora y la acción pro-apoptótica de la droga, si bien los protocolos de administración y la dosis utilizada son parámetros fundamentales para determinar la acción de la misma. La administración crónica temprana de MK-801 se ha propuesto como potencial modelo de desordenes psicóticos y neuropatologías relacionadas a la esquizofrenia (para revisión ver Lim et al. 2012).

El MK-801 se une a dos sitios específicos del canal iónico formado por las subunidades que componen al NMDAr, de una manera voltaje dependiente, que requiere la despolarización de la neurona (Kovacic y Somanathan, 2010). El mismo actúa como un antagonista NMDA no competitivo, y es más potente y selectivo que otros fármacos similares como la fenciclidina. Se ha establecido que dosis bajas agudas de esta droga pueden actuar como neuroprotectores, si bien a partir de la administración de MK-801 en dosis de 0.3mg/Kg, se han encontrado indicios de apoptosis (Coan et al. 1987; Liu et al. 2009; Kovacic & Somanathan 2010). Se han indicado diversas y numerosas acciones que ocurren por la administración *in vivo* de la dizocilpina: puede actuar como anestésico, anticonvulsivo, modulador de la actividad cerebral, neurotóxico o neuro protector (dependiendo de la dosis empleada), efectos motores, mediar la interacción con receptores, comportamiento, aprendizaje y memoria, entre otros, y se han estudiado en una gran variedad de especies.

Diversos estudios han sido orientados a evaluar en diferentes modelos el rol del HPC en el aprendizaje contextual, a través del bloqueo de la acción de los NMDAr tras la pregunta acerca de si es posible sostener el aprendizaje contextual en asociaciones elementales de claves discretas de una manera HPC-independiente. Así Chadman y colaboradores (Chadman et al., 2006; Watson y Stanton, 2009) probaron en sus estudios el efecto de diferentes dosis de MK-801 (0.056, 0.1 y 0.18mg/Kg) de manera aguda, en diferentes puntos del desarrollo (PN21, PN26 y PN30) en roedores, bajo diferentes formas de administración (intra HPCd en Watson et al., 2010 vs. intraperitoneal en Chadman et al, 2006). Las dosis utilizadas se consideran inocuas para detectar efectos motores en los sujetos, y subumbrales para la detección de

mecanismos de apoptosis, siendo comúnmente utilizadas en la literatura con el fin de lograr un efecto amnésico (Griesbach y Amsel, 1998; Highfield et al., 1996; van der Meulen et al., 2003). Encontraron que la dosis más elevada fue efectiva en impedir la adquisición de aprendizaje espacial en el laberinto-T. A partir de estos estudios, los autores concluyen que los NMDAr son necesarios para el desempeño de tareas de aprendizaje en el período peri-destete (Chadman et al., 2006; Watson y Stanton, 2009).

En otras tareas de aprendizaje contextual como el paradigma de FCPC, que fue utilizado como metodología central de esta tesis, manipulaciones realizadas durante la fase de preexposición han sido orientadas a estudiar si los NMDAr participan en el condicionamiento a una descarga inmediata, en sujetos de PN23, administrando sistémicamente una dosis de 0.1mg/Kg de MK-801 (Burman et al., 2009) o intra-HPCd (Schiffino et al., 2011a), en ambos casos 30 minutos antes de la fase de preexposición. Ambos trabajos indicaron que ratas destetadas (PN23) utilizan una estrategia dependiente de HPC para expresar miedo al contexto, ya que la administración de MK-801 durante la preexposición impidió la facilitación típicamente observada en el FCPC (Foster y Burman, 2010; Burman et al., 2009; Schiffino et al., 2011a; Robinson-Drummer y Stanton, 2014); resultados similares a los encontrados en sujetos adultos por administraciones locales y sistémicas de MK-801 y AP5 (otro antagonista NMDA) (Matus-Amat et al., 2007; Stote y Fanselow, 2004). En sujetos predestetados, se asume que el HPC no ha alcanzado su madurez (Rudy y Morledge, 1994; Pugh y Rudy, 1996), o que la integración entre los circuitos necesarios para la adquisición del aprendizaje contextual (HPC y A) no está completa (Stanton, 2000; Foster y Burman, 2010; Schiffino et al., 2011a), por lo tanto no hay trabajos que aborden el estudio de las implicancias del sistema de neurotransmisión glutamatergica mediada por NMDAr en el aprendizaje de miedo contextual a estas edades, lo cual constituye el segundo objetivo específico de esta tesis.

#### *Interacción de los NMDAr con proteínas regulatorias*

El dominio citoplásmico CDT de la subunidad NR2 (Figura 7), es la región menos conservada entre las distintas subunidades de los NMDAr, por lo que constituye el sitio de acción de diversos reguladores específicos que tienen relación con el tráfico, localización y señalización del receptor NMDA. Tanto la exportación desde el retículo endoplásmico (RE), como la inserción en la membrana sináptica de los NMDAr, varían de acuerdo a los diferentes dominios C-terminales de NR1, que es un proceso regulado principalmente por la actividad neuronal. Similarmente, los motivos contenidos en las CDTs de las subunidades NR2 (A y B) controlan específicamente el tráfico de los NMDAr intracelular y el tráfico en la superficie sináptica. En general, se ha establecido que la retención de la subunidad NR2B en la sinapsis requiere que su dominio C terminal esté asociado a la familia de las guanilato quinasas asociadas a membranas (MAGUKs). En contraste, las subunidades NR2A se localizan en sitios postsinápticos aún en ausencia de interacción con estas proteínas (Paoletti et al., 2013). La movilidad de las diferentes subunidades a través de la superficie sináptica también difiere entre los subtipos del receptor. Los que contienen NR2B pueden moverse hacia la sinapsis, y salir de la misma, más fácilmente que los que contienen NR2A. La fosforilación de NR2B en los sitios de unión a PDZ por la quinasa caseína 2 (CK2), que interrumpe la asociación de esta subunidad con las proteínas de anclaje, es la responsable de esta capacidad de movilizarse (Sanz-Clemente et al., 2013). Otras quinasas, incluyendo a la Cdk5 (quinasa dependiente de ciclina 5), proteína quinasa A (PKA), C (PKC) y tirosinas quinasas SRC, fosforilan sitios específicos de la subunidad NR2 y participan de este modo en el tráfico y la señalización específicas de cada subunidad (Lisman et al., 2012). A continuación, se describen interacciones específicas de la subunidad NR2 con 2 proteínas que participan de mecanismos regulatorios y vías de señalización que están involucradas en el objeto de estudio de esta tesis.

#### NMDAr – PSD95

Los NMDAr sinápticos se encuentran organizados y restringidos a complejos macromoleculares de señalización constituyendo la densidad post-sináptica (PSD), especialización electrodensa en la que se encuentra una alta concentración de

receptores glutamatérgicos, canales iónicos, quinasas, fosfatasa, y proteínas de anclaje, entre otras (Lau y Zukin, 2007). La subunidad NR2 que conforma a los NMDAr funcionales, tal como se describió en la sección correspondiente, presenta un dominio C-terminal de gran tamaño que es el sitio donde ocurren diversas fosforilaciones e interacciones (Chen y Roche, 2007). Las proteínas de anclaje que conservan un dominio PDZ constituyen factores que interactúan con este dominio. Las proteínas pertenecientes a la familia de las MAGUKs, que contienen el dominio de interacción PDZ, se encuentran codificadas por 4 genes diferentes: PSD-95/SAP90, PSD-93/Chapsina110, SAP102 y SAP97. Estas proteínas se caracterizan por contener un tándem de 3 dominios PDZ, un sitio SH3 (Homólogo a Src 3) y un dominio GK (tipo-guanilato quinasa). PSD-95 y PSD-93 poseen además en su dominio N-terminal dos residuos de cisteína que son los sitios en donde ocurren reacciones de palmitoilación que guían a las proteínas hacia la densidad postsináptica. Se han demostrado las interacciones que existen entre las subunidades NR2 y los 4 miembros de la familia de las PSD-95, en el HPC específicamente, NR2A y NR2B interactúan con PSD-95, PSD-93 y SAP102 (Bard y Groc, 2011). Esta interacción con la familia de las PSD-95 favorece la expresión en superficie de las subunidades NR2, así como su estabilización en la membrana, tanto sináptica como extra/peri-sináptica donde ocurren los eventos de reciclado del receptor.

Dentro de esta familia, específicamente, la PSD-95 (por su peso de 95kD), es una proteína esencial de anclaje que recluta a las subunidades NR2A y NR2B a la PSD. Este complejo NMDAr/PSD-95 ha sido involucrado en la regulación de diversos procesos de plasticidad sináptica (Gardoni et al., 2009a). PSD-95 es una proteína de anclaje muy enriquecida en la PSD y puede unirse directamente a una o más subunidades del NMDAr (Kornau et al., 1995; Kim y Sheng, 2004), e indirectamente a subunidades del receptor AMPA vía la proteína Stargazina. Esta interacción es crítica para mediar los cambios sinápticos a largo plazo como LTP y LTD (Chen et al. 2000), y se considera crítica para el aprendizaje (Migaud et al., 1998). La vía que controla la modificación bidireccional de la fuerza de las sinapsis glutamatérgicas son reguladas por PSD-95 (Komiyama et al., 2002), que también modula la internalización de los NMDAr (Roche et al., 2001).

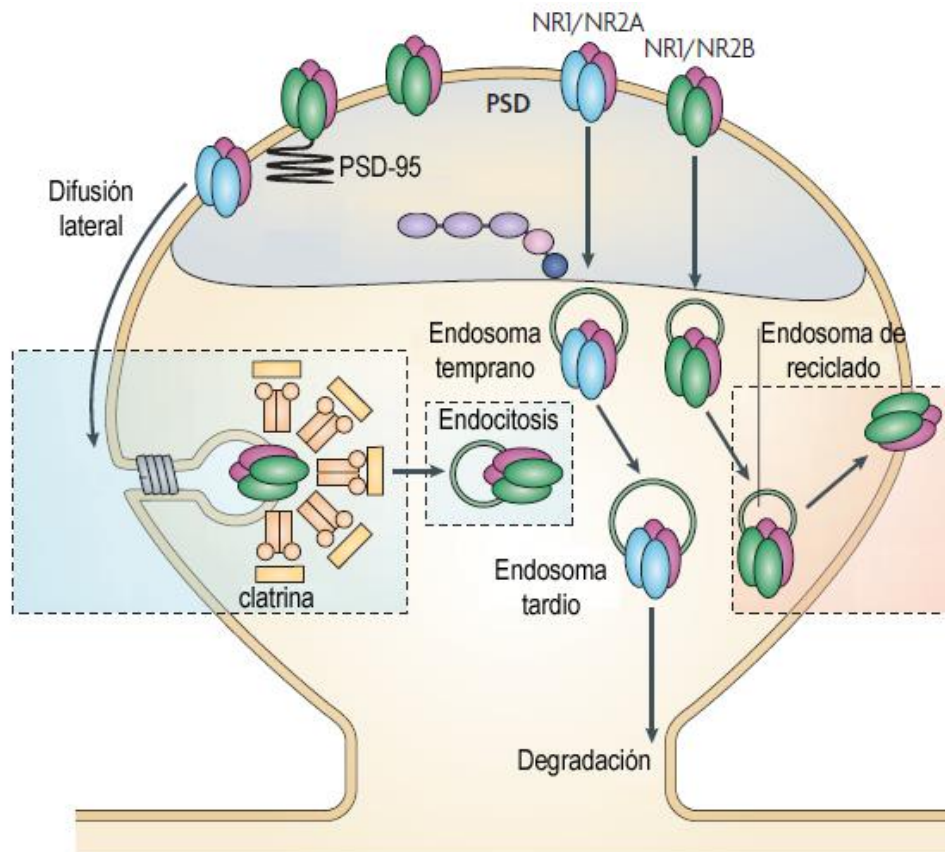


Fig. 9: **Regulación de los receptores NMDA.** La subunidad NR2B se asocia a la proteína ancladora, PSD-95 y la retiene en la PSD. La internalización de los receptores de NMDA, se piensa, ocurre por difusión lateral de los receptores desde la sinapsis hacia la zona endocítica. Después de la endocitosis los NR2A son blancos de degradación, mientras que los NR2B se reciclan. Modificado de (Pérez-Otaño & Ehlers 2013).

Los receptores de glutamato de la membrana celular son dinámicos (Fernández-Monreal et al., 2012). El tráfico de los receptores hacia la membrana celular y la difusión lateral hacia la sinapsis son, en parte, regulados por proteínas de anclaje, que selectivamente se unen a receptores específicos de glutamato. Como expusimos anteriormente, dentro del dominio de la PSD, la PSD-95 ancla y recluta a las subunidades NR2A y NR2B a la PSD, por lo que regula la inserción en membrana de receptores NMDA y AMPA, así como las interacciones con la PSD (Figura 9) (Lau y Zukin, 2007). Los receptores de glutamato son removidos de la membrana celular a través de un proceso que involucra endocitosis mediada por clatrina (Hanley y Henley, 2005; Hanley, 2014; Park et al., 2009). El incremento en la redistribución de las

subunidades de receptores AMPA, NMDA y PSD-95 en la fracción de membrana sinaptosomal tiene implicancias funcionales en la PSD (Kourrich et al., 2008). Esta interacción entre subunidades de los NMDAr y la proteína PSD-95 está asociada, a su vez, a la dinámica de espinas dendríticas ya que la acción del glutamato sobre estos receptores desencadena la formación o reorganización de las mismas. Así, ratones mutantes para PSD-95 poseen menos espinas en dendritas de estriado e HPC, y la subunidad NR2B se encuentra expresada en menor nivel en estos ratones que en ratones salvajes, indicando una fina interacción entre estos factores (Vickers et al., 2006).

### NMDAr - Cdk5/p35

Como fue comentado anteriormente, la expresión en superficie de las subunidades de los NMDAr es altamente dinámica y su tráfico hacia la membrana, su inserción en ella y la internalización por medio de endocitosis constituyen procesos que están cuidadosamente regulados (Groc et al., 2006). Estudios recientes han demostrado que el complejo Cdk5/p35 cumple un papel importante en la regulación de las subunidades del NMDAr (Sato et al., 2008; Morabito et al., 2004; Hawasli y Bibb, 2007; Hawasli et al., 2007; Zhang et al., 2008a). Cdk5 es una serina/treonina quinasa que forma un complejo con sus activadores neuronales específicos p35 o p39 de los cuales depende su actividad (Dhavan y Tsai, 2001).

El complejo cdk5/p35 tiene un rol esencial en el desarrollo neuronal y ha sido involucrado en la migración y diferenciación neuronal y axogénesis (Pigino et al., 1997; Paglini y Cáceres, 2001; Paglini et al., 2001); en la liberación de vesículas sinápticas, endocitosis y tráfico de membrana (Paglini y Cáceres, 2001), y además es un importante regulador de la función sináptica y de la señalización glutamatérgica (Dhavan y Tsai, 2001; Angelo et al., 2006; Cheung et al., 2003) (Figura 10). Por ejemplo, Cdk5 fosforila directamente la subunidad NR2A afectando la actividad sináptica, mientras que la inhibición farmacológica de la actividad quinasa de Cdk5, con Roscovitina, bloquea la inducción de LTP y las corrientes evocadas por los NMDAr en la región CA1 del HPC (Li et al., 2001). Sin embargo, también ha sido demostrado que

Cdk5 facilita la degradación de la subunidad NR2B mediada por calpaína (Hawasli et al., 2008) y además, fosforila al extremo N-terminal de la PSD-95 facilitando la internalización de la subunidad NR2B (Morabito et al., 2004; Zhang et al., 2008a).

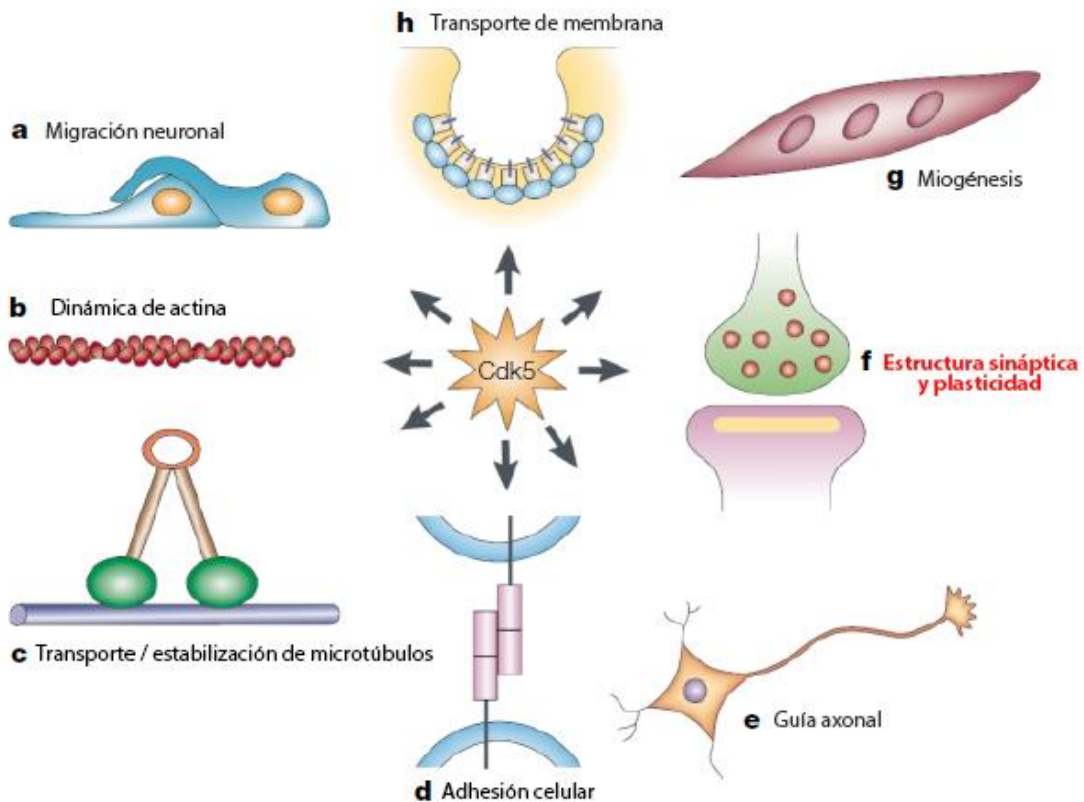


Fig. 10: **Principales funciones de CDK5.** La proteína Cdk5 actúa a diferentes niveles en el SNC, y sus principales funciones se han relacionado con eventos de migración neuronal (a), dinámica de actina (b), transporte y estabilización de microtúbulos (c), adhesión celular (d), guía axonal (e), estructura y plasticidad sináptica (f) y miogénesis (g). Modificado de Dhavan & Tsai 2001.

Además de su vinculación en la regulación del tráfico de receptores NMDA, se ha evaluado el rol de Cdk5 directamente en aprendizaje contextual y se han encontrado evidencias en dos direcciones diferentes. Por un lado, resultados experimentales demuestran que Cdk5 favorece procesos de aprendizaje contextual, ya que la inhibición de la misma previene la adquisición de este aprendizaje en ratones



adultos BALB/c (Fischer et al., 2002) y C57BL/6J (Fischer et al., 2003). Estos autores proponen que es necesaria la fosforilación y activación de sustratos específicos de cdk5 para la consolidación de la memoria contextual, ya que hay un aumento transiente de su activación por p35 durante la adquisición de este tipo de aprendizaje (Fischer et al., 2003). Por otro lado, se observó que la disminución de la expresión de cdk5 favorece la adquisición de condicionamiento de miedo contextual y de otra tarea dependiente de HPC, el test de Morris, en un modelo de ratón deficiente en el activador de Cdk5 (p35KO, Sato et al. 2008) y con pérdida condicional de Cdk5 (Cdk5KO, Hawasli et al. 2007). Otros autores sugieren que la actividad de Cdk5 regula negativamente la extinción de respuestas condicionadas de miedo, ya que su inhibición facilita la extinción de las mismas, mientras que el aumento de la actividad de esta la impide (Sananbenesi et al., 2007).

#### NMDAr – Src

El rol de la familia de quinasas **Src** (SFks) en el SNC estaba originalmente limitado a la regulación de la proliferación y diferenciación de células neuronales. Sin embargo las SFks se expresan en neuronas diferenciadas, postmitóticas, sugiriendo que estas tirosina quinasas podrían participar en la regulación de algunas funciones en el SNC, más allá del desarrollo. A su vez, la ablación genética de SFks (como Fyn o Lyn) resulta en anomalías comportamentales en roedores adultos, sugiriendo así que participan en la regulación de la plasticidad sináptica y el comportamiento (Ohnishi et al., 2011). Estudios recientes sugieren que las SFks participan en la regulación de la plasticidad neuronal y el comportamiento a través de la fosforilación de tirosinas de los receptores de neurotransmisores, incluyendo a los receptores ionotrópicos AMPA y NMDA, que contribuyen a la neurotransmisión excitatoria; y a los receptores GABA tipo A que median la mayor parte de las sinapsis inhibitorias en el cerebro de los mamíferos. Si bien las SFks se encuentran ampliamente expresadas, 5 miembros de esta familia están presentes en niveles elevados en el cerebro: *Src*, *Fyn*, *Lyn*, *Yes* y *Lck* (Salter y Kalia, 2004). Se ha demostrado que la activación de las mismas es importante en la inducción de LTP en neuronas piramidales del área CA1 del HPC, y que el ratón

deficiente de Fyn presenta imposibilidades de aprender tareas dependientes de HPCd, como el test de Morris, y que la fosforilación de tirosinas en NR2B se encuentra reducida en este ratón (Ohnishi et al., 2011). Estudios bioquímicos han demostrado que estas proteínas fosforilan residuos tirosina en los dominios citoplasmáticos de las subunidades NR2A (Y1292, Y1325 y Y1387) y NR2B (Y1252, Y1336 y **Y1472**) (Nakazawa et al., 2004; Zhang et al., 2008a; Taniguchi et al., 2009). Se ha establecido que el dominio Y1472 en NR2B es un sitio principal de fosforilación, y que se encuentra hiperfosforilado en CA1 luego de recibir impulsos por estimulación tetánica de las colaterales de Schaffer (Nakazawa et al., 2004). El dominio Y1472 es, a su vez, un sitio de unión de la subunidad m2 del complejo de la proteína adaptadora 2 (AP2) que se asocia a vesículas endocíticas de clatrina. Se ha demostrado que la fosforilación en ese dominio por Fyn inhibe la unión de la subunidad con AP2 y suprime la endocitosis de los NMDAr mediada por clatrina, localizando de manera anormal a los NR2B en sitios perisinápticos, en vez de reciclarlos por endocitosis (Lau y Zukin, 2007; Lavezzari et al., 2003). Así, el residuo Y1472 de NR2B es importante para la correcta localización subcelular de los NMDAr, así como también para la unión a calmodulina dependiente de calcio II (CAMKII), contribuyendo a la inducción de LTP en HPC y A (Ohnishi et al., 2011). Por lo tanto, Fyn es requerida para la formación de memoria dependiente de HPC (Isosaka et al., 2006). Estudios realizados en un modelo de ratón deficiente de Fyn utilizando el paradigma FCPC, detectaron que ocurre un aumento transiente de Fyn en el HPCd, conjunto a un aumento transiente de NR2B, luego de la sesión de entrenamiento en este paradigma en los ratones controles, que no fue detectado en los ratones deficientes (Isosaka et al., 2006, 2008; Hattori et al., 2006). A su vez se encontró que la memoria a corto plazo y a largo plazo (24hs posteriores al condicionamiento) se vieron alteradas en el ratón deficiente de Fyn que, sumado a la evidencia del aumento de esta proteína en los controles durante el aprendizaje, sugieren que la activación de la vía de señalización de Fyn está involucrada en la formación de memoria contextual dependiente de HPC (Hattori et al., 2006).

La interacción de los NMDAr, específicamente NR2B a través de su dominio citoplásmico Y1472, con proteínas como PSD-95, Cdk5 y Fyn establecen en conjunto un mecanismo de regulación que participa y media la correcta localización de estos

receptores en la membrana sináptica, y su disponibilidad, durante el proceso de adquisición de aprendizaje contextual. En el esquema correspondiente a la Figura 11, se representa la interacción entre estos factores.

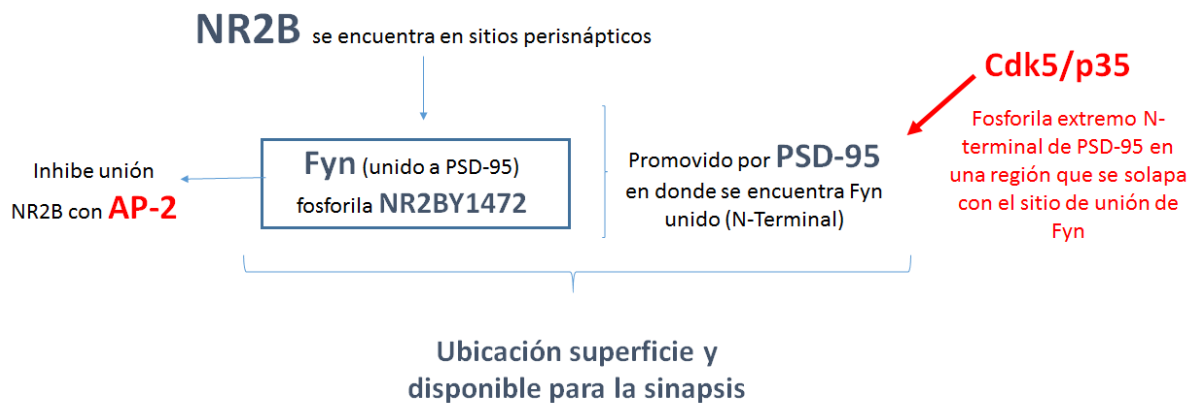


Fig. 11: **Interacción entre NR2B (Y1472) – Fyn – Cdk5 – PSD-95.** El esquema plantea el mecanismo de interacción entre diversos actores que regulan la localización y disponibilidad sináptica de la subunidad NR2B. Se establece que la subunidad NR2B en su motivo Y1472 que se une al adaptador de clatrina AP2 para su endocitosis y reciclado, al ser fosforilado por Fyn se inhibe esta unión y promueve su expresión en superficie. Esta unión es promovida por PSD-95 que se encuentra unida a Fyn en su extremo N-terminal. A su vez, la acción de cdk5 sobre PSD-95 se solapa con el sitio N-terminal en el que actúa Fyn, interrumpiendo este mecanismo.

#### 1.4. Plasticidad sináptica funcional y estructural

La habilidad del SNC para llevar a cabo funciones como la memoria y el aprendizaje, se debe a la maleabilidad y dinámica de su principal unidad de procesamiento: “la sinapsis neuronal”. En este sitio, la liberación de neurotransmisores desde la membrana pre-sináptica provoca la activación de receptores en la membrana post-sináptica, desencadenando la activación de complejas vías de señalización intracelulares en la neurona post-sináptica. El estado fisiológico de las neuronas puede alterarse a través de la modulación de dichas vías de señalización, modificando de este modo la eficiencia sináptica (Kolb y Whishaw, 1998; Rampon y Tsien, 2000; Nimchinsky et al., 2002; Tsay y Yuste, 2004), es decir, haciendo a las neuronas más o menos sensibles al estímulo por el neurotransmisor. El proceso mediante el cual una sinapsis puede ser fortalecida o debilitada se lo conoce como *plasticidad funcional* y constituye un evento clave en la fisiología del SNC. Otra forma de plasticidad sináptica es la *plasticidad estructural*. Ésta consiste en la eliminación y/o generación de nuevos contactos sinápticos, lo cual conlleva a cambios en los circuitos neuronales y en la conectividad neuronal. Trabajos basados principalmente en el estudio de la morfología de las dendritas y de sus espinas, han establecido que aproximadamente el 90 % de las sinapsis excitatorias son llevadas a cabo sobre espinas dendríticas; y la sinaptogénesis asociada con experiencias tales como el aprendizaje y la memoria, son reflejadas tanto en cambios en el número como en la forma de las espinas dendríticas, lo que lleva a modificar la eficiencia sináptica (Tsay y Yuste, 2004). Así, dendritas y espinas dendríticas constituyen el sitio donde reside la plasticidad estructural dependiente de experiencias o estímulos (Nimchinsky et al., 2002; Kasai et al., 2003; Bourne y Harris, 2008; Kasai et al., 2010).

##### *Plasticidad sináptica asociada al aprendizaje y la memoria*

El glutamato, que se reconoce como el mayor neurotransmisor del SNC, que media la transmisión excitatoria en la mayoría de las sinapsis, y debido a su amplia distribución, es un candidato que tiene un rol central en la regulación de la maduración

del cerebro dependiente de actividad, y la estimulación selectiva de las sinapsis en desarrollo. La caracterización de las numerosas familias de receptores de glutamato señalan a los NMDAr como los candidatos, a su vez, de la plasticidad sináptica dependiente de actividad en el adulto, y de la plasticidad sináptica dependiente de actividad durante el desarrollo. Dentro de las funciones claves de estos receptores, los ensamblajes específicos de sus subunidades, que les confieren propiedades diferenciales a estos receptores en su sensibilidad al voltaje, conductancia de las señales mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$  y eficacia sináptica según su localización, se consideran los mecanismos a través de los cuales se refleja la acción de diversos estímulos en la plasticidad estructural de las sinapsis nerviosas (Contestabile, 2000). Así, los NMDAr son los responsables de transformar patrones específicos de actividad sináptica en cambios a largo plazo de la función y estructura de las mismas, haciendo posible que se sustenten procesos de aprendizaje y memoria (Cercato et al., 2014; Paoletti et al., 2013).

La activación de los NMDAr puede producir tanto LTP como LTD de la eficacia sináptica, dependiendo del tiempo de activación pre y postsináptica, el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  postsináptico que se alcanza y el tipo de NMDAr que se active (Dumas, 2005). Numerosas evidencias indican que la plasticidad sináptica está asociada a los cambios en el número o la morfología de las espinas dendríticas, tal como se mencionó anteriormente. Estos cambios en las espinas dependen en la activación de los NMDAr y contribuyen a la formación y eliminación dependientes de actividad de las conexiones sinápticas. Los estímulos que inducen LTP causan la formación de nuevas espinas y el agrandamiento de espinas existentes, mientras que la estimulación que induce eventos de LTD está asociada con la retracción de espinas o la contracción de espinas existentes (Figura 12) (Tada y Sheng, 2006).

Así, las espinas dendríticas funcionan como correlatos morfológicos de las sinapsis excitatorias y se consideran el “almacén” de la memoria a largo plazo del cerebro. Las mismas compartimentalizan las características químicas y proveen la maquinaria necesaria para producir respuestas ante modificaciones del medio ambiente bioquímico en cada sinapsis individual (Matsuzaki, 2007; Tada y Sheng, 2006).

La mayoría de las neuronas piramidales tienen miles de espinas a lo largo de sus dendritas largas y ramificadas, y esas espinas son muy variables en cuanto a su estructura, plasticidad y función. Si el aprendizaje y la memoria se procesan a través de la plasticidad sináptica, entonces, la especificidad y la historia de la memoria almacenada en cada sinapsis individual debería reflejarse en la heterogeneidad morfológica y funcional de las espinas dendríticas.

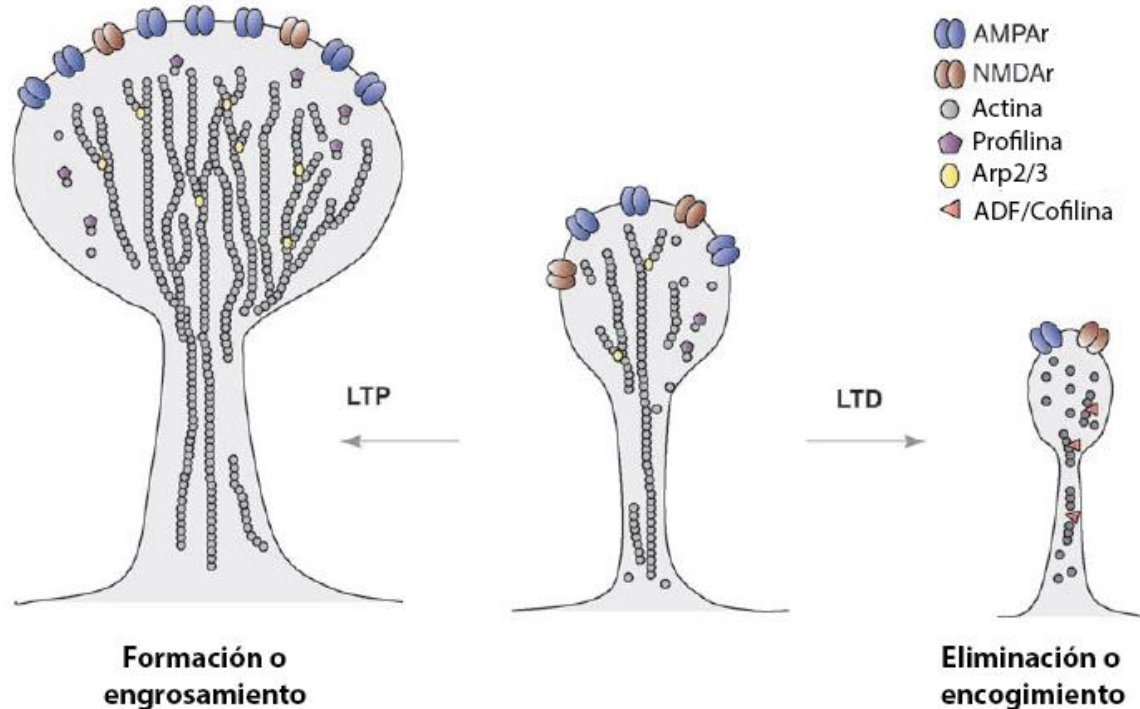


Fig. 12: **Modificación de la estructura sináptica por acción de mecanismos de LTP o LTD.** El LTP se asocia con un cambio del equilibrio de la actina (hacia F-actina), un agrandamiento de la cabeza de la espina y el reclutamiento de más AMPAR en la membrana postsináptica. El LTD cambia el equilibrio de la actina hacia la despolimerización de la misma, resultando en un encogimiento o eliminación de la espina, mediado por la proteína de corte ADF/cofilina. Modificado de Tada & Sheng 2006.

A continuación se definirá a las espinas dendríticas, se caracterizará la composición de las mismas y se describirán los posibles modelos de espinogénesis que se conocen, para luego ahondar en los mecanismos de LTP y LTD mediados por los NMDAr presentes en las mismas y su contribución en el aprendizaje y la memoria.

### *Espinas dendríticas*

Las espinas dendríticas fueron descritas por primera vez en 1888 por Santiago Ramón y Cajal utilizando para su visualización un protocolo de impregnación de plata desarrollado por Camillo Golgi (García-López et al., 2007; Yuste, 2015). Las espinas son pequeñas proyecciones dendríticas, morfológicamente dinámicas y ricas en actina, de longitudes que varían desde 0,2 hasta 3 $\mu$ m y volúmenes de 0,001 a 1  $\mu$ m<sup>2</sup>. Esta diversidad morfológica y el hecho de ser pequeñas proyecciones de la dendrita, son sumamente ventajosas para la neurona, ya que permite alojar más sinapsis por neurita. Así, la densidad de espinas dendríticas puede variar de 1 a 10 espinas por cada micrómetro dendrítico y algunas neuronas, como las hipocampales, contienen miles de espinas a lo largo del su árbol dendrítico (Von Bohlen & Halbach 2009).

Hasta el momento, no se ha observado la presencia de espinas dendríticas en neuronas inmaduras. Estas neuronas presentan en sus dendritas muchas proyecciones sin cabeza, llamadas “filopodios”. Los filopodios recién formados, carecen de la maquinaria post-sináptica necesaria para el correcto funcionamiento de la sinapsis. En ciertas circunstancias, cuando el cerebro recibe información, y a medida que avanza el desarrollo y madurez de la neurona, el número de filopodios disminuye y aumenta la densidad de espinas propiamente dichas (Sekino et al. 2007).

### Estructura de las espinas dendríticas

Las espinas dendríticas constan de tres dominios básicos (Figura 13): (1) una cabeza bulbosa que es la encargada de hacer contacto con el axón y alberga en su interior a la PSD, (2) una base en la unión con el eje de la dendrita y (3) un angosto

cuello que vincula la cabeza con la base de la espina y cumple la función de aislar y restringir la difusión de moléculas de señalización postsinápticas del resto de la dendrita, protegiéndola de eventos de excitotoxicidad (Newpher y Ehlers, 2009). Una forma simple de clasificar las espinas según su morfología, se basa en la relación entre la constricción de su cuello y en el tamaño de su cabeza quedando agrupadas en tres categorías: “tipo III” o “delgadas” (thin, del inglés) que poseen un estrecho cuello y una pequeña cabeza; las “tipo II” u “hongo” (mushroom, del inglés) que poseen un cuello corto y una cabeza relativamente grande; y las “tipo I” o “barril” (“stubby”, del inglés) que no poseen cuello (Sekino et al.; Harris, 1992). Estas características proveen rasgos distintivos a cada tipo de espina, los cuales pueden ser medidos y se consideran representativos de capacidades y diferencias funcionales de cada espina dendrítica. Así, las espinas “hongo” son consideradas como las más estables y el tipo de espina menos plástico, presentan PSD más grandes y complejas con una mayor densidad de receptores glutamatérgicos (Harris, 1992; Matsuzaki et al., 2001; Nicholson-Dykstra et al., 2005; Golden y Russo, 2012). Las espinas “barril”, son las más abundantes durante el desarrollo, se las considera como estructuras plásticas que se encuentran fuertemente acopladas al eje dendrítico (Schmidt y Ehlers, 2009); por lo que los cambios en la densidad de espinas “barril” pueden impactar de mayor manera a la excitabilidad neuronal, en comparación a otros tipos de espinas. Por otro lado, se ha propuesto que la falta de un cuello evita las conexiones inhibitorias (Noguchi et al., 2005). Las espinas del tipo “delgadas” son consideradas como estructuras extremadamente plásticas e inmaduras.

Se ha establecido a su vez, que las espinas más grandes tienen mayor probabilidad de contener retículo endoplásmico liso (REL) (Spacek y Harris, 1997), polirribosomas (Ostroff et al., 2002; Bourne y Harris, 2007), compartimiento endosomal (Cooney et al., 2002) y astrogliá perisináptica (Witcher et al., 2007). Estos rasgos sugieren que las espinas más grandes serían funcionalmente más fuertes en su respuesta a glutamato, en la regulación local del calcio intracelular, en el reciclado endosomal, en la traducción y degradación de proteínas y en la interacción con la astrogliá. Las espinas más pequeñas serían más flexibles, pudiendo alargarse o encogerse más rápidamente en respuesta a subsecuentes activaciones (Bourne y



Harris, 2007). Sin embargo, cabe destacar que las espinas son estructuras dinámicas que pueden variar su morfología rápidamente, sobretodo en el desarrollo, y además existe una distribución continua de formas geométricas de espinas, por lo cual dicha categorización en tres tipos morfológicos, debe ser considerada como una fotografía instantánea arbitraria de un sinfín de tipos de morfológicos de espinas dendríticas (Chapleau et al., 2008).

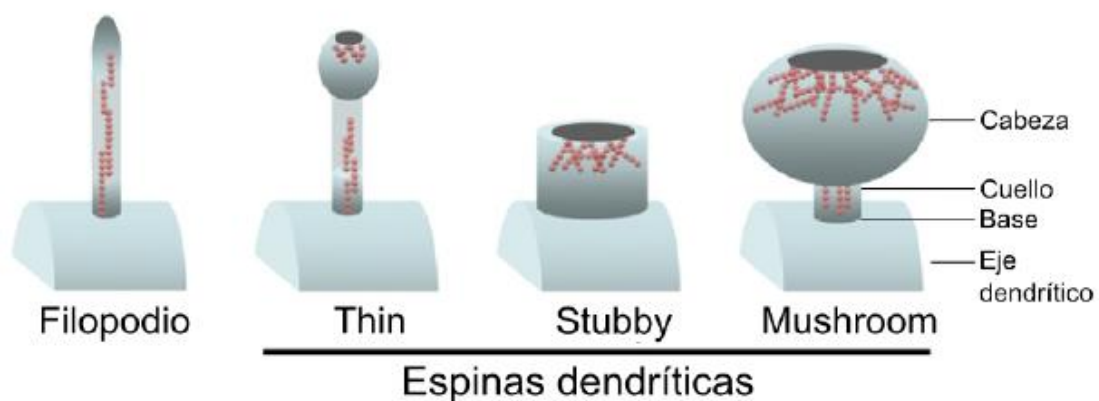


Fig.13. **Morfología del filopodio y de las espinas dendríticas.** Representación esquemática de las morfologías de filopodio y de tres tipos de espinas dendríticas: espinas del tipo “thin”, espinas del tipo “stubby” y espinas del tipo “mushroom”. Los disco grises representan la PSD y las cadenas de círculos rojos representan la actina filamentososa. Modificado de Sekino et al., 2007.

### Composición de las espinas dendríticas

- Densidad Post-sináptica

La cabeza de las espinas provee un sitio bioquímico donde los iones y las moléculas de señalización se concentran luego de la activación sináptica. La PSD es un engrosamiento electro-denso en la cabeza de las espinas y funciona como una estructura organizadora donde recluta receptores como: NMDAr, AMPAr y receptores de glutamato metabotrópicos, proteínas de adhesión, proteínas de anclaje como PSD-95 y proteínas de señalización como CamKII, entre otras (Nishida y Okabe, 2007).

Adyacente a la PSD se encuentra una zona endocítica, la cual es una porción de membrana estable donde se produce la endocitosis dependiente de clatrina para el reciclado de receptores post-sinápticos (Blanpied et al., 2002). La principal función de ésta zona es capturar y reciclar el pool sináptico móvil de receptores requeridos para el LTP (Petrini et al., 2014) que, como ya se mencionó, es un interesante mecanismo para regular la morfología de las espinas a través de la incorporación o remoción de membrana sináptica y el recambio de receptores post-sinápticos (Sekino et al.).

- Endosomas de Reciclado

Ha sido reportado que la morfología de las espinas es modelada en parte, por la actividad del sistema de endosomas de reciclado, ya que el bloqueo de dicho sistema resulta en una disminución del número de espinas (Park et al., 2006). Por otra parte, para el desarrollo del LTP se requiere de la inserción de receptores AMPA mediada por exocitosis (Lu et al., 2001; Park et al., 2004) junto con la endocitosis de las subunidades de canales de potasio dependientes de voltaje, del tipo A (Kv4.2) aumentando localmente la excitabilidad dendrítica (Kim et al., 2007; Halpain, 2006).

- Polirribosomas

Las respuestas plásticas de la espinas dendríticas dependen también de la habilidad de regular la síntesis o degradación de proteínas mediante el sistema de proteosomas. Steward y Levy (1982) demostraron que toda la maquinaria necesaria para sintetizar proteínas, como polirribosomas, se encuentra en la base de las espinas (para mayor información ver revisión Bourne & Harris 2008; Steward & Levy 1982). Estos polirribosomas generalmente se redistribuyen preferencialmente a las cabezas de espinas más grandes durante el LTP. Además, varios estudios observaron la presencia de retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi en las dendritas, donde podrían sintetizar y regular localmente la síntesis de proteínas (Cooney et al., 2002; Horton y Ehlers, 2004).

- Retículo Endoplásmico Liso (REL)

Ya hace 15 años desde la primera vez que se observó REL en las espinas dendríticas. Probablemente, esta organela participe en la regulación del calcio. La entrada de calcio a la neurona puede estimular la liberación de mayor cantidad de

éste, desde el REL, provocando que el aumento de calcio se propague por toda la cabeza de la espina (Sabatini et al., 2001; Spacek y Harris, 1997). A su vez, el calcio facilita el modelado del citoesqueleto de actina (Oertner y Matus, 2005).

- Mitocondrias

Las mitocondrias rara vez se encuentran en las espinas dendríticas, sin embargo, están presentes de manera abundante en el eje dendrítico. Probablemente, el ATP producido por estas organelas difunda desde el eje dendrítico hacia las espinas proveyendo, de esta forma, la energía necesaria para la traducción de señales mediadas por proteínas quinasas (Bourne y Harris, 2008).

- Citoesqueleto de Actina

La formación y la morfología de la espinas dendríticas se encuentra regulada por los filamentos de actina (Fischer et al., 2000; Matus, 2000; Zito et al., 2004). La actina es una proteína globular de 43KD y puede existir en forma monomérica (G-actina, del inglés globular-actin) o bien, las diferentes subunidades se pueden ensamblar dando lugar a la formación de actina filamentosa también conocida como F-actina que cuenta con propiedades bioquímicas y biofísicas particulares. La transición de un estado a otro le confiere una gran flexibilidad y le permite participar de manera determinante en una gran variedad de procesos. Por esta razón, la célula regula la actina que tiene disponible, así como el estado en la que se encuentra (G-actina o F-actina). Para ello, además de las propiedades de la molécula de actina y de los filamentos que conforma, cuenta con la colaboración de las proteínas que se unen a la actina (ABP del inglés actin-binding proteins) ((Gungabissoon y Bamburg, 2003; Nicholson-Dykstra et al., 2005).

Numerosos estudios evidenciaron el importante papel que desempeña, en la morfogénesis de espinas dendríticas, la dinámica de actina y los mecanismos que regulan dicha dinámica. Además del “recambio rotatorio” de F-actina (del inglés “Treadmilling”), que es uno de los mecanismos propuestos de regulación de la dinámica de actina, que propone que la tasa de adición de los monómeros en el extremo barbado de los microfilamentos es igual a la tasa de disociación en el extremo en punta, sin un aparente cambio en la longitud total del filamento (Wegner, 1976), en

las espinas dendríticas también son importantes otros procesos que regulan la dinámica de actina como la nucleación, que supone la formación de nuevos filamentos y el tráfico de pequeños filamentos de F-actina (Allison et al., 1998; Fischer et al., 2005, 2000; Zhang y Benson, 2001).

La organización de la actina en las espinas dendríticas varía según la sub-región de la misma, pero tanto su base, cuello y cabeza presentan una mezcla de distinta proporción de filamentos lineales y ramificados. El cuello de la espina presenta principalmente una red de pequeños y largos filamentos de actina ramificados mezclado con filamentos lineales, mientras que en la punta de la cabeza de las espinas se observa la mayor cantidad de filamentos de actina ramificados justo por debajo de la PSD (Korobova y Svitkina, 2010). Los filamentos de actina presentes en la cabeza de las espinas presentan un alto dinamismo generado principalmente por el recambio rotatorio de los filamentos de actina (Honkura et al., 2008).

#### Espinogénesis: Tres Posibles Modelos

Existen diferentes hipótesis que explican cómo se generan las espinas dendríticas durante el desarrollo del sistema nervioso (Figura 14):

**(1)** El primer modelo, también llamado “*Modelo de Sotelo*” propone que no sería necesario un contacto sináptico para la formación de espinas dendríticas. Este mecanismo ha sido observado en neuronas cerebelares de Purkinje, en donde se crean estructuras dendríticas con forma de espina a través de mecanismos intrínsecos, que no dependen del contacto axonal (Sotelo, 1990).

**(2)** El segundo modelo o “*Modelo de Miller/Peters*” propone que las espinas se originan de sinapsis que se forman inicialmente en el eje dendrítico (Harris, 1992; Miller y Peters, 1981). Esta idea surge de la observación de que la mayoría de las sinapsis en neuronas en desarrollo se establecen sobre el eje dendrítico y no en los filopodios (Harris et al., 1992). A medida que el circuito neuronal madura, el número de sinapsis en las espinas aumenta y disminuyen las sinapsis en el eje dendrítico. En

definitiva, en este modelo es el filopodio axonal, y no el dendrítico, el que busca una región apropiada para establecer el contacto sináptico en el eje dendrítico.

**(3)** El último modelo, "*el modelo del filopodio*", propone que las espinas dendríticas se originan a partir de un precursor: los filopodios dendríticos, los cuales predominan en las neuronas jóvenes en desarrollo. Una vez que estos filopodios hacen contacto sináptico (con la membrana pre-sináptica) maduran a espinas (Ziv y Smith, 1996; Yuste y Bonhoeffer, 2004)

Durante el desarrollo, las dendritas se encuentran densamente pobladas con estos filopodios, los cuales son sumamente dinámicos y presentan una vida media corta, de solo unos minutos. A medida que se forman las sinapsis, el número de filopodios disminuye mientras que el número de estructuras del tipo espinas aumenta, sugiriendo que los filopodios podrían ser los precursores de dichas espinas. Ziv y Smith (1996) observaron en cultivos disociados de neuronas de HPC una secuencia de eventos, en donde un filopodio encuentra un axón, crea un contacto sináptico y sufre una transformación de filopodio a espina. Dicha transformación, involucra disminución en la motilidad y en su longitud junto con un engrosamiento de la parte distal del filopodio. En este modelo, la gran motilidad del filopodio estaría dirigida a sensor el espacio alrededor de la dendrita en busca de un sitio apropiado para hacer contacto con un axón. Ha sido demostrado que la liberación de glutamato promueve la extensión del filopodio sugiriendo que este podría ser un mecanismo de guía para el filopodio hacia el sitio de liberación de vesículas presinápticas (Portera-Cailliau et al., 2003).

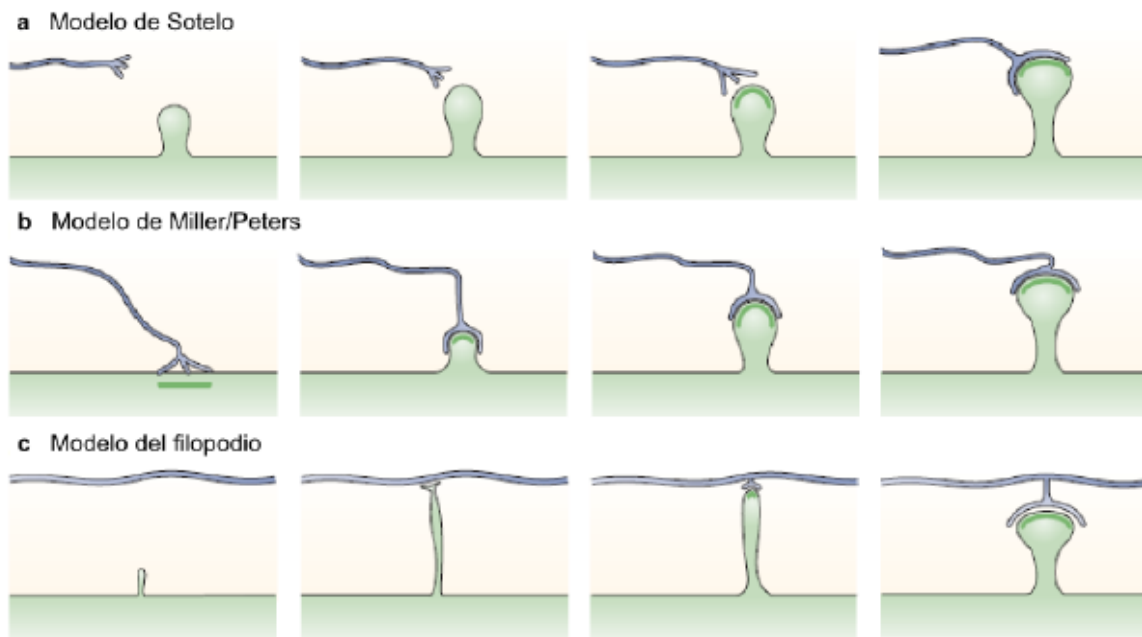


Fig. 14. **Tres posibles modelos para la espinogénesis.** El diagrama ilustra las características esenciales de los tres modelos de espinogénesis. En el modelo de Sotelo (a) las espinas emergen independientemente del terminal axónico. En el modelo de Miller/Peters (b) es el terminal axónico quien induce la formación de la espina. Finalmente en el modelo del filopodio (c) un filopodio dendrítico captura la terminal axonal y se convierte en una espina. Modificado de Yuste y Bonhoeffer, 2004.

### Factores importantes para la plasticidad de las espinas dendríticas

La plasticidad de las espinas dendríticas se puede definir como los cambios dinámicos en la estructura y función de las espinas durante la plasticidad dependiente de actividad. Esta actividad se extiende en el rango espacial desde sinapsis individuales hasta circuitos neuronales.

Los factores importantes para la plasticidad de las espinas se pueden dividir en 6 categorías que se encuentran en un rango que va desde el *tipo de neurona* y el *área cerebral* hasta la estructura individual de la *espina*. El *tipo de neurona* y el *área cerebral* determinan el perfil genético y el nivel de expresión de los genes que participan en la plasticidad de las espinas. La *actividad global* determina la cantidad de moléculas disponibles para regular la plasticidad de la espina. Las *interacciones locales*

determinan la distribución local de proteínas y la plasticidad de la espina. Las *terminales axonales* y la *glía* regulan la especificidad de las conexiones de las espinas y el alcance de las mismas. La *señalización local* de las espinas determina si la plasticidad esta dirigida hacia mecanismos de LTP (agrandamiento) o de LTD (encogimiento de las mismas). Finalmente, la *estructura de la espina* determina el nivel y la cantidad de receptores glutamatérgicos y las señales de  $Ca^{2+}$  que pueden actuar sobre las mismas, así, el volumen de la cabeza determina la función de la espina en un momento dado, mientras que el cuello de la misma regula cómo la función puede cambiar en el tiempo (Matsuzaki, 2007).

### Implicancias de estos factores sobre el aprendizaje y la memoria

Las contribuciones de las redes cerebrales al procesamiento de la información, y al aprendizaje y la memoria, han sido clásicamente interpretadas en el marco de la plasticidad Hebbiana y a través de la noción de que los pesos sinápticos pueden ser modificados por patrones específicos de actividad sináptica. Sin embargo, evidencia acumulada de la última década, indica que las redes sinápticas también son estructuralmente plásticas, y que la conectividad entre las mismas se encuentra en remodelación permanente, durante toda la vida, a través de mecanismos de formación de nuevas sinapsis y de estabilización y/o eliminación de sinapsis preexistentes. Esto a conducido a desarrollar el concepto de plasticidad estructural, que abarca una variedad de cambios morfológicos que tienen consecuencias funcionales e implicancias claves en el aprendizaje y la memoria, ya que se alteran físicamente circuitos y conectividades, proporcionando así huellas o trazas de memoria de larga duración que pueden ser reclutadas en evocaciones posteriores (Caroni et al., 2012; Paoletti et al., 2013).

Una característica importante de las sinapsis excitatorias e inhibitorias es su alto grado de variabilidad estructural, y el hecho de que las morfologías y estabildades de las mismas cambien en el tiempo (Kasai et al., 2010). Este fenómeno es regulado por actividad, y el tamaño de las cabezas de las espinas dendríticas se correlacionan con la fuerza de las sinapsis que conforman (Matsuzaki et al., 2001), las propiedades

presinápticas (Tarsa y Goda, 2002; Tokuoka y Goda, 2008) y la estabilidad a largo plazo de las sinapsis (Holtmaat et al., 2005).

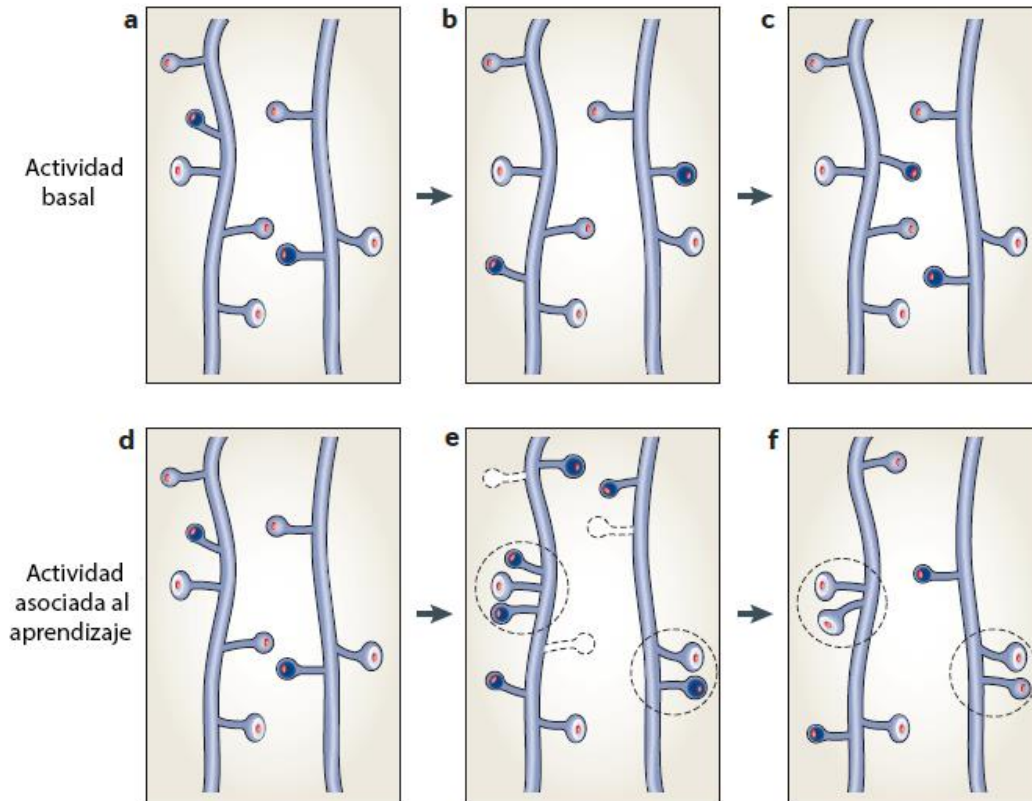


Fig. 15. **Modificaciones en la conectividad estructural de redes sinápticas por el aprendizaje** . El diagrama ilustra la secuencia del remodelado de espinas en condiciones basales, que incluyen tanto pérdida como ganancia de espinas, y afecta a un número pequeño de espinas transientes (pequeñas en negro), manteniendo una mayor población de espinas estables (a-c). En condiciones de aprendizaje se acentúa el proceso de remodelado conduciendo a la formación de nuevas espinas (pequeñas en negro) y la eliminación de espinas existentes (líneas punteadas). Si bien la conectividad se modifica, la densidad de espinas puede permanecer sin modificarse. Las nuevas espinas que surgen durante el aprendizaje pueden surgir en grupos (círculos punteados) y tener una mayor probabilidad de estabilizarse a espinas persistentes, introduciendo una modificación duradera en la red nerviosa (d-f). Modificado de Carioni et al., 2012.

La inducción de plasticidad sináptica afecta el tamaño y forma de las espinas dendríticas y existe una asociación entre el aumento de la fuerza sináptica y el agrandamiento de la cabeza de la espina. El significado de este agrandamiento refleja



cambios que implican a la expresión de receptores, la movilización de fuentes subcelulares de ribosomas y proteínas asociadas al citoesqueleto. La reestructuración es parte de un set de cambios a nivel global (De Roo et al., 2008). Varios estudios han señalado la importancia de la estabilización de las sinapsis durante el aprendizaje. Las experiencias sensoriales novedosas promueven la estabilización de un set de nuevas espinas que serán permanentes, al igual que ocurre en experimentos en los que se entrenan a los animales en tareas motoras, como el condicionamiento operante, en el que surgen nuevas espinas en poblaciones específicas de neuronas y se estabilizan por entrenamientos subsecuentes (Xu et al., 2009; Yang et al., 2009b). La estabilización de subpoblaciones de espinas podría representar las bases estructurales del almacenamiento de la memoria (Figuras 15 y 16) (Caroni et al., 2012).

Así, las modificaciones en el número y forma de espinas responden a procesos de aprendizaje específicos, por ejemplo, durante el recondicionamiento, posterior a un procedimiento de condicionamiento y extinción, predominan los procesos de eliminación de las espinas dendríticas que fueron formadas y estabilizadas por la extinción (Lai et al., 2012a). Así, la estabilización se considera una propiedad reversible de sinapsis individuales que está vinculada a la inducción de plasticidad.

El remodelado de la conectividad sináptica de los circuitos está regulada por la actividad y la experiencia sensorial (Wyatt et al., 2012) y responde a fenómenos locales en los que se facilita la plasticidad en la vecindad de espinas que se están potenciando, y las nuevas espinas se forman cerca de las espinas activas (Harvey et al., 2008). Por ejemplo, algunos estudios observaron que durante la adquisición de aprendizaje emergen grupos de espinas que son más propensos a persistir que espinas no agrupadas o aisladas (Fu et al., 2012). La regulación local de la dinámica de las espinas es un factor importante para promover la actividad grupal de las mismas.

Si se consideran aspectos globales, diferentes protocolos de entrenamiento resultan en cambios más o menos perceptibles en la densidad de espinas dendríticas. Así, procedimientos de exposición a ambientes enriquecidos promueven el crecimiento de espinas y conllevan a un aumento en el número de espinas total, mientras que tareas de aprendizaje que implican desempeños motores en los que la formación o eliminación de espinas ocurren simultáneamente, cancelándose un

proceso con el otro en relación al número total de espinas (Bednarek y Caroni, 2011). De este modo, se ejemplifica como la conectividad observada durante el aprendizaje representa un correlato estructural del aprendizaje, que será o no mantenido según las fuerzas que actúen sobre esas sinapsis (Figuras 15 y 16).

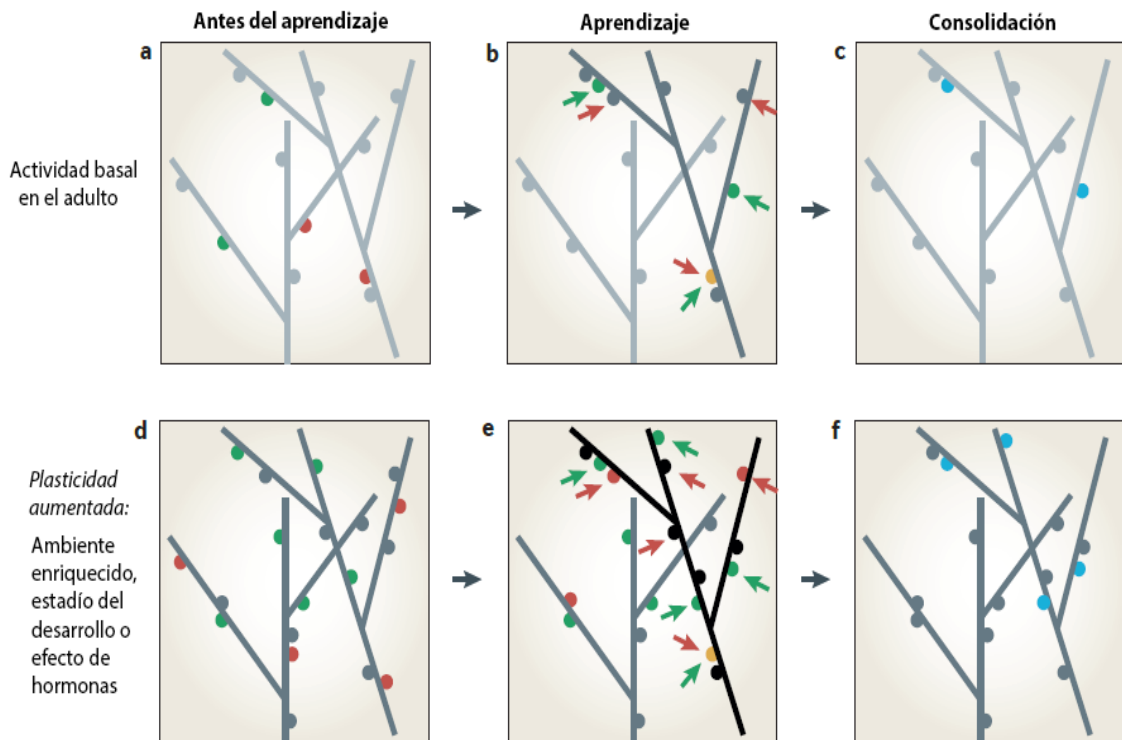


Fig. 16. **Remodelado global y local de sinapsis relacionado al aprendizaje y la memoria** . El esquema representa dendritas de 2 neuronas excitatorias y sus espinas. Aumentos en la plasticidad se ven en verde oscuro. Las espinas dinámicas son verdes (nuevas) y rojas (perdidas); el cambio de espinas durante el aprendizaje se indica en flechas verdes y rojas, las espinas naranjas son nuevas por aprendizaje pero no persisten en la consolidación; las trazas estructurales del aprendizaje que se consolidan, incluyen ganancia de espinas (azules) o pérdida. (a-c): La plasticidad estructural inducida por el aprendizaje promueve el recambio de subpoblaciones de sinapsis nuevas y preexistentes, específicamente en neuronas excitatorias involucradas en el aprendizaje (a vs b) y conducen a la estabilización de algunas espinas de esas nuevas espinas. (d-f): El aumento de los niveles basales del recambio de espinas como consecuencia de factores como el enriquecimiento contextual, entre otros, puede aumentar la magnitud de las ganancias de espinas inducidas por aprendizaje. Modificado de Caroni et al., 2012.

# 2

## Construcción de la Hipótesis

En la introducción de esta tesis se han reflejado las diversas conclusiones obtenidas de diferentes publicaciones, a lo largo de las últimas décadas, acerca de la ontogenia del aprendizaje contextual en modelos animales. Los principales hallazgos discrepan en los resultados experimentales que encuentran, y las explicaciones y conclusiones que los diferentes autores proponen para abordar los mismos. El criterio general establecido, y mayormente considerado, refleja que la tarea de aprender acerca del contexto emerge de manera tardía en el desarrollo, lo cual se correlaciona con cierta información acerca de la maduración del HPC, que es la principal estructura vinculada a la capacidad de ejecutar esta función cognitiva superior.

Consideramos de gran relevancia tener en cuenta ciertas consideraciones al trabajar en etapas tempranas de la ontogenia, que tienen que ver con algunos conceptos tomados del modelo ecológico descrito anteriormente.

En primer lugar, la pregunta acerca de si existen diferencias en las capacidades de aprendizaje y memoria entre infantes y adultos, debe ser respondida a través de experimentos en los que los sujetos de cada clase se evalúen en *circunstancias comparables*. Es importante controlar las diferencias en las capacidades motoras y perceptuales de cada edad, para así establecer si la respuesta observada, o la falta de la misma, se relacionan con diferentes habilidades de, por ejemplo, poder procesar

claves visuales, cuando se comparan sujetos infantiles que abrieron los ojos recientemente; en lugar de utilizar estímulos, como los olfativos, que alcanzan un mayor desarrollo en esa edad. Estas consideraciones pueden guiar al comportamiento de los infantes.

En segundo lugar, los estudios ontogénicos deben poner especial atención a los comportamientos utilizados como parámetros de aprendizaje y memoria, y asegurarse de que no existen diferencias ontogénicas entre los grupos de edades incluidos en el diseño, en la capacidad de ejecutar la respuesta que se va a evaluar. Por ejemplo, en los estudios de condicionamiento de miedo contextual, la variable dependiente generalmente evaluada es la respuesta de inmovilización, calculada como un índice de *porcentaje de congelamiento*, que representa al “miedo” generado por la asociación entre el contexto y la experiencia previa de haber recibido una descarga eléctrica en el mismo, en donde, la falta de respuesta asume falta de memoria contextual. Ciertos autores han determinado que la respuesta de congelamiento típica, que involucra una postura específica en los roedores (espalda arqueada, cola rígida), se observa desde el PN23 en adelante, si bien los animales de dos semanas de edad pueden responder con inmovilización, a su vez, en menor medida. Esto se debe a que animales jóvenes tienen una mayor actividad basal (hiperactividad), que animales destetados (Spear y Smith, 1978; Campbell y Raskin, 1978).

Por otra parte, y en general, los estudios que comparan la capacidad de aprender de los roedores a diferentes edades, realizan el análisis de los datos a través de la comparación directa de las puntuaciones obtenidas entre las diferentes edades. Este análisis enmascara la posibilidad de explorar las condiciones basales de comportamiento en el entrenamiento de los sujetos a cada una de las edades. Por ejemplo, los pocos trabajos que utilizan el FCPC para estudiar la ontogenia del aprendizaje, comparan directamente a las puntuaciones obtenidas, en términos de porcentaje (%) de congelamiento, entre sujetos pre y post-destete (Burman et al., 2009; Schiffino et al., 2011b; Jablonski et al., 2012).

Además, gran parte de la literatura establece que no habría evidencias de aprendizaje contextual en roedores, sino a partir del día PN23. Son pocos los estudios que profundizan en los análisis fisiológicos y/o bioquímicos en animales de edades más

tempranas. En este mismo sentido, no hay trabajos que exploren a otro nivel, distinto del comportamental, los mecanismos asociados a este tipo de aprendizaje. No ha resultado posible encontrar evidencias previas del análisis de la función hipocampal en esquemas de aprendizaje contextual en roedores pre-destetados, así como tampoco se encuentran evaluaciones de los niveles bioquímicos de proteínas relacionadas al aprendizaje contextual, ni estudios estructurales que se pregunten acerca de los mecanismos que subyacen al aprendizaje, debido a que las conclusiones acerca de este fenómeno, niegan la capacidad de los infantes de aprender a partir de paradigmas de miedo condicionado al contexto.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en esta tesis se hipotetiza que, al realizar un estudio *profundo* del aprendizaje contextual en la ontogenia, seremos capaces de detectar evidencias de este paradigma en ratas infantes y podremos establecer a través de que variable/s, éstas se pueden observar. Para poner a prueba esta hipótesis se plantea aplicar el *ajuste de ciertos parámetros del paradigma de FCPC*, incorporando no sólo a los grupos *controles adecuados* para cada una de las edades, que serán nuestra base para la interpretación de los resultados; sino que se realizará el análisis de un *etograma exhaustivo* de cada uno de los comportamientos que despliegan los sujetos de dos edades tempranas (una anterior al destete -PN17- y otra posterior a esta instancia -PN23-).

Además, la utilización del paradigma FCPC nos permitirá estudiar, específicamente, el *rol de los receptores NMDA* mediante manipulaciones farmacológicas, en la adquisición de este aprendizaje, pudiendo así determinar si los mecanismos involucrados en ratas adultas se comparten con los infantes. Pensamos que podremos detectar modificaciones en las curvas de las variables del etograma exhaustivo en sujetos de ambas edades, al bloquear a los NMDAr.

También hipotetizamos que, si correlacionamos los cambios a nivel comportamental, y asumimos que los *animales más jóvenes tienen la capacidad adaptativa de aprender acerca del entorno*, al analizar los patrones de expresión de proteínas involucradas en *mecanismos de plasticidad sináptica* en respuesta a la experiencia, como PSD-95, Cdk5 y diferentes subunidades del receptor NMDA,

encontraremos diferencias entre los grupos que adquieren aprendizaje acerca del contexto *en relación a sus controles*.

Por último, hipotetizamos que los NMDAr, al jugar un rol central en la plasticidad sináptica estructural mediante la regulación de la formación/protrusión de espinas dendríticas como sitios claves donde reside esta plasticidad, veremos, en respuesta al *entrenamiento de los sujetos en el FCPC*, una *modificación en el número de espinas*, lo cuál será abordado a través de un modelo de ratón transgénico que, bajo el control del promotor *thy-1* expresa la proteína verde fluorescente GFP específicamente en elementos neuronales, entre ellos en el HPC, permitiendo visualizar estructuras como las dendritas y espinas dendríticas (Feng et al., 2000). Este abordaje se realiza en esta tesis en una sola edad posterior al destete, en donde se asume que los animales son capaces de aprender al igual que los adultos (a partir de 30-35 días postnatales), con el fin de analizar si la adquisición de aprendizaje de contexto en este paradigma específico está asociada a la plasticidad sináptica estructural.

# 3

## Objetivos

### 3.1 Objetivo General

Realizar un **análisis ontogenético del aprendizaje contextual en roedores**, utilizando el paradigma de **Facilitación del Condicionamiento Contextual por Pre-exposición al Contexto (FCPC)**. Enfocaremos nuestra atención en el estudio de componentes de la **neurotransmisión glutamatérgica** y proteínas clave de **plasticidad sináptica**, así como en las implicancias de este aprendizaje sobre el desarrollo de **espinas dendríticas**.

### 3.2 Objetivos Específicos

- 1- Evaluar la adquisición de aprendizaje contextual durante la ontogenia en ratas de 17 y 23 días postnatales (PN), a través del paradigma de Facilitación del Condicionamiento contextual por Pre-exposición al Contexto (FCPC), mediante un etograma exhaustivo del repertorio conductual que realizan los sujetos experimentales.
- 2- Analizar el rol de los receptores NMDA en la adquisición y condicionamiento del aprendizaje contextual, mediante la inhibición farmacológica de los mismos por

inyecciones periféricas de MK-801 en el modelo de FCPC, en sujetos de PN17 y de PN23.

**3-** Evaluar los niveles de expresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA, así como también los niveles bioquímicos de proteínas claves en plasticidad sináptica como PSD-95, Cdk5 y su activador específico p35, en el HPCd de animales que recibieron un tratamiento de pre-exposición similar al recibido en la Fase 1 del FCPC, en donde se procesa la información del contexto, en sujetos de PN17 y PN23.

**4-** Evaluar si los distintos tratamientos de pre-exposición por condicionamiento presentes en el paradigma de FCPC se correlacionan con diferencias en la densidad y/o morfología de espinas dendríticas de neuronas piramidales del HPC dorsal, utilizando el modelo de ratón Thy1-GFP, en sujetos post-destetados.



# 4

## Materiales y Métodos

Se describirán a continuación los procedimientos *generales* (4.1) realizados en esta tesis que se agrupan en los siguientes ítems: (a) Animales de experimentación: se detallarán las cepas de roedores utilizados, los cuidados y manipulaciones generales que se les realizaron y las edades en los que se utilizaron; (b) Aparatos: Se describirán las características del aparato que se utilizó para la realización del paradigma FCPC, el cuál fue utilizado para todos los experimentos conductuales, en todos los modelos animales; (c) Tratamiento farmacológico: Menciona las características, preparación, dosis y forma de administración de la droga utilizada en los abordajes farmacológicos; (d) Análisis bioquímicos: Procedimiento general de la técnica de SDS-PAGE y el análisis por Western Blot; (e) Ensayo de inmunoprecipitación: se realizó para evaluar la interacción entre dos proteínas en fracciones sinaptosomales, se describe la metodología general; (f) Anticuerpos: Resume los anticuerpos utilizados en los análisis bioquímicos y las concentraciones de cada uno de ellos; (g) Fijación de cerebros: Detalla el procedimiento de preparación de las muestras para los análisis estructurales y cuantificación de espinas dendríticas en ratones; (h) Adquisición de imágenes: Se describe como se registran las imágenes obtenidas de las preparaciones de los cortes de los cerebros de ratones utilizados para las evaluaciones estructurales; (i) Análisis

estadístico: Se describe la metodología que se utilizó para la interpretación y el análisis de los datos obtenidos de las 4 series experimentales.

A continuación de la descripción general de los procedimientos, se detallará la metodología específica (4.2) de cada una de las series de experimentos, con sus correspondientes diseños y parámetros.

#### **4.1 Procedimientos generales**

##### *(a) Animales de experimentación*

En la realización de esta tesis se utilizaron ratas de la cepa Wistar (Experimentos correspondientes a las series 1 al 3) y ratones de la cepa Thy1-GFP (Experimento correspondiente a la serie 4), ambas cepas criadas y mantenidas en el bioterio del Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra INIMEC-CONICET-UNC. Los animales fueron alojados en las salas correspondientes del bioterio, en condiciones constantes y controladas. La temperatura de la habitación se mantuvo en 22 °C, con un ciclo de luz oscuridad de 12hs (8h-20h), y libre acceso a comida y agua. Los sujetos fueron controlados desde el día de nacimiento, que se determinó como día postnatal 0 (PN0), las camadas se ralearon a 10 sujetos por caja, balanceando los sexos siempre que fuese posible, y no se utilizaron camadas que tuvieran menos de 6 crías por caja. Las crías se mantuvieron en su jaula hogar y se destetaron, en el caso que correspondiera, en el día PN21, separando los sujetos machos de hembras y alojándolos en cajas de a 4 animales cada una. A continuación se detalla el manejo general que se realizó con las camadas de animales para cada experimento. En todos los experimentos se utilizaron machos, y en ningún caso se asignó más de un sujeto de la misma camada al mismo tratamiento experimental para evitar la sobre-representación de las camadas en los experimentos (Holson & Pearce, 1992).

##### a.1 Ratas cepa Wistar

Se utilizaron para los experimentos 1 al 3 ratas macho correspondientes a dos grupos de edades: sujetos de 17 días postnatales (PN17) al comienzo del experimento, los cuales fueron mantenidos en la jaula hogar con la madre y camada, y

fueron transportados individualmente a la sala de experimentación para los procedimientos correspondientes a cada día, para luego ser devueltos a la jaula hogar hasta el PN19 donde finalizaron los procedimientos que involucran a los sujetos de esta edad. La segunda franja etaria estuvo compuesta por animales de PN23, al comienzo del experimento. Los sujetos correspondientes a esta condición se mantuvieron hasta el PN21 con su camada en una jaula hogar, luego se colocaron en cajas de a 4 machos, manteniendo las mismas condiciones constantes y controladas que se describieron, y al PN23 se utilizaron para los experimentos correspondientes que serán descritos a continuación, los cuales finalizaron al PN25 para este grupo de sujetos.

#### a.2 Ratones Thy1-GFP

El experimento 4 de esta tesis fue realizado con ratones machos de 30-35 días postnatales, pertenecientes a la cepa C57BL/6J transgénicos que expresan la proteína fluorescente verde (del inglés eGFP) bajo el control de una región modificada del promotor Thy1 (el mismo contiene las secuencias necesarias para la expresión neuronal de la proteína verde, pero carece de las secuencias requeridas para la expresión en células no neuronales), llamados B6.Cg-Tg (Thy1-EGFP) MJrs/J, que fueron donados generosamente por el Dr. Pozzo-Miller. Para el mantenimiento y amplificación de la colonia se realizan cruces de hembras salvajes C57BL/6J (Wild type, WT) con machos heterocigotas B6.Cg-Tg(Thy1-EGFP)MJrs/J.

##### *a.2.1 Genotipificación de los ratones Thy1-GFP*

La genotipificación de los ratones se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico obtenido de una muestra de tejido de la cola del animal. La toma de la muestra de tejido se llevó a cabo dentro de la primera semana después del destete.

### *Obtención de la Muestra de Tejido*

La toma de la muestra de tejido se realizó en animales anestesiados con una dosis de 90mg/kg de ketamina y 10mg/kg de xilazina diluidas en solución salina estéril (Sal, NaCl 0.9%), inyectada intraperitonealmente (i.p.). El estado de anestesia profunda se comprobó mediante la ausencia de un reflejo flexor al ejercer una pequeña presión en el extremo de la cola del animal. A continuación, utilizando un bisturí estéril se cortó una muestra de aproximadamente 2-3mm del extremo de la cola del ratón, e inmediatamente se cauterizó dicha zona. Los animales aún anestesiados fueron enumerados, mediante pequeñas incisiones en las orejas, para su futura identificación.

### *Extracción y purificación del ADN genómico*

La extracción del ADN genómico a partir de la cola de los ratones se llevó a cabo mediante la digestión del tejido y la posterior purificación del ADN. La digestión se realizó mediante la enzima Proteínasa K (Promega, Oregon, EEUU). Las muestras de tejido fueron colocadas en un microtubo estéril tipo Eppendorf, con 500µl del buffer de digestión (200mM NaCl, 100mM Tris pH8.5, 2% SDS y 5mM EDTA pH8) al cual se le agregaron 0.2µg de Proteínasa K disuelta en 10mM CaCl y 50mM Tris (pH8), los cuales se incubaron a 55 °C durante toda la noche.

A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 14.000x g, a 4°C durante 10min, obteniéndose una fase acuosa y un precipitado conteniendo los restos de tejidos no digeridos. La fase acuosa conteniendo el ADN se transfirió a otro microtubo y se le agregó un volumen igual de isopropanol frío; seguido de esto, la muestra se agitó suavemente hasta observar la formación de un pequeño precipitado. Esta muestra se centrifugó nuevamente a 14.000x g a 4°C durante un periodo de 10min y se descartó el sobrenadante, quedando el precipitado de ADN adherido al fondo del tubo. El precipitado se lavó con etanol 80%, centrifugándolo 5min a 14.000x g a 4°C y eliminando el sobrenadante; este paso se realizó dos veces, el primero con 500µl de etanol y el segundo con 200µl. A continuación, se dejó secar el ADN durante 30min y luego se agregaron 50µl de H<sub>2</sub>O MilliQ® autoclavada, y se incubó la muestra durante 30min a 37°C, con el fin de facilitar la resuspensión del ADN. La muestra se conservó a -20°C hasta su utilización.

### *Reacción en Cadena de la Polimerasa*

Para determinar el genotipo de los animales se realizó una reacción por cada muestra. En la misma se utilizaron cuatro “primers” o cebadores, dos de ellos reconocen al transgen y los otros dos reconocen un control interno positivo. El primer para el transgen denominado “forward” 14994 (5'-TCT GAG TGG CAA AGG ACC TTA G-3') hibridiza con el promotor del Thy-1 y el primer para el transgen denominado “reverse” 14995 (5'-TGA ACT TGT GGC CGT TTA CG-3') hibridiza con la secuencia que codifica para eGFP, esta reacción produce un fragmento de aproximadamente 173 pares de bases (pb). Mientras que los siguientes “primers” reconocen a un control interno positivo: “forward” oIMR7338 (5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3') y el primer denominado “reverse” oIMR7339 (5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C-3') esta reacción produce un fragmento de aproximadamente 324 pb. Esta reacción no diferencia animales heterocigotas de homocigotas.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 30 µl, conteniendo 25mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs, 20µM de cada primer (Transgen F/R y Control interno positivo F/R), 5 unidades de Taq polimerasa y 1 µl de ADN. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador estándar de acuerdo al siguiente programa: 1-desnaturalización inicial: 1.5min a 94°C; 2-desnaturalización: 30 segundos a 94°C, 3-hibridización: 1 min a 60 °C; 4-elongación: 2min a 72 °C y 5-Elongación final: 2min a 72 °C. Las etapas 2 a 4 se repitieron por 35 ciclos.

Los productos de PCR se revelaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 2% en Buffer TAE (40mM Tris, 20mM ácido acético, 1mM EDTA). Para la visualización de las bandas se les agregó a los productos de PCR una solución de Gel-red (Biotium) acorde a las especificaciones del fabricante. La presencia de las bandas de los productos de amplificación fueron detectadas mediante un transiluminador UV.

### *(b) Aparatos*

Los experimentos conductuales, realizados tanto en rata como en ratones Thy1-GFP en los experimentos 1 al 4, consistieron en el entrenamiento de los animales durante 3 días consecutivos en el paradigma de FCPC (Fanselow, 1990), los animales fueron pre-expuestos, condicionados y evaluados (como se detallará más adelante) en

una sala de experimentación en el bioterio del IMMF, en una caja denominada contexto de condicionamiento, que consistió en una caja de Plexiglás (29cm x 17cm x 20cm), de paredes laterales blancas y pared frontal transparente para permitir la filmación de los experimentos mediante el uso de una videocámara. El piso de la caja (30 x 18cm) consistió en una grilla de acero inoxidable conformada por varillas de 0.2cm de diámetro, separadas por 0.5cm, la cual estaba conectada a un generador de corriente eléctrica que producía una descarga continua de 0.5, 0.75 o 1.5mA, durante 2seg (L.I.A.D.E. – FCEFYN, UNC, Córdoba, Argentina). La sala de experimentación en donde se realizaron las sesiones de entrenamiento estaba iluminada con luz tenue y con un ruido blanco constante generado por un extractor de aire ubicado dentro de la misma.

#### *(c) Tratamientos farmacológicos*

Tanto en los experimentos realizados en ratas de la cepa Wistar de la serie 2, se administraron inyecciones intraperitoneales (i.p.) a los sujetos, tanto de PN23 como PN17, de **MK-801** que es un antagonista no competitivo de los receptores NMDA, el cual fue utilizado en una dosis de 0.1mg/Kg (2a, 2b y 2c), dosis que fue seleccionada a partir de literatura previa en la que se utilizó esta droga para bloquear el aprendizaje contextual en animales destetados (Schiffino et al., 2011b), y en una dosis más elevada por sugerencia de la comisión asesora de tesis en el experimento 2c. Los experimentos 2a y 2b corresponden a la administración de la droga previa a la sesión de preexposición (en sujetos de PN23 y PN17 respectivamente), mientras que en el experimento 2c, se administró la droga previa a la sesión de condicionamiento (sólo en sujetos de PN23, se utilizaron las dosis de 0.1mg/Kg ó 0.2mg/Kg). El MK-801 fue disuelto en solución salina al 0.9%.

#### *(d) Análisis bioquímicos*

##### Preparación de la Fracción Sinaptosomal

En aquellos experimentos en los que se obtuvieron fracciones sinaptosomales a partir de ratas de PN17 y PN23, se procedió de la siguiente manera: los mismos fueron sacrificados mediante decapitación a diferentes tiempos post pre-exposición

(dependiendo del experimento, se detallará a continuación), el cerebro fue rápidamente removido sobre hielo y se disecó el HPC de ambos hemisferios, tomando la sección dorsal del mismo (1/3 superior), para obtener una muestra representativa de sinaptosomas enriquecidos en HPCd. La preparación de los sinaptosomas fue realizada de acuerdo a lo descrito por De Camilli (De Camilli et al., 1983) con modificaciones menores. Brevemente, el tejido fue homogeneizado en sacarosa fría (0.32M sacarosa, 10mM HEPES, 1mM EDTA y 3mM ClMg, pH7.4) conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (1µg/mL aprotinina, 1µg/mL leupeptina, 100µg/mL PMSF, 1µg/mL pepstatina, y 0.2mM ortovanadato de sodio) en un volumen final de 600 µl de sacarosa fría con un homogeneizador con émbolo de vidrio dentro de un recipiente de hielo. Las muestras fueron centrifugadas a 1000 x g por 5 min. El sobrenadante, homogenato total (HT), se volvió a centrifugar a 10000 x g por 20 min para obtener la fracción citoplasmática (FC), el pelet resultante se resuspendió en buffer de lisis RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasa (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 1%Nonidet P-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 1 µg/mL aprotinina, 1µg/mL leupeptina, 100 µg/mL PMSF, 1µg/mL pepstatina, y 0.2mM ortovanadato de sodio) y así se obtuvo la fracción sinaptosomal cruda (FS). Las diferentes fracciones fueron sonicadas (30% Amperaje, durante 10 segundos) en hielo. A continuación, se determinó la concentración de proteínas totales mediante el método de Lowry, utilizando un kit comercial (DC Protein Assay Kit, Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Finalmente, se agregó a las muestras de proteínas una cantidad de buffer de muestra Laemmli 4X (8% SDS, 40% glicerol, 20% 2-mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol) equivalente a 0,25 volúmenes de muestra y estas se incubaron durante 5 min a 100°C.

#### Análisis de Western Blot

De las muestras derivadas del fraccionamiento sinaptosomal, se utilizaron 25µg de proteína total. Las mismas fueron separadas mediante electroforesis en geles de 9% ó 12%, según correspondiera, de acrilamida/bisacrilamida, conteniendo 10% de SDS. La electroforesis se realizó en un buffer conteniendo 25mM Tris, 192mM glicina y 1 % SDS, y el gel fue corrido electrofóreticamente a un voltaje constante de 120V,

durante aproximadamente 90 min, hasta que el frente de corrida del mismo desapareciera. Una vez finalizada la electroforesis, las muestras fueron transferidas desde el gel a membranas de nitrocelulosa (Bio Rad, Laboratory, Hercules, CA, USA) en un buffer igual al usado en el paso anterior, pero conteniendo 20% de metanol. La transferencia se llevó a cabo durante 90 minutos a un amperaje constante de 270mA. Una vez transferidas las proteínas, las membranas fueron teñidas con una solución de 0.2% Ponceau S (Sigma Aldrich) y 2% de ácido acético con el fin de visualizar la correcta transferencia y fueron posteriormente lavadas con buffer tris salino (TBS, 20mM Tris pH7.5, 150mM NaCl) hasta que las marcas desaparecieran completamente. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en TBST (10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl más 0.05% Tween-20), por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se las incubó toda la noche a 4°C con el correspondiente anticuerpo primario. Al día siguiente las membranas se lavaron 3 veces con TBST cada 15 min y se les colocó el anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo (IRDye 800 anti-conejo IgG y IRDye 680 anti-ratón *-LI COR-*). Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente y de 3 lavados con TBST, se las reveló utilizando el sistema de imagen infrarojo (Odyssey). Una vez concluida la etapa anterior, se procedió a la remoción de los anticuerpos primarios de la membrana mediante una incubación de 5 min en una solución de 5N NaOH. Luego, la membrana se lavó 5 veces con TBS/Tween y se volvió a bloquear con leche al 5% por una hora a temperatura ambiente. Se volvió a incubar con el anticuerpo primario de interés, de la misma manera que se describió anteriormente. Finalmente la intensidad de las bandas fue cuantificada con el programa FIJI (programa código libre para procesar imágenes basado en ImageJ de National Institutes of Health) o con el sistema de medición de intensidad de bandas del Odyssey para su posterior análisis estadístico.

#### *(e) Ensayo de Inmunoprecipitación*

De las muestras derivadas del fraccionamiento sinaptosomal, se tomó un volumen correspondiente a 300 µg de proteínas totales, al que se le agregó 20 µl (6µg/ml) de anticuerpo contra PSD-95 y se incubó en agitación durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se le agregó 20µl de microesferas de agarosa conjugadas con



Proteína A/G Plus (Santa Cruz) y se incubó durante 2 horas en agitación a 4°C. Luego se centrifugó durante 3 minutos en centrifuga Eppendorff a 4°C recuperando el sobrenadante (SN). Las microesferas de agarosa fueron lavadas 3 veces con buffer RIPA mediante centrifugación y fueron resuspendidas en 50µl de buffer de muestra 2X (Laemmli). Las muestras fueron luego sometidas a un análisis de Western Blot y reveladas con un anticuerpo anti-Cdk5 y anti-PSD-95.

*(f) Anticuerpos*

En el experimento 3, se cuantificaron los niveles de expresión de diversas proteínas en fracciones sinaptosomales de HPC dorsal, de ratas de PN23 y PN17, mediante la técnica de SDS-PAGE y el análisis de Western Blot. Para esto, se utilizaron los siguientes anticuerpos: Anti-Cdk5 (1:500, C-8; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-p35 (1:400, C-19; Santa Cruz Biotechnology), anti-PSD-95 (1:1000, 6G6-1C9; Abcam, Cambridge, MA, USA), anti- $\alpha$ -tubulin (1:3000, DM1A; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), anti-NR2B (1:1000, Millipore) y anti-NR2BY1472 (1:1000, Millipore).

*(g) Fijación de los Cerebros*

Los ratones del experimento 4, luego del entrenamiento en el paradigma FCPC, fueron anestesiados con una sobredosis de hidrato cloral (0.1ml/100g) y luego de comprobarse que estos se encontraban profundamente anestesiados mediante la ausencia de reflejos flexores, fueron perfundidos transcárdicamente con el fin de fijar el tejido cerebral. En primer lugar y con el objeto de remover toda la sangre del sistema los sujetos fueron perfundidos con una solución lavadora (glucosa 0.4%, sacarosa 0.8%, NaCl 0.8%). A continuación, fueron perfundidos con una solución fijadora de 4% de paraformaldehído (Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich Lab GmbH, Seelze, Alemania) en buffer borato (10mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 150mM NaCl, pH7.5). Los cerebros fijados permanecieron en la caja craneal envueltos en papel aluminio durante toda la noche a 4°C y luego fueron removidos y colocados en una solución de sacarosa al 30% hasta su total impregnación. Posteriormente, los cerebros fueron seccionados en cortes de 100µm de espesor utilizando un micrótopo de congelación (Reicher-Jung

Hn40, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se montaron sobre portaobjetos con Vectashield®, finalmente se selló con esmalte de uñas transparente para evitar pérdida del medio de montaje, y se almacenó a 4°C hasta adquirir las imágenes confocales.

#### *(h) Adquisición y análisis de imágenes*

De los cerebros fijados de los ratones del experimento 4, se adquirieron imágenes, con microscopía confocal, de dendritas terciarias y cuaternarias de neuronas piramidales de CA1. Las imágenes fueron adquiridas con el microscopio Olympus FV1000, con un objetivo de 100x. Los cortes ópticos fueron de 0.17µm. Posteriormente se evaluó la densidad de espinas dendríticas y se caracterizó la morfología de las mismas.

Las espinas dendríticas fueron identificadas como pequeñas protrusiones que se extendían  $\leq 3\mu\text{m}$  desde el eje dendrítico. Estas fueron contadas en proyecciones Z de máxima intensidad usando el programa Fiji-ImageJ (National Institutes of Health). Se tuvo particular cuidado de contar cada espina solo una vez a través de toda la proyección Z. La densidad de espinas fue calculada mediante la cuantificación del número de espinas por segmento dendrítico y normalizada a 10µm de longitud dendrítica (Tyler y Pozzo-Miller, 2003).

Las espinas dendríticas fueron clasificadas siguiendo las categorías definidas por Peter y colaboradores (Peters y Kaiserman-Abramof, 1969) como ““stubby”” o “tipo I”, “mushroom” ó “tipo II” y “thin” ó “tipo III”. Cada espina fue incluida en la categoría que le correspondiese basado en las siguientes relaciones específicas:  $L/d_n$  y  $d_h/d_n$ , donde L es la longitud de la espina desde su base hasta la punta de la cabeza,  $d_n$  es el diámetro del cuello máximo y  $d_h$  es el diámetro máximo de la cabeza, como ya ha sido descrito (Harris, 1992). Las espinas “stubby” tienen una longitud similar al diámetro del cuello, la cual es similar al diámetro de la cabeza de la espina, típicamente  $\leq 1\mu\text{m}$  ( $L \approx d_n \approx d_h$ ). Las “mushroom” poseen una longitud típica de  $\leq 1\mu\text{m}$  con un diámetro de cuello mucho más pequeño que el diámetro de la cabeza ( $d_n \ll d_h$ ). Generalmente las espinas “thin” son más largas que 1 µm, lo cual es mucho mayor que el diámetro del cuello ( $L \gg d_n$ ).

La cuantificación y caracterización morfológica de las espinas dendríticas en el experimento realizado con ratones fue llevada a cabo con el programa NeuronStudio (Beta), previamente se deconvolucionaron las imágenes con el programa AutoQuant (Advanced Image Deconvolution and Visualization Software –MediaCybernetics).

*(i) Análisis estadístico*

Las puntuaciones obtenidas en los resultados de cada serie experimental se analizaron mediante el uso del programa Statistica 6.0. Se realizaron ANOVAs mixtos o entre-grupo, dependiendo los factores establecidos para cada una de ellas. En todos los experimentos, los efectos principales que arrojaron resultados significativos, o interacciones, fueron analizados *a posteriori* por el test post-hoc de Duncan. A su vez, las hipótesis establecidas a priori, se analizaron mediante comparaciones planeadas con el fin de detectar interacciones específicas. El umbral de significación estadística se estableció en un valor de  $p < 0.05$ .

#### **4.2 Metodología específica**

A continuación se describirán las 4 series experimentales que se llevaron a cabo en esta tesis, cada una con sus objetivos específicos y la metodología empleada para responderlos.

*Serie experimental 1: Evaluación del efecto de Facilitación del Condicionamiento contextual por Pre-exposición al Contexto, en ratas destetadas y pre-destetadas.*

En el experimento 1 evaluamos, tanto en ratas destetadas (PN23, Exp.1a) como en ratas pre-destetadas (Exp.1b), la expresión de condicionamiento de miedo contextual inducido por la acción de una descarga eléctrica inmediata (0, 0.5 o 1.5mA), como función de la pre-exposición al contexto de condicionamiento.

El objetivo de este experimento 1 fue analizar: (a) si la exposición previa al contexto altera el patrón comportamental en la sesión de evaluación, poniendo el interés principal en detectar evidencias en diferentes variables dependientes

inherentes a la conducta del animal; (b) si el efecto de facilitación del paradigma FCPC puede ser efectivo al utilizar una descarga eléctrica de menor intensidad (0.5mA) que la utilizada en la literatura (1.5mA) y (c), si los sujetos no pre-expuestos muestran evidencias de condicionamiento de miedo contextual.

Sujetos: se utilizaron 159 ratas Wistar, representativas de 62 camadas para la realización de los experimentos 1a y 1b.

Procedimiento: Los sujetos de PN23 y PN17 fueron evaluados en experimentos separados, (1a y 1b, respectivamente) debido a que el tiempo dedicado a cada comportamiento registrado varía sustancialmente entre los grupos de edades. Por este motivo, decidimos incluir como control un grupo no condicionado (que no recibe descarga eléctrica) en cada experimento. Los experimentos 1a y 1b fueron llevados a cabo en 3 fases: Pre-exposición (Fase 1), condicionamiento (descarga inmediata, Fase 2) y evaluación (Fase 3). Los procedimientos realizados fueron similares a los descritos en estudios previos (Schiffino et al., 2011b; Jablonski et al., 2012; Murawski y Stanton, 2011; Burman et al., 2009), con algunas excepciones que serán indicadas en cada caso.

Fase 1: Pre-exposición. En el día correspondiente, (PN23 para experimento 1a y PN17 para experimento 1b), los animales experimentales fueron marcados en sus colas para su reconocimiento durante el entrenamiento en el FCPC. La mitad de los sujetos designados para el experimento, pertenecientes a la condición pre-expuestos fueron llevados individualmente a la sala de experimentación en una caja de transporte (caja de plexiglás 25 x 25 x 20cm. – utilizada en todos los experimentos), en donde se colocaron en la caja de condicionamiento para libre exploración durante 5min (grupo pre-expuesto), y luego fueron retirados y transportados nuevamente a su jaula hogar. Los sujetos del grupo no pre-expuesto permanecieron en su jaula hogar en esta fase. Tanto la caja de transporte como la caja de condicionamiento, fueron limpiadas con EtOH 70% luego de haber sido utilizadas por cada sujeto, en todas las fases de los experimentos.

Fase 2: Condicionamiento – Descarga inmediata. La fase 2 se llevó a cabo a las 24hs posteriores a la fase 1. Sujetos de ambas condiciones (pre-expuestos y no pre-

expuestos) fueron transportados individualmente a la caja de condicionamiento en donde recibieron una única descarga eléctrica inmediata (0, 0.5 o 1.5mA) durante 2seg. Inmediatamente después del condicionamiento se sacaron los animales de la caja de condicionamiento y se llevaron a su jaula hogar. Este procedimiento tarda menos de 5seg.

Fase 3: Evaluación. 24hs posteriores al condicionamiento los sujetos de todas las condiciones se llevaron individualmente a la caja de condicionamiento, en donde permanecieron durante 5min para libre exploración. Esta sesión fue filmada y analizada posteriormente, sin saber a qué condición pertenecieron los sujetos evaluados (a ciegas).

Variables dependientes evaluadas: Se realizó un etograma exhaustivo registrando todas las variables desplegadas por los sujetos en la fase de evaluación, las cuáles son mutuamente excluyentes, por lo que se consideró que los animales estuvieron correctamente puntuados si el tiempo total registrado *por minuto* para todas las variables arrojó un resultado de entre 57 y 63 seg. Las variables registradas, que conforman al etograma exhaustivo, son las siguientes: (1) **Actividad horizontal:** tiempo (seg) en que los sujetos exploran la caja con las 4 patas en la grilla de la caja (piso); (2) **Actividad vertical:** incluye a las conductas conocidas en inglés como “wall climbing” y “rearing”, se registró el tiempo (seg) en que los animales se paran sobre sus patas traseras, con las patas delanteras en la pared de la caja de condicionamiento o suspendidas; (3) **Higiene:** (del inglés: grooming) tiempo (seg) en que los sujetos realizan conductas de limpieza que se definen como una secuencia de movimientos que comienza por la limpieza del hocico con las patas delanteras y la lamida de las mismas, luego la amplitud de los movimientos va aumentando, extendiéndose a los laterales del cuerpo, para concluir con la lamida del cuerpo directamente en los flancos del animal; (4) **Congelamiento:** tiempo (seg) en que los sujetos no realizan ningún movimiento, excepto los necesarios para respirar. Todas las conductas desplegadas por los roedores fueron incluidas en una de estas categorías, y ninguna conducta se realizó por fuera de las mismas, que no estuviesen registradas. Se adicionaron dos variables dependientes extras, (5) **% de congelamiento:** es la variable utilizada como medida de condicionamiento de miedo contextual en la literatura lo cual nos permitió

comparar los resultados obtenidos en nuestro trabajo con los de otros grupos, y consiste en un índice obtenido a través del registro cada 10seg de la inmovilización del animal o la ausencia de la misma/total de posibilidades por minuto; la segunda variable incluida fue (6) el número de **bolos fecales**: se registró el número de bolos fecales en la caja de condicionamiento al final de la sesión de evaluación. La variable de defecación se ha utilizado como medida sensible a detectar ansiedad en ratas (Singer et al., 2005) y se considera una variable que se correlaciona con el miedo.

Análisis estadístico de los datos: las puntuaciones correspondientes a cada variable dependiente (actividad horizontal, vertical, higiene y congelamiento) se analizaron con ANOVAs múltiples incluyendo como factores entre grupos al tratamiento de pre-exposición (no pre-expuestos o pre-expuestos) y al condicionamiento (0, 0.5 o 1.5mA), y al minuto de evaluación (5 niveles) como la variable dentro de cada grupo. El número de bolos fecales y el % de congelamiento se analizaron como factores entre grupos por ANOVA (tratamiento de pre-exposición x condicionamiento). Tanto en este como en los experimentos subsecuentes, los efectos principales significativos y/o las interacciones encontradas, se analizaron adicionalmente por ANOVAs de seguimiento (follow-up) y pruebas post hoc (test de rangos múltiples de Duncan). Todos los niveles inferenciales realizados en esta tesis emplearon un nivel de significación  $\alpha$  igual a 0.05. El resto de los experimentos de esta serie se analizaron utilizando la misma estrategia estadística.

*Serie experimental 2: Evaluación del efecto de la inhibición de los receptores NMDA en el paradigma de Facilitación del Condicionamiento por Pre-exposición al Contexto (FCPC), en sujetos destetados y pre-destetados.*

En el experimento 2 evaluamos, tanto en ratas destetadas (PN23, Exp.2a) como en ratas pre-destetadas (Exp.2b), el efecto de la inhibición farmacológica de los receptores NMDA durante la fase de pre-exposición del paradigma FCPC, utilizando el bloqueante específico MK-801. Evaluamos a su vez en esta serie, el efecto del bloqueo de los NMDAr antes de la sesión de condicionamiento (Exp.2c), sólo en sujetos de PN23 pero con dos diferentes dosis de MK-801: 0.1 ó 0.2mg/Kg.

La realización de este experimento persigue tres objetivos principales, (a) replicar los resultados obtenidos en la serie experimental 1, en donde encontramos el efecto de facilitación en ratas de PN23 y también en pre-destetadas de PN17 (ver sección resultados y publicación Pisano et al. 2012); (b) evaluar si la administración de un inhibidor de los receptores NMDA (MK-801), previa a la sesión de pre-exposición del FCPC, atenúa el efecto de facilitación encontrado en sujetos de ambas edades. Hasta la fecha, no se han realizado experimentos con esta estrategia farmacológica para explorar los mecanismos de aprendizaje contextual durante la infancia; y (c) evaluar si la inhibición de los NMDAr en la sesión de condicionamiento modifica las curvas encontradas en el experimento 1 para los sujetos que reciben la descarga inmediata y que no han sido preexpuestos al contexto, para estudiar si algunas de esas respuestas se pueden considerar aprendizaje incidental.

#### Experimentos 2a y 2b: MK-801 previo a la sesión de preexposición del FCPC

Sujetos: Se utilizaron 164 ratas macho Wistar, representativas de 44 camadas, para la realización de los experimentos 2a y 2b.

Procedimiento: Al igual que en la serie experimental 1, los sujetos de PN23 y PN17 fueron evaluados en experimentos separados, (2a y 2b, respectivamente). Los procedimientos realizados fueron similares a los descritos en la serie 1 en cada fase del FCPC, con algunas excepciones que se describirán brevemente, ya que se agrega un nuevo factor de análisis que es el *tratamiento farmacológico*. Debido a los resultados obtenidos en la serie experimental 1, se realizó el condicionamiento con una sola descarga eléctrica (de 1.5mA) que fue la que arrojó resultados más contundentes.

Fase 1: Pre-exposición. En el día correspondiente, (PN23 para experimento 2a y PN17 para experimento 2b), la sesión comenzó con la administración del tratamiento farmacológico correspondiente a cada sujeto: MK-801 ó vehículo (solución salina 0.9%). MK-801 fue administrado (al igual que el vehículo) intraperitonealmente (i.p.) en una dosis de 0.1mg/Kg disuelto en solución salina, la cual fue seleccionada de la literatura en la que se utilizó esta droga para bloquear el condicionamiento contextual

en sujetos de PN23 (Schiffino et al. 2011). 30 minutos posteriores a la administración del tratamiento farmacológico correspondiente, los sujetos de las condiciones pre-expuestos (salina y MK-801) se llevaron individualmente a la sesión de pre-exposición tal como fue descrita en la serie experimental 1, en donde exploraron el contexto libremente por 5min y fueron luego devueltos a la jaula hogar.

Fase 2: Condicionamiento – Descarga inmediata. Al igual que en la serie 1, animales de todas las condiciones experimentales (pre-expuestos-salina, pre-expuestos-MK-801, no pre-expuestos-salina y no pre-expuestos-MK-801) recibieron, 24hs posteriores a la fase 1, el tratamiento de condicionamiento correspondiente: ya sea la administración de una única descarga eléctrica inmediata de 0mA ó de 1.5mA, y luego retirados rápidamente y devueltos a la jaula hogar hasta la sesión de evaluación.

Fase 3: Evaluación. Todos los animales de todas las combinaciones de tratamientos (pre-expuestos-salina-0mA, pre-expuestos-salina-1.5mA, pre-expuestos-MK-801-0mA, pre-expuestos-MK-801-1.5mA, no pre-expuestos-salina-0mA, no pre-expuestos-salina-1.5mA, no pre-expuestos-MK-801-0mA y no pre-expuestos-MK-801-1.5mA) se evaluaron individualmente a las 24hs posteriores a la fase 2, durante 5min en la caja de condicionamiento donde exploraron libremente la misma, siendo la sesión filmada para el posterior análisis.

Variables dependientes evaluadas: Se registraron las mismas variables dependientes que en la serie experimental 1, con los mismos criterios. Las mismas fueron (1) actividad horizontal, (2) actividad vertical, (3) higiene, (4) congelamiento, (5) bolos fecales y (6) % de congelamiento.

Análisis estadístico de los datos: La estrategia de análisis estadístico de los datos en esta serie experimental, fue la misma que la realizada en la serie 1. La diferencia que resaltamos en esta serie es que, al haber numerosos grupos experimentales, 8 por cada edad (pre-expuestos-salina-0mA, pre-expuestos-salina-1.5mA, pre-expuestos-MK-801-0mA, pre-expuestos-MK-801-1.5mA, no pre-expuestos-salina-0mA, no pre-expuestos-salina-1.5mA, no pre-expuestos-MK-801-0mA y no pre-expuestos-MK-801-1.5mA), y al haber realizado un análisis previo en el que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, en ninguna de las dos edades analizadas, se solaparon



los sujetos que no recibieron descarga eléctrica (0mA), tanto de las condiciones pre como no pre-expuestos, de ambos tratamientos farmacológicos, en un solo grupo denominado "Control", por edad. Finalmente, los tratamientos se agruparon bajo el factor "grupo" obteniendo los siguientes 5 niveles: Control, No pre-1.5mA-sal, No pre-1.5mA-MK801, Pre-1.5mA-sal y Pre-1.5mA-MK801. Esta reorganización de los datos, no sólo refleja los mismos efectos principales encontrados en los resultados de los análisis de esta serie experimental de manera separada para cada edad, sino que, y principalmente, facilita la interpretación de los resultados y el análisis y discusión de los mismos. Por lo tanto los análisis para cada grupo de edad se realizaron a través de ANOVAs de una vía analizando al factor Grupo (Control, No pre-1.5mA-sal, No pre-1.5mA-MK801, Pre-1.5mA-sal y Pre-1.5mA-MK801), como variable entre grupos y a los minutos de evaluación (5 niveles) como factor dentro de cada grupo.

#### Experimento 2c: MK-801 previo a la sesión de condicionamiento del FCPC

Sujetos: Se utilizaron 71 ratas macho de la cepa Wistar de PN23, representativas de 21 camadas, para la realización del experimento 2c.

Procedimientos: Para la realización de este experimento se emplearon animales de PN23 que fueron sometidos a la fase de condicionamiento sin haber tenido preexposición al contexto (grupos No-Preexpuestos) previa inyección de MK-801 (0, 0.1 o 0.2mg/Kg, esta última dosis fue agregada luego de obtener los resultados preliminares con la dosis de 0.1mg/Kg de MK-801, por sugerencia de la comisión asesora de tesis) y 24hs posteriores se evaluaron en el contexto de condicionamiento. A continuación la descripción de las fases del procedimiento:

Fase de condicionamiento-Descarga inmediata: Animales de PN23 que permanecieron alojados con 3 sujetos de su mismo sexo desde el destete al día PN21, recibieron una inyección ip. de vehículo (solución salina 0.9%) o de MK-801 (0.1 o 0.2mg/Kg disuelto en solución salina). 30 minutos posteriores a la inyección, los mismos fueron llevados individualmente en una caja de transporte, de similares características que la utilizada en las series experimentales anteriores (<10seg.), hacia la sala de experimentación en

donde fueron colocados en la caja de condicionamiento en la que recibieron inmediatamente una descarga eléctrica de 0mA (grupos No pre-sal-0mA, No pre-MK0.1-0mA y No pre-MK0.2-0mA) o de 1.5mA (grupos No pre-sal-1.5mA, No pre-MK0.1-1.5mA y No pre-MK0.2-1.5mA). Luego de la descarga se retiraron rápidamente de la caja de condicionamiento, permaneciendo en la misma el menor tiempo posible y fueron nuevamente transportados a la caja de alojamiento hasta la sesión de evaluación.

Fase de Evaluación. Todos los animales de todas las combinaciones de tratamientos se evaluaron individualmente a las 24hs posteriores a la fase de descarga inmediata, durante 5min en la caja de condicionamiento donde exploraron libremente la misma, siendo la sesión filmada para el posterior análisis.

Variables dependientes evaluadas: Se registraron las mismas variables dependientes que en la serie experimental 1 y 2, con los mismos criterios descritos en la serie experimental 1. Las mismas fueron (1) actividad horizontal, (2) actividad vertical, (3) higiene, (4) congelamiento, (5) bolos fecales y (6) % de congelamiento.

Análisis estadístico de los datos: La estrategia de análisis estadístico de los datos en esta serie experimental, fue la misma que la realizada en la serie 1. Los análisis para cada grupo experimental se realizaron a través de ANOVAs de una vía analizando al factor Grupo (No pre-sal-0mA, No pre-MK0.1-0mA, No pre-MK0.2-0mA, No pre-sal-1.5mA, No pre-MK0.1-1.5mA y No pre-MK0.2-1.5mA), como variable entre grupos y a los minutos de evaluación (5 niveles) como factor dentro de cada grupo.

*Serie experimental 3: Evaluación de los cambios bioquímicos en la expresión de la subunidad NR2B y de su estado fosforilado activo, NR2BY1472, así como los de proteínas claves en la adquisición del aprendizaje contextual como PSD-95, Cdk5 y su activador específico p35, en el hipocampo dorsal de sujetos de PN23 y PN17, en respuesta a la exposición a un contexto novedoso, y la interacción entre este grupo de proteínas.*

En la serie experimental 3, evaluamos la dinámica de la expresión de la subunidad NR2B en el hipocampo dorsal, en respuesta a la exposición a un contexto

novedoso, que representaría la sesión de pre-exposición del FCPC, en sujetos de PN23 y PN17. A su vez, se evalúa en esta serie el estado fosforilado activo de la subunidad NR2B, NR2BY1472, que representa un indicador del tráfico de este receptor hacia la membrana sináptica que es el mecanismo que ocurre en la adquisición de este aprendizaje. Por otra parte, se estudian en este ítem, la expresión en sinaptosomas de HPCd de PSD-95, Cdk5 y p35, que, como describimos en la introducción, son proteínas importantes que interactúan con los receptores NMDA determinando su localización subcelular, y, de este modo, su disponibilidad sináptica. La determinación de la expresión de estas proteínas de interés se realizó a diferentes tiempos posteriores a la exposición al contexto novedoso. Hasta la fecha, no hay trabajos previos que hayan analizado la ontogenia de la expresión de los niveles de estas proteínas durante la adquisición de aprendizaje contextual, las cuales están involucradas en mecanismos que median el LTP requerido para que ocurra este aprendizaje, en ninguna de las edades evaluadas. A su vez, se indaga en esta serie experimental acerca de la interacción entre algunas de las proteínas de interés, mediante un ensayo de inmunoprecipitación que busca analizar la ubicación de cada una de ellas en la fracción sinaptosomal, en relación a la proteína PSD-95 que es con la cual NR2B y Cdk5 forman complejos de manera independiente, en el momento de mayor expresión de NR2B a los 40min posteriores a la preexposición. Es importante destacar que este análisis se aborda de manera preliminar, y se especifica el número de sujetos y la estrategia experimental en la sección correspondiente (3c).

Experimentos 3a y 3b: Evaluación de la expresión en sinaptosomas de NR2B, NR2BY1472, PSD-95, Cdk5 y p35, en sujetos preexposados a un contexto novedoso, tanto de PN23 (Experimento 3a) como de PN17 (Experimento 3b).

Sujetos: Se utilizaron para esta serie experimental 61 ratas macho de la cepa Wistar, representativos de 19 camadas, incluyendo a los experimentos 3a (PN23, n=34) y experimento 3b (PN17, n=27).

Procedimiento: Los sujetos de cada edad fueron analizados en distintos experimentos, 3a y 3b, respectivamente para PN23 y PN17. El procedimiento consistió en una sesión

de pre-exposición similar a la fase 1 del FCPC, seguida del sacrificio de los sujetos a diferentes tiempos posteriores a la finalización de la sesión de pre-exposición. Se obtuvieron muestras de sinaptosomas enriquecidos en HPCd como se describió anteriormente en los procedimientos generales. Las fracciones obtenidas de los sujetos pre-expuestos, y no pre-expuestos como control, correspondientes a los distintos tiempos post pre-exposición se utilizaron para analizar por Western Blot evaluando la expresión de las proteínas de interés.

Tratamiento de pre-exposición: Los sujetos pertenecientes al grupo pre-expuesto de ambas edades, se transportaron individualmente a la caja de condicionamiento utilizada en las series experimentales anteriores, en las mismas condiciones, en donde se les permitió explorar libremente el contexto durante 10 minutos, para luego ser devueltos a la jaula hogar. Los sujetos pertenecientes a la condición no pre-expuestos, permanecieron en la jaula hogar hasta el momento del sacrificio.

Obtención de la muestra de sinaptosomas de HPCd: Luego de la pre-exposición los sujetos pertenecientes al experimento 3a (PN23), fueron sacrificados a distintos tiempos posteriores: los tiempos establecidos fueron los siguientes: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70min. En el experimento 3b (PN17), los sujetos se sacrificaron a los 0, 20, 40 y 60min posteriores a la pre-exposición, con la intención de reducir los grupos experimentales y el uso de los animales. En ambos experimentos se incluyó un grupo No pre-expuesto conformado por sujetos que fueron trasladados de la jaula hogar y sacrificados para la obtención de la muestra sin exposición previa al contexto de condicionamiento, ni a ningún otro, que fue el control que se utilizó para comparar los niveles basales de expresión de las proteínas de interés.

Análisis de expresión de proteínas: Mediante la técnica de Western Blot, descrita en los procedimientos generales, se analizaron los niveles de expresión de las siguientes proteínas: NR2B total, NR2BY1472, PSD-95, Cdk5 y p35. A su vez, la proteína tubulina se cuantificó y se utilizó como control de carga proteica de los carriles de cada sujeto. Las densidades ópticas (D.O.) de las bandas de expresión de cada proteína se determinaron utilizando el programa ImageJ, y de las mismas, se determinaron las razones (radio) de la D.O. de cada proteína / D.O. tubulina (normalización en relación a la carga total de proteínas), para cada sujeto. A su vez, se determinó el radio

NR2BY1472/NR2B para conocer cuánto de la subunidad NR2B expresada en sinaptosomas, se encontraba fosforilada específicamente en ese sitio en el momento de la determinación.

Análisis estadístico de los datos. La única variable independiente en cada experimento fue el factor “Grupo” que tuvo 9 niveles en el experimento 3a (No pre-expuestos y pre-expuestos sacrificados al tiempo 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70min). En el experimento 3b los niveles fueron 6 (No pre-expuestos y sacrificados al tiempo 0, 20, 40, 60min). Por lo tanto se realizaron ANOVAs de una vía con el factor “grupo” como único factor de análisis por edad.

Experimento 3c: Inmunoprecipitación de los complejos PSD-95/NR2B y PSD-95/Cdk5, en sujetos preexpuestos a un contexto novedoso de PN23.

Es importante aclarar que este experimento fue realizado a modo de abordaje preliminar que explora la posible interacción, a través de PSD-95, de las proteínas NR2B y Cdk5, como se plantea en la hipótesis de esta tesis.

Sujetos: Se utilizaron para este experimento 6 sujetos macho, de la cepa Wistar, de PN23, 3 para cada grupo experimental (No pre-expuestos vs. Pre-expuestos). Debido a que la concentración de proteínas en sinaptosomas de HPCd necesarias para la realización de la inmunoprecipitación es mayor a la que se obtiene de sujetos individuales, se agruparon las muestras de los 3 sujetos de cada condición y se realizó el ensayo de inmunoprecipitación.

Procedimiento: Los sujetos pertenecientes al grupo No Preexpuesto (n=3) se retiraron de manera individual de la sala de alojamiento hacia la sala de sacrificio, en donde fueron sacrificados por decapitación y el HPCd fue removido y homogeneizado en Sucrosa 0.32M para obtener la fracción sinaptosomal, que luego fue procesada como se describe en el apartado (e) Ensayo de Inmunoprecipitación, de la sección 4.1 (Procedimientos generales). Con respecto a los sujetos pertenecientes al grupo Preexpuesto (n=3), los mismos fueron transportados individualmente a la sala de experimentación en donde se colocaron en la caja de condicionamiento para libre

exploración por 5 minutos (igual que en la sesión de preexposición de los experimentos 3a y 3b), para luego ser devueltos a la jaula hogar correspondiente, en donde permanecieron por 40 minutos. Luego de transcurrido ese tiempo, los sujetos se transportaron individualmente a la sala de sacrificio en donde se procedió de igual modo que con los sujetos del grupo No preexpuesto.

*Análisis de expresión de proteínas:* Mediante la técnica de Western Blot, descrita en los procedimientos generales y en esta misma serie experimental (experimentos 3a y 3b), se analizaron los niveles de expresión de las proteínas PSD-95 (que fue la proteína que se precipitó en el ensayo) y Cdk5, tanto en el sobrenadante como en la fracción de muestra correspondiente al inmunoprecipitado propiamente dicho. A su vez, se cuantificó la proteína tubulina y se utilizó como control de carga proteica de los carriles de cada grupo. Las densidades ópticas (D.O.) de las bandas de cada proteína se determinaron utilizando el programa ImageJ, y a partir de ellas se obtuvieron las razones (radio) de la D.O. de cada proteína / D.O. tubulina (normalización en relación a la carga total de proteínas), para cada grupo experimental.

*Análisis estadístico de los datos.* La única variable independiente en el experimento 3c fue el factor "Grupo" conformado por 2 condiciones: No pre-expuestos y pre-expuestos (sacrificados a los 40min posteriores a la pre-exposición, que fueron seleccionados luego de los resultados obtenidos en los experimentos 3a y 3b). No se realizaron análisis estadísticos debido a la falta de replicas del ensayo piloto, sino que se presentan los datos del radio entre Cdk5/PSD-95 obtenidos de cada condición experimental.

*Serie experimental 4: Evaluación del número y tipo de espinas dendríticas en el Hipocampo dorsal, de ratones entrenados en el paradigma FCPC.*

En esa serie experimental se realizó un análisis estructural de la densidad y morfología de espinas dendríticas en respuesta al entrenamiento de ratones Thy1-GFP en el paradigma FCPC. Los objetivos de esta serie son los de (a) evaluar si los ratones Thy1-GFP muestran el efecto de facilitación del condicionamiento por pre-exposición

al contexto, tal como se observó en ratas en las series experimentales anteriores, analizando el repertorio conductual completo que ejecutan estos animales; (b) estudiar si el entrenamiento en el paradigma FCPC trae aparejada una modificación en la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo dorsal de los ratones, mediante el análisis de neuronas piramidales de CA1.

#### Experimento 4a: FCPC en ratones Thy1-GFP

Sujetos: Se utilizaron 27 sujetos representativos de 6 camadas de ratones de la cepa Thy1-GFP, que tuvieron, al comienzo del experimento entre PN30-PN35. En la primera semana postnatal los ratones se genotipificaron y se marcaron los correspondientes Thy1-GFP para ser utilizados en esta serie experimental.

Procedimientos: Se realizó el paradigma de FCPC en los ratones (Experimento 4a), con procedimientos similares a los descritos en la serie experimental 1. Las fases se describirán a continuación. Luego de la sesión de evaluación, los animales fueron inmediatamente anestesiados con ketamina/xilacina i.p., tal como se describió en los procedimientos generales, para luego ser perfundidos y sus cerebros removidos para la preparación de los cortes (100µm) para microscopía confocal, y el posterior análisis de la densidad y morfología de las espinas dendríticas (Experimento 4b).

Fase 1: Pre-exposición. La metodología fue la misma que en las series experimentales anteriores, en donde los sujetos pertenecientes al grupo pre-expuesto se trasladaron a la sala de experimentación en donde se los colocaron en la caja de condicionamiento para libre exploración.

Fase 2: Condicionamiento – Descarga inmediata. Los sujetos de ambas condiciones experimentales, 24hs posteriores al condicionamiento, se transportaron a la sala de condicionamiento en donde recibieron una descarga inmediata de 0 o 0.75mA durante 2 segundos (intensidad utilizada en la literatura de ratones en los paradigmas de condicionamiento de miedo contextual).

Fase 3: Evaluación. Todos los sujetos experimentales se evaluaron durante 5min en esta sesión, la cual fue filmada para el posterior análisis de las variables.

VARIABLES dependientes: Se evaluaron en este análisis las mismas variables dependientes antes descritas (1) actividad horizontal, (2) actividad vertical, (3) higiene, (4) congelamiento, (5) bolos fecales y (6) %de congelamiento.

Experimento 4b: Análisis de la densidad y morfología de espinas dendríticas de neuronas piramidales de CA1 en el HPCd de ratones Thy1-GFP

Análisis de las imágenes de microscopía confocal: Luego del tratamiento de los cerebros para la recolección de imágenes confocales, se analizaron por grupo experimental las neuronas piramidales de 3 sujetos experimentales. Las imágenes se tomaron de dendritas apicales terciarias o cuaternarias, seleccionando tres segmentos por neurona de al menos 100µm, de 3 neuronas por ratón, cada una seleccionada de un corte de HPCd diferente. Las imágenes fueron adquiridas con el microscopio Olympus FV1000, utilizando un objetivo de 60x. Los cortes ópticos fueron de 0.17µm. A través del programa AutoQuant (Advanced Image Deconvolution and Visualization Software –MediaCybernetics) se deconvolucionaron las imágenes que fueron utilizadas para cuantificar las espinas dendríticas y clasificarlas. Las espinas fueron analizadas con el programa NeuronStudio (Beta – CNIC).

Análisis estadístico de los datos: Se realizaron los mismos análisis descriptos para las series anteriores: ANOVAs múltiples y pruebas post hoc *a posteriori* cuando fuesen necesarias, para detectar y explorar las interacciones y los resultados significativos.



# 5

## Resultados

En esta sección se describirán los resultados obtenidos de las 4 series experimentales. Se resumirán las figuras mostrando los efectos principales de cada una de las variables, en algunos casos correspondientes al tiempo total de ejecución de las variables y en otros casos al análisis por minuto. La intención de esta metodología es resumir y permitir la interpretación de los datos sin redundar en los gráficos, debido a la gran cantidad de variables y de grupos experimentales utilizados en los diseños experimentales.

### **5.1 Serie experimental 1: Evaluación del efecto de Facilitación del Condicionamiento contextual por Pre-exposición al Contexto, en ratas destetadas y pre-destetadas.**

#### *Experimento 1a – PN23*

La lámina correspondiente a la **Figura 17** presenta los resultados obtenidos en el experimento 1a, para las variables dependientes analizadas en función del tratamiento de pre-exposición (Pre-expuestos o No Pre-expuestos) x condicionamiento (0, 0.5 o 1.5mA). Los sujetos de este experimento fueron pre-expuestos en el PN23, condicionados en el PN24 y evaluados en el PN25. Los datos se sometieron a ANOVAS

con los factores Pre-exposición y Condicionamiento como variables entre grupos y a los minutos de evaluación (5 niveles) como factor dentro de cada grupo. Como se menciona en la sección de metodología específica, tanto para esta serie como para el resto de las realizadas en esta tesis, cabe recordar que se utilizaron sólo animales machos en el desarrollo de los experimentos.

Actividad horizontal: El ANOVA para esta variable reveló un efecto principal de *condicionamiento* [ $F(2,74) = 5.82$ ;  $p < 0.05$ ], que indicó que los sujetos condicionados con la intensidad eléctrica más elevada (1.5mA) exploraron la caja de condicionamiento significativamente menos tiempo que sujetos del resto de las condiciones, efecto que se observó tanto en grupos pre- como no pre-expuestos. El análisis por minuto de esta variable reveló una *interacción* significativa al evaluar los factores pre-exposición x condicionamiento x minuto [ $F(8,296) = 2.19$ ;  $p < 0.05$ ]. Se realizaron ANOVAS sucesivos para cada minuto de evaluación, para determinar el locus de esta interacción. Se encontraron efectos significativos de condicionamiento en los min. 1 al 4 de evaluación [todos los  $F_s(2,74) > 4.54$ ; todos los  $p_s < 0.05$ ], indicando que los sujetos condicionados con la descarga de 1.5mA ejecutaron en menor medida esta variable en los min 1-4 de evaluación (Fig.17).

Actividad vertical: El resultado del análisis de esta variable demostró un efecto principal de *pre-exposición* [ $F(1,74) = 7.71$ ;  $p < 0.05$ ] que reflejó que, en animales pre-expuestos, la descarga eléctrica disminuye significativamente la ejecución de esta conducta. A su vez se detectó una interesante *triple interacción* entre pre-exposición x condicionamiento x minuto [ $F(8,296) = 2.36$ ;  $315 p < 0.05$ ], la cual fue evaluada en ANOVAS siguientes de dos vías (pre-exposición x condicionamiento) para cada min del test. Se observó que en el primer minuto de evaluación los sujetos no pre-expuestos condicionados (ya sea con 0.5 o 1.5mA) transcurrieron significativamente más tiempo realizando exploración vertical que el resto de las condiciones [ $F(2,74) = 4.71$ ;  $p < 0.05$ ] (Fig.17).

Higiene: El efecto de *condicionamiento* se detectó en el ANOVA para esta variable, que refleja que, independientemente del tratamiento de pre-exposición, los sujetos que recibieron una descarga eléctrica, ya sea moderada o elevada, ejecutan menos conductas de higiene que los controles [ $F(2,74) = 11.69$ ;  $p < 0.05$ ] (Fig.17).

Congelamiento: El análisis para esta variable dependiente arrojó resultados significativos principales de *pre-exposición* [ $F(1,74) = 4.68$ ;  $p < 0.05$ ] y de *condicionamiento* [ $F(2,74) = 13.86$ ;  $p < 0.05$ ], indicando que los animales tratados con una intensidad eléctrica de 1.5mA realizan la conducta de inmovilización por un periodo mayor de tiempo, en relación al resto de los sujetos, independientemente de si fueron pre-expuestos o no al contexto de condicionamiento. El aumento en la inmovilización estuvo cerca de la significación estadística para la intensidad eléctrica de 0.5mA ( $p=0.05$ ). A su vez, y de manera interesante, la *triple interacción* (pre-exposición x condicionamiento x minuto de evaluación) también alcanzó niveles significativos [ $F(8,296) = 2.56$ ;  $p < 0.05$ ], por lo que, al igual que en los resultados anteriores, se procedió a realizar ANOVAs posteriores de dos vías (pre-exposición x condicionamiento) en cada minuto del test para explorar esta interacción. Los minutos 1 [ $F(2,74) = 3.47$ ;  $p < 0.05$ ] y 2 [ $F(2,74) = 3.27$ ;  $p < 0.05$ ] del test revelaron que los sujetos pre-expuestos condicionados con 1.5mA son los que expresan en mayor medida esta conducta, en relación a los sujetos de las condiciones restantes. A su vez, en el segundo minuto de evaluación los sujetos no pre-expuestos condicionados (1.5mA) mostraron mayor exploración que los no condicionados, mientras que en los minutos 3 y 4 el ANOVA indicó un efecto de condicionamiento que refleja mayor inmovilización en grupos que recibieron descarga eléctrica de 1.5mA, independientemente de la pre-exposición en estos puntos temporales [ $F(2,74) = 9.06$ ;  $p < 0.05$ , and  $F(2,74) = 10.18$ ;  $p < 0.05$ , respectivamente] (Fig.17).

% de congelamiento: El ANOVA para esta variable dependiente reveló efectos significativos principales de *pre-exposición* [ $F(1,74) = 6.76$ ;  $p < 0.05$ ] y *condicionamiento* [ $F(2,74) = 13.45$ ;  $p < 0.05$ ], mostrando puntuaciones mayores en los sujetos pre-expuestos al contexto que en los no pre-expuestos independiente del tratamiento de condicionamiento. Además, los sujetos condicionados con 1.5mA ejecutaron mayor % de congelamiento que los no condicionados o condicionados con 0.5mA, de manera significativa, si bien los sujetos condicionados con la intensidad de 0.5mA estuvieron cerca del nivel de significancia estadística ( $p=0.06$ ). La interacción entre pre-exposición x condicionamiento se encontró cercana, a su vez, de la significación estadística [ $F(2,74) = 2.90$ ;  $p = 0.06$ ]. Al realizar comparaciones planeadas

*a priori*, los sujetos pre-expuestos y tratados con la intensidad 1.5mA puntuaron significativamente más alto que los no pre-expuestos condicionados con la misma intensidad, o que aquellos pre-expuestos controles [todos los  $F_{s(1,74)} \geq 12.53$ ; todos los  $p < 0.001$ ] (Fig.17).

Bolos fecales: Los sujetos que recibieron una descarga eléctrica, de cualquiera de las 2 intensidades evaluadas, defecaron más en la sesión de evaluación que los sujetos no condicionados controles, sin intervenir el efecto de pre-exposición recibido, tal como arrojó el ANOVA para esta variable [ $F(2,75) = 24.01$ ;  $p < 0.05$ ] (efecto de *condicionamiento*) (Fig.17).

En resumen, se desprende de los resultados obtenidos en el experimento 1a, realizado en sujetos de PN23, un patrón similar al reportado en la literatura previa para la variable dependiente % de congelamiento, que demuestra que los sujetos pre-expuestos que fueron condicionados con una descarga eléctrica de 1.5mA ejecutaron un mayor desempeño en esta variable que los sujetos no pre-expuestos condicionados con la misma intensidad de descarga eléctrica. Además, la incorporación de un grupo experimental no condicionado (control) nos permitió detectar que los sujetos pertenecientes al grupo no pre-expuesto, pero que recibieron una descarga de 1.5mA mostraron mayores puntuaciones en el % de congelamiento que los controles correspondientes no condicionados. La intensidad eléctrica de 0.5mA sólo arrojó un efecto marginal en términos de congelamiento. Por otro lado, en algunas de las variables dependientes (actividad vertical, higiene o bolos fecales) los sujetos condicionados con 1.5mA se comportaron de la misma manera que los que recibieron la descarga menor de 0.5mA, difiriendo en ambos casos de los controles no condicionados. Así, se detectó que la descarga eléctrica inmediata suprimió la conducta de higiene e indujo una mayor defecación en la sesión de evaluación, independientemente del tratamiento de pre-exposición recibido por los animales. La exploración vertical se vio reducida en los sujetos pre-expuestos condicionados (0 o 0.5mA), mientras que, en los sujetos no pre-expuestos, se observó significativamente aumentada en el 1° minuto de evaluación. Finalmente, la descarga eléctrica de 1.5mA suprimió la actividad horizontal independientemente del tratamiento de pre-exposición (Fig.17).

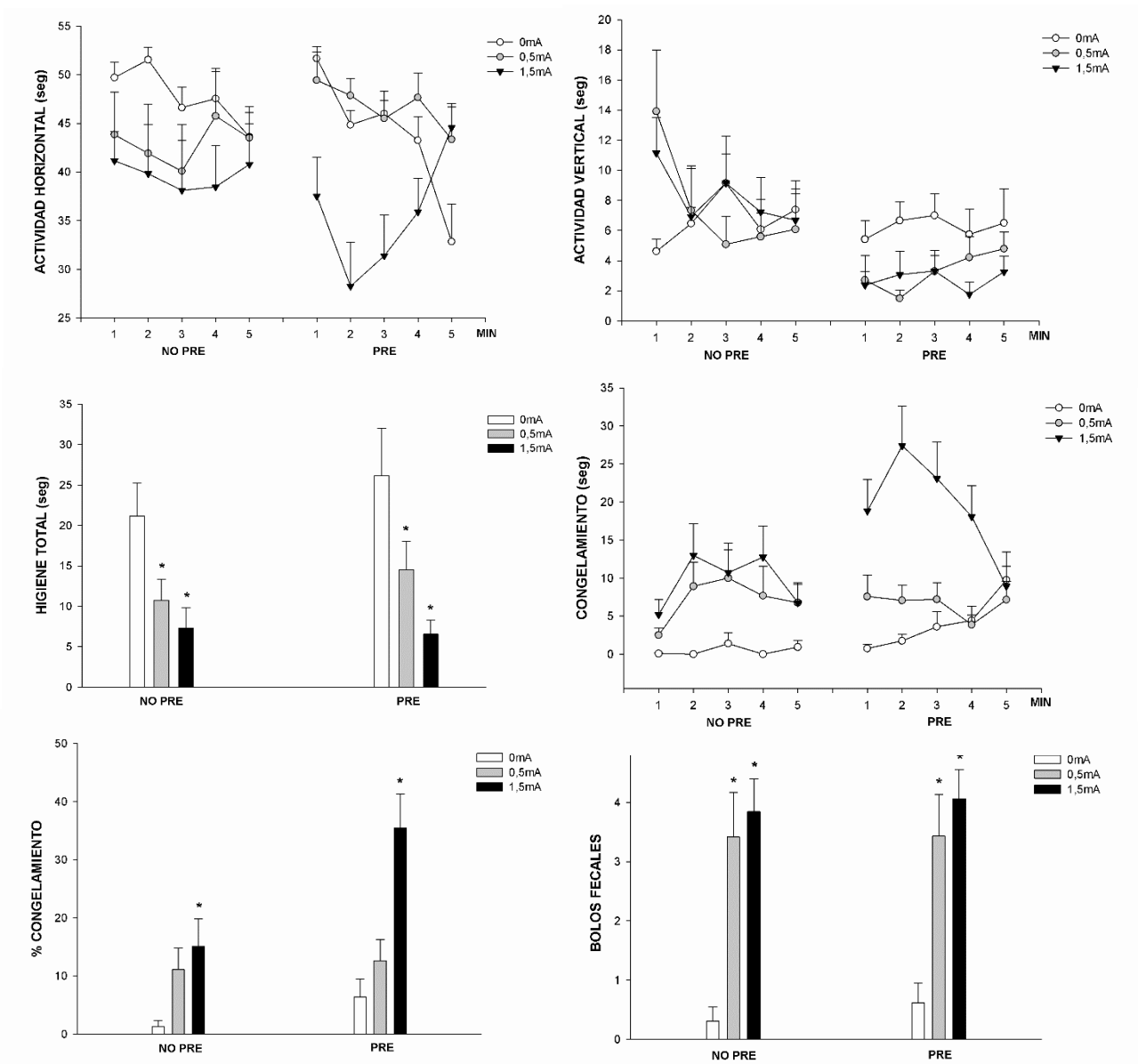


Fig.17: Evidencias de aprendizaje de contexto en sujetos de PN23 entrenados en el FCPC, a través de múltiples variables de análisis. Resultados obtenidos en sujetos de PN23 de las diferentes variables dependientes analizadas: Actividad horizontal, Actividad vertical, Higiene, Congelamiento, % de Congelamiento y Bolos fecales en función de los tratamientos de pre-exposición (No pre-expuestos o pre-expuestos) y el condicionamiento (0, 0.5 ó 1.5mA). Las barras verticales ilustran el error estándar de la media. \*p<0.05

### Experimento 1b – PN17

La lámina correspondiente a la **Figura 18** presenta los resultados obtenidos en el experimento 1b, para las variables dependientes analizadas en función del tratamiento de pre-exposición (Pre-expuestos o No Pre-expuestos) x condicionamiento

(0, 0.5 o 1.5mA). Los sujetos de este experimento fueron pre-expuestos en el PN17, condicionados en el PN18 y evaluados en el PN19.

Actividad horizontal: El ANOVA para esta variable reveló una *interacción* significativa de pre-exposición x condicionamiento [ $F(2,72) = 3.27$ ;  $p < 0.05$ ], que indica que los sujetos pre-expuestos que recibieron una descarga de 1.5mA ejecutaron una menor conducta horizontal que los controles correspondientes no condicionados (Fig.18).

Actividad vertical: Se obtuvo del ANOVA para esta variable un efecto principal significativo de *pre-exposición* y de *condicionamiento* [ $F(1,72) = 5.96$ ;  $p < 0.05$  y  $F(2,72) = 3.21$ ;  $p < 0.05$ , respectivamente], además de una *triple interacción* pre-exposición x condicionamiento x minuto de evaluación [ $F(8,288) = 3.64$ ;  $p < 0.05$ ]. El análisis post hoc determinó que los sujetos no pre-expuestos al contexto realizan mayor tiempo la conducta vertical que los sujetos pre-expuestos. ANOVAs posteriores se realizaron para analizar la interacción obtenida, considerando las puntuaciones para cada minuto de esta variable. Este análisis mostró un efecto principal significativo durante el minuto 1 y 4 del test que correspondieron al factor *condicionamiento* [ $F(2,75) = 3.97$ ;  $p < 0.05$ ;  $F(2,75) = 7.76$ ;  $p < 0.05$ , respectivamente]. Los análisis post hoc revelaron que, durante el primer minuto del test, los sujetos condicionados con una intensidad de 1.5mA realizaron mayor tiempo de conducta vertical, mientras que en el minuto 4 todos los sujetos condicionados (0.5 ó 1.5mA) realizaron menor actividad vertical que los controles. Si bien la triple interacción pre-exposición x condicionamiento x minuto de evaluación no fue significativa, se observa claramente en la Figura 18 para esta variable, que el efecto de condicionamiento durante el 1° minuto de evaluación fue guiado principalmente por el tratamiento de pre-exposición, lo cual es un resultado similar al obtenido en el experimento 1a para esta variable. Así, al realizar una comparación planeada para este efecto, se determinó que los sujetos no pre-expuestos condicionados con 1.5mA realizaron mayor conducta vertical que los sujetos pre-expuestos de la misma condición, o que los controles no pre-expuestos no condicionados ó condicionados con 0.5mA [todos los  $F_s(1,72) \geq 7.88$ ; todos los  $p_s < 0.01$ ] (Fig.18).

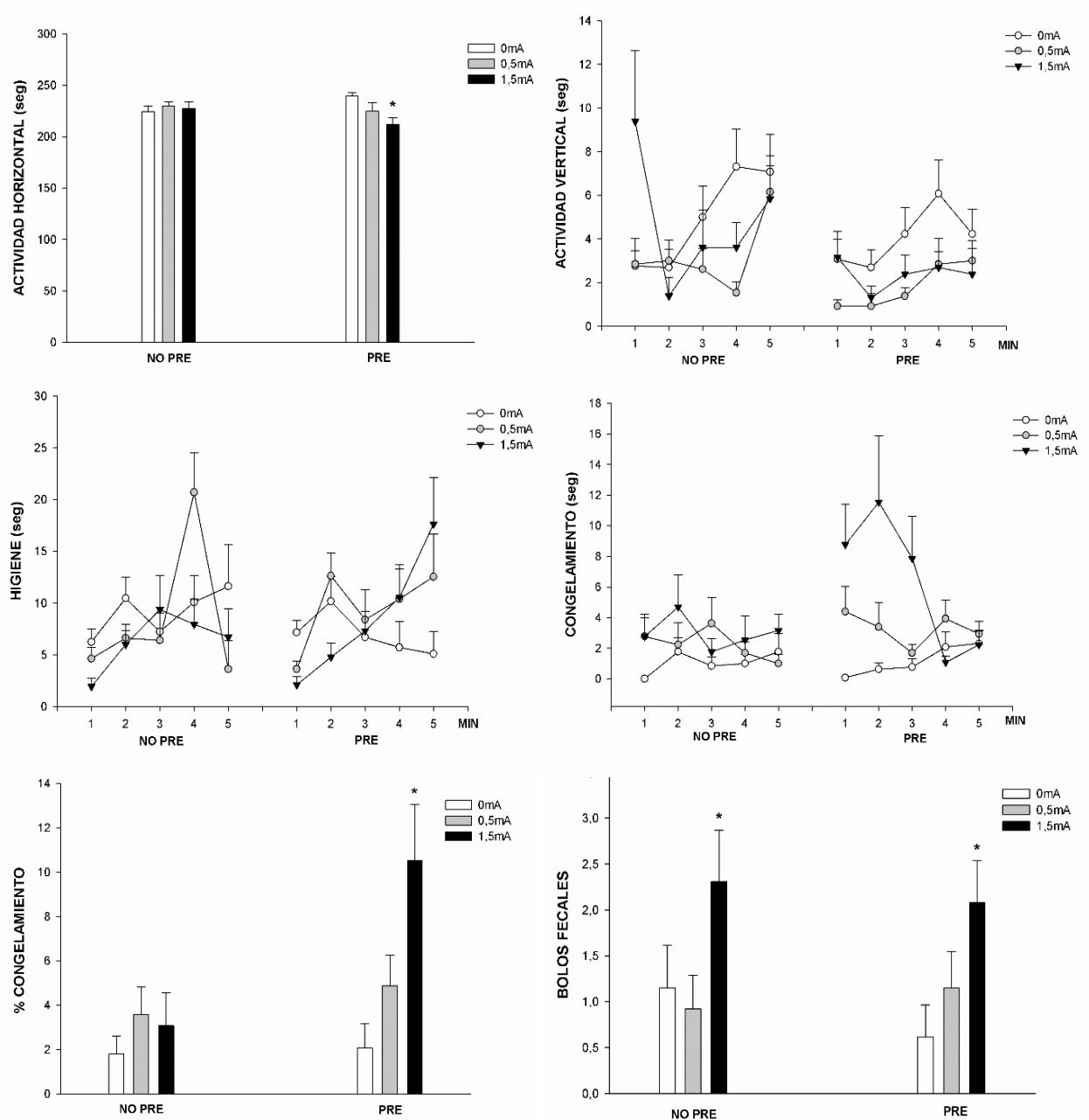


Fig.18: Evidencias de aprendizaje contextual en sujetos de PN17 entrenados en el FCPC, a través de múltiples variables de análisis. Resultados obtenidos en sujetos de PN17 de las diferentes variables dependientes analizadas: Actividad horizontal, Actividad vertical, Higiene, Congelamiento, % de Congelamiento y Bolos fecales en función de los tratamientos de pre-exposición (No pre-expuestos o pre-expuestos) y el condicionamiento (0, 0.5 ó 1.5mA). Las barras verticales ilustran el error estándar de la media. \* $p < 0.05$

Higiene: El ANOVA reveló una triple interacción significativa entre pre-exposición x condicionamiento x minuto de evaluación [ $F(8,288) = 2.39$ ;  $p < 0.05$ ]. ANOVAs de doble

vía se realizaron para explorar esta interacción por minuto, los cuáles arrojaron un efecto significativo de condicionamiento en los minutos 1, 2 y 4 de evaluación [todos los  $F_s(2,72) \geq 3.89$ ; todos los  $p_s < 0.05$ ]. Pruebas post hoc indicaron que en el minuto 1 de evaluación, los sujetos condicionados (ambas intensidades) realizaron menos higiene que los no condicionados, independientemente del tratamiento de pre-exposición. En el minuto 2 se encontró el mismo resultado, pero sólo para la intensidad de descarga de 1.5mA. En los últimos minutos de evaluación, los grupos que realizaron menos higiene al comienzo de la sesión, ya que estaban comprometidos en la ejecución de otra conducta, comenzaron a realizar más tiempo de comportamientos de higiene que los controles. Así, al minuto 4 de evaluación los sujetos entrenados con 0.5mA ejecutaron significativamente más higiene que los controles. En el minuto 5, se obtuvo una interacción significativa de pre-exposición x condicionamiento que indicó que los sujetos pre-expuestos condicionados con 1.5 realizaron por más tiempo conductas de higiene que los controles (0mA) o no pre-expuestos condicionados con 1.5mA [ $F(2,72) = 3.73$ ;  $p < 0.05$ ](Fig.18).

Congelamiento: Se obtuvo, del ANOVA correspondiente, que esta variable arroja un efecto significativo principal tanto de *pre-exposición*, como de *condicionamiento* [ $F(1,72) = 4.79$ ;  $p < 0.05$ , y  $F(2,72) = 9.19$ ;  $p < 0.05$ , respectivamente], indicando que las crías condicionadas con 0.5 o 1.5mA realizan más congelamiento que los controles no condicionados. El efecto en este caso, fue guiado por el tratamiento de pre-exposición, debido a que este resultado se encontró solamente en los sujetos pre-expuestos. La *triple interacción* pre-exposición x condicionamiento x minuto de evaluación también alcanzó resultados significativos [ $F(8,288) = 2.37$ ;  $p < 0.05$ ], por lo que se condujeron análisis de seguimiento con ANOVAs de dos vías (pre-exposición x condicionamiento). Las mismas, demostraron efecto de *pre-exposición* [ $F(1,72) = 4.47$ ;  $p < 0.05$ ] y *condicionamiento* [ $F(2,72) = 7.57$ ;  $p < 0.05$ ] durante el minuto 1 de evaluación, un efecto de *condicionamiento* [ $F(2,72) = 5.45$ ;  $p < 0.05$ ] en el 2° minuto, y la *doble interacción* pre-exposición x condicionamiento en el 3° [ $F(2,72) = 4.32$ ;  $p < 0.05$ ]. Los análisis post hoc demostraron que en el minuto 1, los animales pre-expuestos realizan más tiempo de congelamiento que los no pre-expuestos, que los sujetos condicionados ejecutan, a su vez, un mayor tiempo de congelamiento que los



no condicionados, tanto los que recibieron 0.5 como 1.5mA. En el minuto 2, se encontró el mismo patrón para esta variable pero sólo con los sujetos condicionados con 1.5mA. el 3° minuto de evaluación arrojó un resultado mayor para esta variable en los sujetos pre-expuestos condicionados con 1.5mA (Fig.18).

% de Congelamiento: El análisis arrojó un efecto principal de *pre-exposición* y de *condicionamiento*, y una *doble interacción* entre ambos factores [ $F(1,72) = 5.80$ ;  $p < 0.05$ ,  $F(2,72) = 5.13$ ;  $p < 0.05$  y  $F(2,72) = 3.26$ ;  $p < 0.05$ , respectivamente]. Los análisis post hoc realizados determinaron que las puntuaciones de los sujetos condicionados con la intensidad de 1.5mA fueron mayores que en las demás condiciones (Fig.18).

Bolos fecales: El ANOVA reveló que hay un efecto significativo principal del factor *condicionamiento* para esta variable [ $F(2,72) = 5.34$ ;  $p < 0.05$ ], que indica que las ratas condicionadas con 1.5mA defecan más que los controles y las que recibieron 0.5mA, durante la evaluación, independientemente del tratamiento de pre-exposición (Fig.18).

En resumen, las crías de PN17 pre-expuestas que recibieron una descarga eléctrica mostraron un patrón comportamental alterado en comparación con los controles respectivos. Específicamente, las ratas entrenadas en el FCPC con una descarga eléctrica de 1.5mA ejecutaron menos tiempo de exploración horizontal, ya que ejecutaron por mayor tiempo la respuesta de inmovilización. Este grupo de sujetos (Pre-expuestos, condicionados al PN17) comenzó a desempeñar conductas de higiene más tardíamente en la sesión de evaluación y defecaron más que los controles. El comportamiento de los sujetos no pre-expuestos también se vio afectado por el condicionamiento. Al comienzo de la evaluación, las crías no pre-expuestas tratadas con una descarga de 1.5mA desempeñaron mayor tiempo de exploración vertical que sus compañeras del resto de las condiciones, de manera similar a lo observado en los sujetos destetados del experimento 1a, y además, realizaron menos tiempo de conductas de higiene y más congelamiento que los controles respectivos. Este grupo, a su vez, defecó significativamente más que los controles no condicionados. Sólo se observaron evidencias de condicionamiento mínimas a esta edad al emplear la intensidad eléctrica de 0.5mA durante el condicionamiento, y sólo en ciertas variables dependientes analizadas (como en la conducta de higiene y en la exploración vertical) (Fig.18).

## **5.2 Serie experimental 2: Evaluación del efecto de la inhibición de los receptores NMDA en el paradigma de Facilitación del Condicionamiento por Pre-exposición al Contexto (FCPC), en sujetos destetados y pre-destetados.**

La serie experimental 2, aborda el análisis del efecto del inhibidor MK-801 previo a la sesión de pre-exposición o fase 1 del paradigma de FCPC en sujetos de PN23 y PN17 (Experimento 2a y 2b, respectivamente), utilizando una dosis del fármaco que se considera que no modifica la actividad basal de los roedores de las edades analizadas en esta tesis (0.1mg/Kg MK-801) . A su vez, se estudió en esta serie el efecto del MK-801 administrado previamente a la sesión de condicionamiento en sujetos No pre-expuestos y de PN23 únicamente, administrando previamente a la sesión de condicionamiento una inyección ip. de 0.1mg/Kg, 0.2mg/Kg o solución salina a los sujetos evaluados.

### *Experimento 2a – MK-801 en la fase de Pre-exposición en sujetos de PN23*

La lámina correspondiente a la **Figura 19** presenta los resultados obtenidos en el experimento 2a, para las variables dependientes analizadas en función del tratamiento farmacológico recibido antes de la fase de pre-exposición (salina o MK-801) x el tratamiento de pre-exposición (no pre-expuestos o pre-expuestos) x el condicionamiento (0 ó 1.5mA). Los sujetos de este experimento fueron pre-expuestos en el PN23, condicionados en el PN24 y evaluados en el PN25. Cabe recordar que sólo se utilizó la intensidad de descarga eléctrica más elevada en este experimento, ya que la misma demostró efectos más contundentes en ambas edades en el experimento 1. Además, en este experimento se agruparon los sujetos no condicionados en un solo grupo, denominado Control, para facilitar el análisis de los datos y su interpretación, debido a que este agrupamiento no produjo modificaciones en los resultados. Por lo tanto las diferentes combinaciones de tratamientos, correspondiente a los factores a evaluar se resumen en un único factor, denominado “grupo” que consta de los siguientes niveles: (1) control, (2) no pre-expuestos-1.5mA-salina (NP1.5-sal), (3) no pre-expuestos-1.5mA-Mk801 (NP1.5-MK), (4) pre-expuestos-1.5mA-salina (P1.5-sal) y (5) pre-expuestos-1,5mA-MK801 (P1.5-MK). Recordamos en este punto que la dosis de

MK-801 utilizada en este experimento fue la de 0.1mg/kg, obtenida de la literatura en la que se observa que bloquea el aprendizaje contextual en el FCPC en sujetos de PN23 (Schiffino et al. 2011), y que las variables dependientes analizadas en esta sección fueron las mismas que en los experimentos correspondientes a la sección anterior (Fig.19).

Exploración horizontal: El ANOVA de una vía, al explorar el factor “Grupo” para esta variable, arrojó diferencias significativas [ $F(4, 73)=6,1337, p<0.05$ ], que demostraron, mediante pruebas post hoc (Duncan), que los sujetos del grupo pre-expuesto, condicionado y que recibe salina en la fase de pre-exposición, difieren significativamente, no sólo del grupo control, sino también del resto de los grupos experimentales, incluidos los sujetos pre-expuestos condicionados que fueron tratados previamente con MK-801, realizando los mismos (P1.5-sal) una menor actividad horizontal que los grupos mencionados (Fig.19).

Exploración vertical: El análisis de la actividad vertical demostró un efecto principal de grupo [ $F(4, 73)=3,6899, p<0.05$ ] que determinó (a través de pruebas post hoc) que los sujetos pertenecientes a la condición P1.5-sal difieren significativamente, realizando menor exploración vertical, de los sujetos no pre-expuestos condicionados, que recibieron tanto salina como MK-801 durante la sesión de pre-exposición, como de los sujetos pre-expuestos condicionados que recibieron MK-801, si bien no difirieron de los sujetos controles. No se observaron diferencias entre el resto de los grupos en la evaluación de esta variable. Por otro lado, el ANOVA reveló una interacción entre los factores grupo x minuto de evaluación [ $F(16, 292)=4,4700, p<0.05$ ]. Para explorar esta interacción, se analizaron los resultados obtenidos por minuto. De manera interesante, se encontró que en el minuto 1 de evaluación, los sujetos no pre-expuestos condicionados que recibieron cualquiera de los tratamientos farmacológicos (NP1.5-sal y MK-801), así como los pre-expuestos condicionados que recibieron MK801 (P1.5-MK) ejecutaron significativamente mayor exploración vertical que los sujetos del grupo control y los sujetos de la condición P1.5-sal. Esta última condición no difirió de los controles. En el minuto 4° de evaluación se observó un efecto del factor grupo [ $F(4, 73)=2,8727, p<0.05$ ] que indicó una diferencia significativa entre sí de los grupos no pre-expuestos condicionados, realizando una menor actividad vertical en este punto

temporal el grupo NP1.5sal, la cual difiere también, por ser menor del grupo P1.5MK (Fig.19).

Higiene: El ANOVA para esta variable reveló una diferencia significativa entre los grupos experimentales [F(4, 73)=4,3518,  $p<0.05$ ]. Esta diferencia reflejó un efecto de condicionamiento en donde todos los sujetos condicionados realizan menor higiene que el control, si bien sólo reflejan valores significativos en el análisis los grupos NP1.5-sal, P1.5-sal y P1.5-MK, mientras que el grupo NP1.5MK se acerca a la significación estadística (Fig.19).

Congelamiento: El ANOVA arrojó un efecto principal de grupo para esta variable [F(4, 73)=19,029,  $p<0.05$ ] así como una interacción doble de grupo x minuto de evaluación [F(16, 292)=5,3309,  $p<0.05$ ]. El efecto de grupo revela mediante pruebas post hoc que el grupo P1.5-sal difiere significativamente del resto de los grupos realizando mayor tiempo total de congelamiento en la evaluación de FCPC. A su vez, se reflejó en la evaluación minuto a minuto de la evaluación el siguiente resultado, que se observa claramente en la figura 19, que en los minutos 1, 3 y 4 [F(4, 73)=46,412,  $p<0.05$ ; F(4, 73)=13,476,  $p<0.05$ ; F(4, 73)=6,5737,  $p<0.05$ , respectivamente], el grupo P1.5-sal ejecuta mayor tiempo de congelamiento que el resto de los grupos experimentales, en el 2 [F(4, 73)=15,031,  $p<0.05$ ] que los grupos control, NP1.5sal y P1.5-MK (Fig.19).

% de Congelamiento: El análisis arrojó, a través del ANOVA correspondiente para esta variable, un efecto principal de grupo [F(4, 73)=15,912,  $p<0.05$ ], que indica que los sujetos pre-expuestos condicionados, que recibieron salina en la pre-exposición ejecutan significativamente mayor % de congelamiento con respecto a todos los grupos experimentales analizados, lo cual se detectó mediante el análisis de la prueba post hoc de Duncan (Fig.19).

Bolos fecales: El número de defecaciones en la sesión de evaluación arrojó un efecto principal significativo en el ANOVA correspondiente [F(4, 73)=10,499,  $p<0.05$ ], evidenciando que los grupos condicionados realizan un mayor número de bolos fecales que los controles. Si bien el grupo NP1.5-sal no alcanzó la significación, se encontró cerca de la misma ( $p=0.06$ ) (Fig.19).

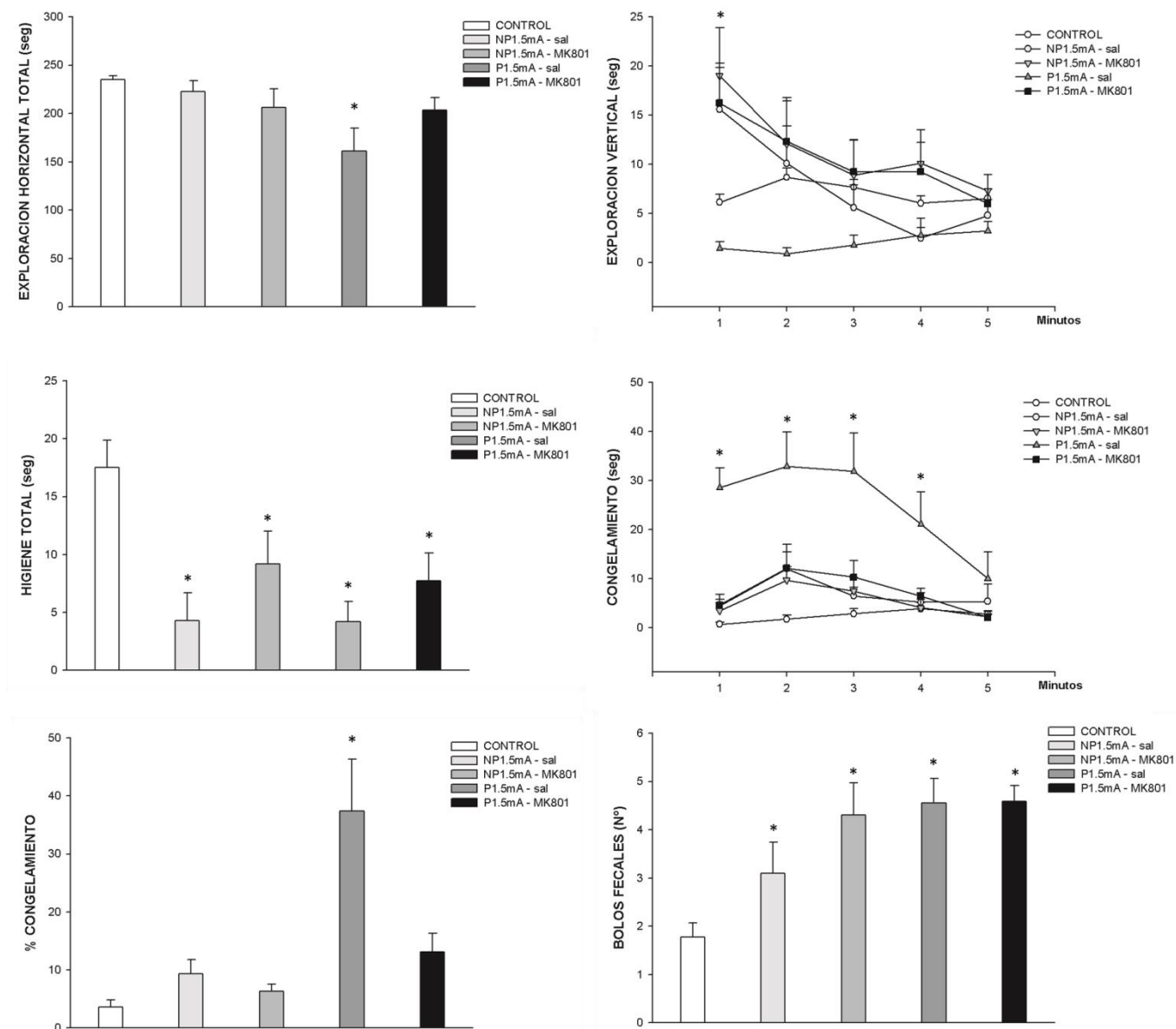


Fig.19: **La adquisición de aprendizaje de contexto es dependiente de los NMDAr en sujetos de PN23 entrenados en el FCPC.** en Resultados obtenidos en sujetos de PN23 de las diferentes variables dependientes analizadas: Actividad horizontal, Actividad vertical, Higiene, Congelamiento, % de Congelamiento y Bolos fecales en función de los tratamientos farmacológico (sal ó 0.1mg/Kg MK-801) pre-exposición (No pre-expuestos o pre-expuestos) y el condicionamiento (0 ó 1.5mA). Las barras verticales ilustran el error estándar de la media. \* $p < 0.05$

En resumen, el efecto principal del MK-801 antes de la pre-exposición modificó el patrón comportamental de los sujetos pre-expuestos, tal como era de esperarse. En

este sentido observamos que los animales pre-expuestos condicionados y administrados con la droga ejecutaron, para todas las variables dependientes analizadas, un patrón comportamental similar a los sujetos no pre-expuestos condicionados. Es decir, las respuestas de condicionamiento que observamos en ésta y en la serie experimental 1, que fueron guiadas por la descarga eléctrica inmediata, se mantuvieron para los animales no pre-expuestos condicionados y para los sujetos pre-expuestos condicionados (disminución en la actividad horizontal, aumento en la defecación y disminución en las conductas de higiene); mientras que, en las variables guiadas por el efecto de pre-exposición (como la actividad vertical), observamos que el grupo P1.5MK se comportó como los no pre-expuestos, difiriendo del grupo P1.5-sal, el cual mantuvo los efectos principales de las variables. Es decir, el grupo P1.5MK se comportó como los NP condicionados en el primer minuto de exploración vertical, y no reflejó el efecto de facilitación para la variable de congelamiento y %de congelamiento, que sí se evidenció en sujetos P1.5 que recibieron salina. En este sentido, el grupo P1.5-sal ejecutó un mayor % de congelamiento que los controles y además, que los grupos NP condicionados, así como también que el grupo P1.5-MK. Es decir que el MK-801 eliminó el efecto de pre-exposición, al ser administrado durante esta sesión, pero no eliminó las respuestas de miedo típicas guiadas por la descarga eléctrica inmediata, de los animales no pre-expuestos condicionados (Fig.19).

#### *Experimento 2b – MK-801 en la fase de Pre-exposición en sujetos de PN17*

Los principales resultados de este análisis se representan en la Figura 20.

Exploración horizontal: No se detectaron diferencias significativas en esta variable para sujetos de PN17.

Exploración vertical: El ANOVA para esta variable arrojó un efecto principal de grupo [ $F(4, 81)=5,4711, p<0.05$ ]. Pruebas post hoc para analizar este efecto mostraron diferencias significativas entre el grupo NP1.5-sal, que realiza significativamente mayor exploración que el resto de los grupos, y en el grupo P1.5-sal, quiénes realizan menor exploración vertical que el resto de los grupos, mientras que NP1.5-MK realiza

significativamente mayor exploración que los controles y el grupo P1.5-MK que se comporta igual que los sujetos del grupo control. Se detectó a su vez, una doble interacción entre grupo x minuto de evaluación [ $F(16, 324)=4,2506, p<0.05$ ]. Al explorar esta interacción para esclarecer el resultado del análisis de esta variable, y centrándonos en el efecto ya detectado en las series experimentales anteriores que destacan una respuesta particular en el minuto del test, se evaluó a través de ANOVAs minuto a minuto donde se detectaron los siguientes efectos: en el minuto 1 [ $F(4, 81)=11,707, p<0.05$ ] los sujetos NP1.5-sal realizaron significativamente mayor actividad vertical que el resto de las condiciones, y el grupo P1.5-sal menor actividad que los controles y los grupos no pre-expuestos, y que todos los sujetos del resto de las condiciones en el minuto 2 [ $F(4, 81)=2,5399, p<0.05$ ]. No se encontraron más efectos en el análisis minuto a minuto de esta variable (Fig.20).

Higiene: En el análisis del tiempo de ejecución de conductas de higiene para sujetos de PN17, encontramos un efecto principal de grupo [ $F(4, 81)=4,2641, p<0.05$ ] en donde, a través de evaluaciones post-hoc se pudo establecer que los sujetos de las condiciones NP1.5-sal y P1.5-MK realizaron significativamente esta conducta por menos tiempo que los controles y el resto de los grupos (Fig.20).

Congelamiento: El ANOVA para esta variable arrojó un efecto principal de grupo [ $F(4, 81)=9,0466, p<0.05$ ], así como una doble interacción entre grupo experimental x minuto de evaluación [ $F(16, 324)=3,2077, p<0.05$ ]. El primer efecto principal reflejó una diferencia significativa entre los sujetos que realizaron mayor congelamiento, pertenecientes al grupo P1.5-sal quienes difirieron significativamente del resto de los grupos excepto de los P1.5-MK. Este grupo (pre-expuesto condicionado tratado con el inhibidor MK) demostró a su vez, diferencias significativas con respecto a los niveles de congelamiento del grupo control y de uno de los NP (1,5-MK), esta diferencia se dio ya que el nivel de congelamiento de P1.5MK alcanzó un valor intermedio entre los sujetos que ejecutaron mayor congelamiento (P1.5-sal) y los controles. Con respecto al análisis por minuto, y tal como se observa claramente en la Figura 20, en el 1° minuto de evaluación ambos grupos pre-expuestos condicionados difirieron de los controles y de los grupos no pre-expuestos [ $F(4, 81)=10,418, <0.05$ ], realizando mayor congelamiento. Mientras que en el 2° minuto de evaluación sólo el grupo P1.5-sal realizó mayor tiempo

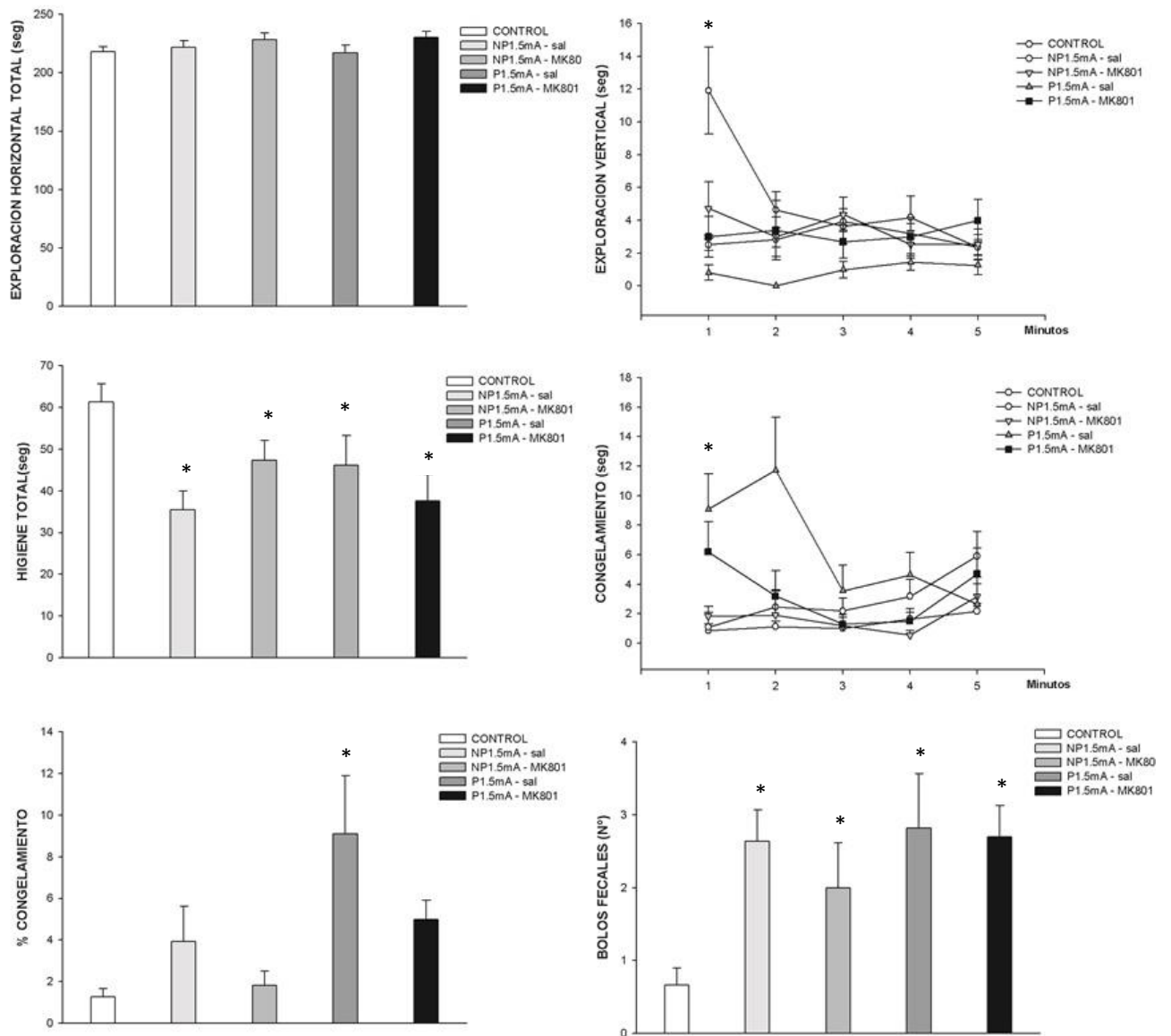
de congelamiento que el resto de las condiciones, incluida la condición P1.5-MK [ $F(4, 81)=6,7546$ ,  $p<0.05$ ]. No se obtuvieron más diferencias en el resto de los análisis por minuto (Fig.20).

% de Congelamiento: El ANOVA para esta variable demostró, al igual que el tiempo total de congelamiento, un efecto significativo del factor grupo [ $F(4, 81)=7,2124$ ,  $p<0.05$ ], que, mediante el análisis post hoc realizado, indicó que el grupo P1.5-sal difiere de todos los grupos experimentales, demostrando el % mayor, excepto del grupo P1.5-MK, quién difiere del control y del grupo NP1.5-MK (Fig.20).

Bolos fecales: Se determinó a través del análisis que los controles difieren de todos los grupos experimentales condicionados significativamente [ $F(4, 81)=7,4152$ ,  $p<0.05$ ], ya que todos los grupos condicionados realizan mayor número de bolos fecales que los sujetos pertenecientes al grupo control, si bien para la condición NP1.5-MK no se alcanzó la diferencia significativa ( $P=0.052$ ) (Fig.20).

En resumen, el análisis del efecto de la administración de MK-801 en la sesión de pre-exposición de sujetos de PN17 determinó que la administración del inhibidor modifica el patrón conductual de los sujetos con respecto al grupo control. Nuevamente, al igual que en el experimento 2a, las variables que fueron influenciadas por el efecto de condicionamiento, no modificaron el patrón de respuesta; mientras que las variables en las que la pre-exposición guía la respuesta comportamental, como el congelamiento, el % de congelamiento o la exploración vertical total, demuestra que en esta edad el MK-801 ejerce una acción que hace que los niveles de expresión de estas variables se acerquen más al comportamiento de los grupos NP condicionados. Se observan claramente estos fenotipos de respuesta intermedia en la Figura 20.





**Fig.20:** La adquisición de aprendizaje de contexto es dependiente de los NMDAr en sujetos de PN17 entrenados en el FCPC. Resultados obtenidos en sujetos de PN17 de las diferentes variables dependientes analizadas: Actividad horizontal, Actividad vertical, Higiene, Congelamiento, % de Congelamiento y Bolos fecales en función de los tratamientos farmacológico (sal o 0.1mg/Kg MK-801) pre-exposición (No pre-expuestos o pre-expuestos) y el condicionamiento (0 ó 1.5mA). Las barras verticales ilustran el error estándar de la media. \*p<0.05

### *Experimento 2c – MK-801 en la fase de Condicionamiento en sujetos de PN23*

La lámina perteneciente a la Figura 21 resume los principales efectos observados tras el análisis de la acción de 2 dosis diferentes de MK-801 en la sesión de condicionamiento en sujetos No Pre-expuestos. Es importante recordar que en esta serie se utilizaron sujetos macho de PN23, No Pre-expuestos, que se inyectaron con vehículo (solución salina) o MK-801 (0.1 ó 0.2mg/Kg), 30 minutos previos a recibir la descarga eléctrica inmediata (0 ó 1.5mA) en la fase 2 del FCPC. Los resultados corresponden al análisis de datos obtenidos de la sesión de evaluación, 24hs posteriores a la fase de condicionamiento, y representan al total de las variables que conforman al etograma exhaustivo.

Exploración horizontal: El ANOVA para esta variable arrojó un resultado significativo para el factor Grupo [ $F(5, 65)=5,7975, p<0.05$ ], así como también para la interacción entre los factores Grupo x minuto de evaluación [ $F(20, 260)=1,7584, p<0.05$ ]. Se realizaron pruebas post hoc para profundizar el análisis de los efectos significativos obtenidos, en donde encontramos, con respecto a la actividad horizontal total, una menor ejecución de esta acción por parte de los sujetos condicionados que recibieron la inyección del vehículo o de MK-801 0.1mg/Kg, con respecto a los grupos no condicionados que recibieron tanto vehículo como ambas dosis de MK-801, y los sujetos condicionados que recibieron MK-801 en la dosis más elevada utilizada (0.2mg/Kg). Es decir, la dosis de 0.2mg/Kg de MK-801 fue eficiente en eliminar los efectos de la descarga inmediata que mostraron los sujetos condicionados en la fase de condicionamiento, para esta variable experimental, mientras que la dosis de 0.1mg/Kg no arrojó diferencias con respecto a los sujetos condicionados (Fig.21).

Exploración vertical: Se observó un efecto significativo de la interacción entre los factores Grupo x minuto de evaluación [ $F(20, 260)=3,8539, p<0.05$ ], al analizar el tiempo de ejecución de conducta vertical de los sujetos pertenecientes a las 6 condiciones experimentales. Se realizaron ANOVAS subsecuentes por minuto para localizar las diferencias encontradas entre los grupos. En el primer minuto de evaluación, se obtuvo un efecto significativo del factor Grupo [ $F(5, 65)=3,8828,$

$p < 0.05$ ]. Los sujetos pertenecientes al grupo condicionado-salina realizan significativamente mayor actividad vertical que los controles-salina (condicionados con 0mA), replicando el efecto obtenido en los experimentos 1a y 2a de esta tesis, y también difiere significativamente del resto de los controles no condicionados (inyectados con ambas dosis de MK-801). A su vez, se observa que la inyección previa al condicionamiento de MK-801 0.1mg/Kg, en los sujetos condicionados, no difiere significativamente de los condicionados-salina, si bien la dosis de 0.2mg/Kg se acerca a alcanzar la diferencia ( $p = 0.056$ ), sugiriendo que la inyección de la dosis más elevada podría contribuir a eliminar la respuesta obtenida para esta variable por el efecto de la descarga eléctrica en el primer minuto de exploración vertical. Durante el resto de los minutos de evaluación no se encontraron diferencias entre los grupos experimentales (Fig.21).

Higiene: El ANOVA para esta variable arrojó un efecto principal significativo al analizar el factor grupo [ $F(5, 65) = 4,4680$ ,  $p < 0.05$ ]. El análisis post hoc de Duncan para evaluar este efecto mostró que los controles no condicionados-salina no difieren de ninguna condición experimental, si bien se acercan a la significancia estadística al compararse con los grupos condicionados que fueron tratados con solución salina ( $p = 0.07$ ) y que recibieron MK-801 en la dosis 0.2mg/Kg ( $p = 0.06$ ). Además, este grupo condicionado MK-801 0.2mg/Kg difiere significativamente de los sujetos pertenecientes a los grupos no condicionados, administrados tanto con MK-801 0.1 y 0.2mg/Kg (Fig.21).

Congelamiento: Al analizar el desempeño de tiempo de congelamiento para este ensayo, se obtuvo un efecto significativo del factor Grupo [ $F(5, 65) = 7,8604$ ,  $p < 0.05$ ], y una interacción significativa entre el factor Grupo x minuto de evaluación [ $F(20, 260) = 2,6289$ ,  $p < 0.05$ ]. Pruebas post hoc para esta variable demostraron, con respecto al tiempo total de ejecución de congelamiento, que los controles (administrados con cualquiera de los tratamientos farmacológicos) desempeñan significativamente menor tiempo de congelamiento que los sujetos condicionados que recibieron salina o la dosis de MK-801 de 0.1mg/kg. Por otra parte, se observó en este análisis que la inyección del inhibidor en la dosis más elevada, 0.2mg/kg, previa al condicionamiento con una descarga de 1.5mA, arroja resultados similares a los sujetos no condicionados y no difiere de ellos, pero sí de los condicionados tratados con solución salina o con MK-801

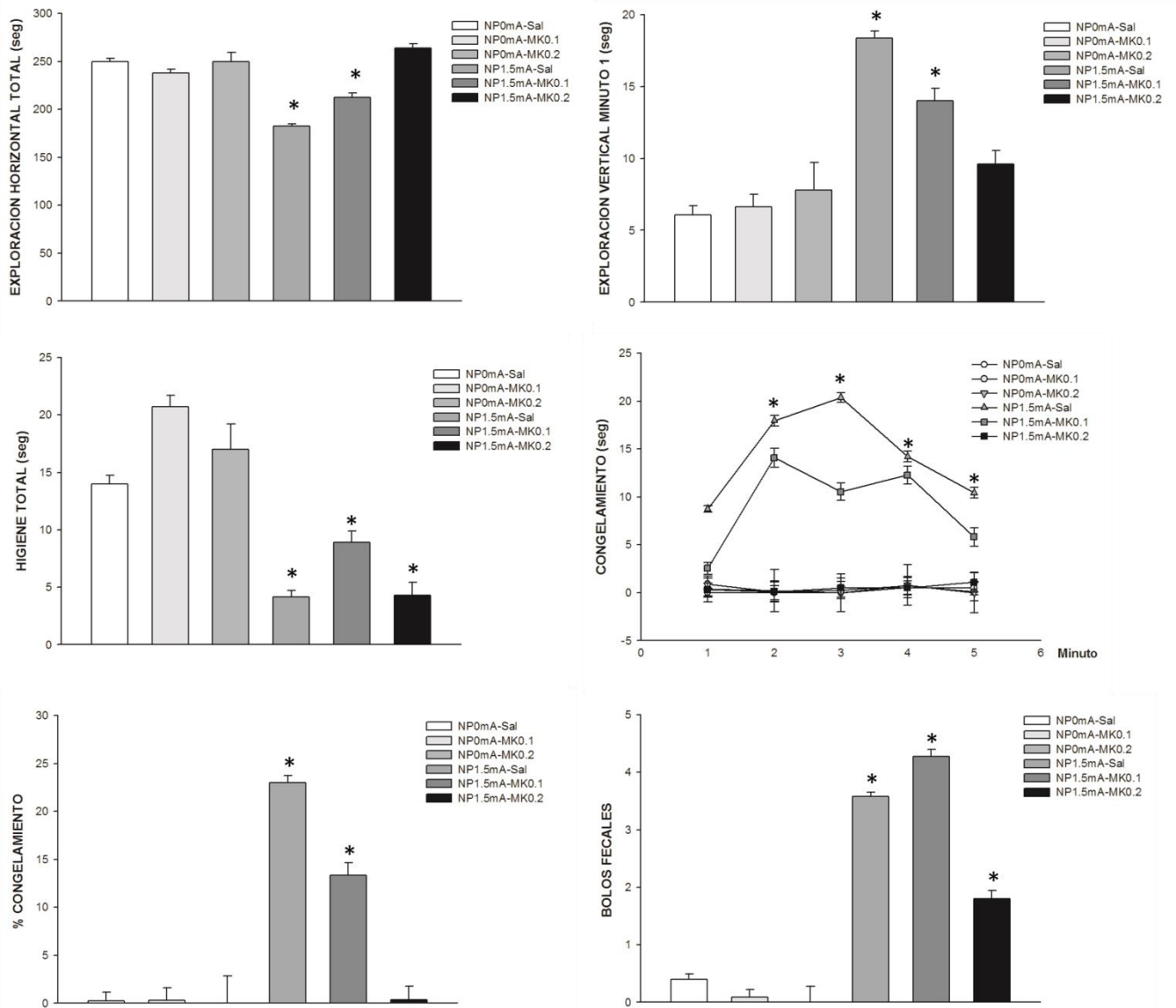
0.1mg/Kg. Es decir, revierte completamente el efecto observado de congelamiento por el tratamiento de condicionamiento. Con respecto al análisis temporal de esta variable, este efecto se observa en los minutos 2, 3, 4 y 5 [Todos los  $F(5,65) > 2,4595$ , todos los  $p < 0.05$ ] (Fig.21).

% de Congelamiento: El ANOVA para el análisis de esta variable, la cual se considera la variable mayormente analizada en los paradigmas de condicionamiento de miedo contextual, arroja un valor significativo para el factor grupo [ $F(5, 65) = 6,9967$ ,  $p < 0.05$ ]. Al profundizar en este efecto a través de las pruebas post hoc realizadas, encontramos que los sujetos condicionados con una descarga eléctrica de 1.5mA tratados tanto con solución salina como con el inhibidor farmacológico Mk-801 en la dosis de 0.1mg/Kg obtienen significativamente un mayor % de congelamiento que los sujetos controles con cualquiera de los tratamientos farmacológicos administrados y que los condicionados que recibieron la dosis de MK-801 de 0.2mg/Kg, la cual recuperó los niveles de congelamiento de los sujetos no condicionados (Fig.21).

Bolos fecales: El resultado que arrojó el análisis de esta variable otorgó un valor significativo que diferencia a los sujetos que recibieron una descarga eléctrica en la sesión de condicionamiento del FCPC, con respecto a los que no la recibieron, independientemente de haber recibido al inhibidor MK-801, en cualquiera de las dosis utilizadas, o solución salina [ $F(5, 65) = 21,127$ ,  $p < 0.05$ ] (Fig.21).

Del experimento 2c se obtuvieron los resultados representados en la lámina de la **Figura 21**. Se observa, en primer lugar, que la evaluación del etograma exhaustivo de sujetos de PN23 no pre-expuestos que reciben una descarga eléctrica inmediata, con respecto a sus controles que no la reciben, es similar que en los resultados obtenidos en el resto de los experimentos de la serie 2, para la mayoría de las variables analizadas. La única variable en la que no se observó, pero se se acercó a replicar, la diferencia entre estos grupos experimentales fue la variable de higiene ( $p = 0.07$ ). En segundo lugar, se obtuvo como resultado que la administración farmacológica de MK-801, tanto de 0.1 ó 0.2mg/Kg en los sujetos controles no condicionados, no altera el patrón conductual observado en este grupo experimental. En cambio, cuando los sujetos recibieron una descarga eléctrica de 1.5mA y se les administró el inhibidor, las conductas ejecutadas en respuesta a la descarga inmediata

se vieron modificadas en ciertas variables, siendo en algunos casos revertidas por completo con la dosis de 0.2mg/Kg (actividad horizontal, primer minuto de actividad vertical, congelamiento y % de congelamiento), mientras que otras variables, como los bolos fecales, demostraron efectos de condicionamiento independientes de la manipulación farmacológica (Fig.21).



**Fig.21: La inhibición de los NMDAr durante la descarga inmediata elimina las respuestas condicionadas en sujetos de PN23.** Efecto de la administración de MK-801 (0, 0.1 ó 0.2mg/kg) previo a la sesión de condicionamiento (0 ó 1.5mA) en sujetos de PN23, sin exposición previa al contexto. Actividad horizontal, 1° Minuto de Actividad Vertical, Higiene, Congelamiento, % de Congelamiento y Bolos fecales. Las barras verticales ilustran el error estándar de la media. \*p<0.05

### **5.3 Serie experimental 3: Evaluación de los cambios bioquímicos en la expresión de la subunidad NR2B y de su estado fosforilado activo, NR2BY1472, así como los de proteínas claves en la adquisición del aprendizaje contextual como PSD-95, cdk5 y su activador específico p35, y de la interacción entre las mismas, en el hipocampo dorsal de sujetos de PN23 y PN17, en respuesta a la exposición a un contexto novedoso.**

Esta serie experimental se realizó con el objetivo de correlacionar el aprendizaje contextual de ratas pre y post-destetadas con marcadores bioquímicos de la función de los NMDAr. El paradigma FCPC tiene la ventaja de separar el rol del HPC de otras estructuras involucradas en el aprendizaje contextual. Como ya se mencionó, este paradigma consta de 3 fases: pre-exposición, condicionamiento con descarga inmediata y evaluación. La explicación más aceptada del efecto del FCPC es que la representación configuracional del contexto se construye durante la fase de pre-exposición y depende de la función de los NMDAr. Por lo tanto, y luego de los resultados obtenidos en la serie experimental anterior, en esta serie nos preguntamos si es posible encontrar evidencias de actividad bioquímica, que involucre a estos receptores y a otras proteínas que interactúan con los mismos, en sujetos de las edades estudiadas en esta tesis, por la simple y mera exposición al contexto, simulando la fase de pre-exposición al contexto del FCPC.

En el experimento 3 evaluamos, en sinaptosomas de HPCd de sujetos de PN23 (Experimento 3a) y en crías pre-destetadas de PN17 (Experimento 3b) como primer abordaje, la expresión de la subunidad NR2B y la dinámica temporal de la misma, y del estado fosforilado de esta subunidad en el sitio específico Y1472, que está directamente involucrada, como se desarrolló en la introducción, con la inducción de plasticidad sináptica estructural dependiente de NMDA, en respuesta a la experiencia. Además, algunas de las proteínas reguladoras de la actividad de la subunidad NR2B, tales como PSD-95 y el complejo Cdk5/p35, se estudiarán en esta sección. La intención es graficar una curva de expresión temporal desde la finalización de la pre-exposición hasta los 70min aproximadamente. Luego del análisis de la expresión de estas proteínas se analiza en esta serie la interacción entre algunas de ellas (PSD-95 y Cdk5,

específicamente) a través de un ensayo de inmunoprecipitación (Experimento 3c), para así profundizar y probar la hipótesis de interacción entre los actores propuestos en la tesis (Cdk5 y NR2B, indirectamente a través de PSD-95), lo que se realizó en una sola de las edades (PN23) en un tiempo específico posterior a la preexposición (a los 40 minutos, debido a los resultados obtenidos en los experimentos 3a y 3b).

#### *Experimento 3a – PN23*

La **Figura 22** (compuesta por las figuras **22a** y **22b**) refleja los resultados encontrados en la expresión de las proteínas evaluadas (en la Fig.22a: NR2B y NR2BY; y en la 22b: PSD-95, Cdk5 y p35) en sinaptosomas de HPCd de sujetos de PN23.

El ANOVA realizado para evaluar la expresión de **NR2B** (subunidad total) en fracciones sinaptosomales de HPCd de sujetos de PN23, no mostró diferencias significativas entre animales pre-expuestos al contexto de condicionamiento y no pre-expuestos, en ningún punto de la curva temporal. De manera interesante, encontramos al estudiar a la subunidad activada por la fosforilación en el sitio Y1472 (**NR2BY1472**), una curva de expresión que se hace significativa en ciertos minutos de la misma con respecto a los controles no pre-expuestos [ $F(8, 25)=5,6789$ ,  $p<0.05$ ], estos son a los 40 y 50 minutos posteriores a la exposición al contexto novedoso, tal como se observa en la Figura 22a.

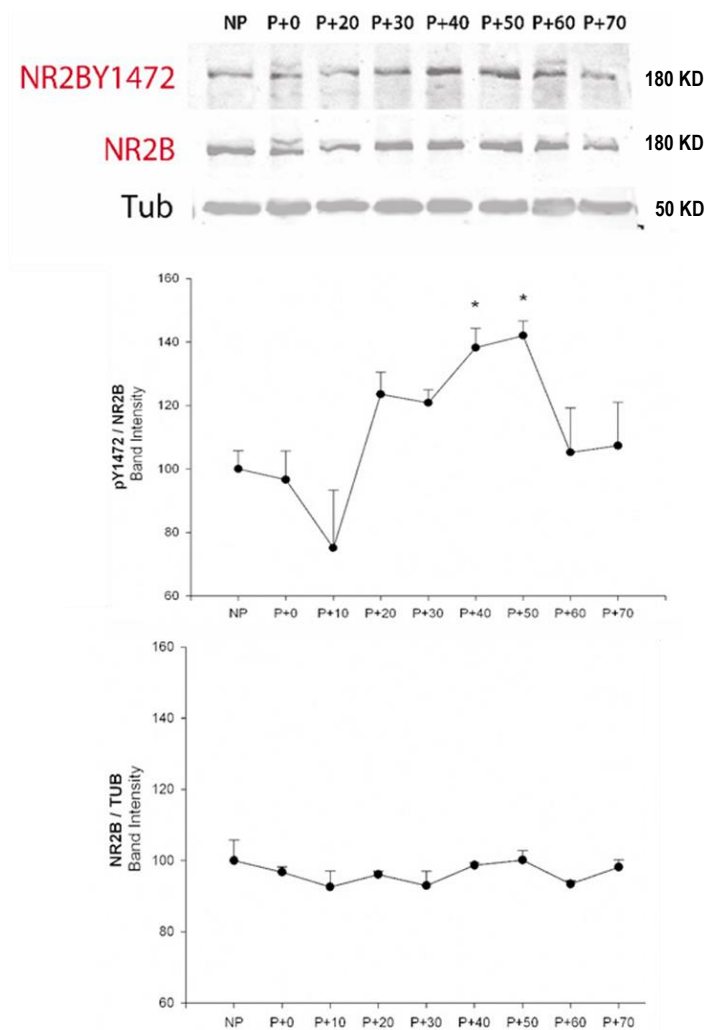


Fig.22a: **NR2BY1472** aumenta sus niveles de expresión luego de la pre-exposición a un contexto novedoso en sujetos de PN23. Curva temporal de los niveles de expresión de NR2B y NR2BY1472 en fracciones sinaptosomales de HPCd de sujetos de PN23, No Pre-expuestos al contexto (NP) y pre-expuestos (P), obtenidos a diferentes tiempos posteriores a la pre-exposición. La figura muestra el análisis de Western Blot que se encuentra cuantificado en las subfiguras siguientes para NR2B/Tub y para NR2BY/NR2B. Se observa un marcado incremento de los niveles de NR2BY1472/NR2B a los 40 y 50 min. posteriores a la pre-exposición. Las barras verticales ilustran el error estándar de la media. \* $p < 0,05$

Por otra parte, los niveles de expresión de Cdk5, p35 y PSD95 no mostraron un patrón temporal diferencial en ninguno de los puntos, sugiriendo que la expresión total en sinaptosomas de HPCd de estas proteínas, es similar en sujetos No pre-expuestos y pre-expuestos, y que esta similitud se mantiene en el tiempo (hasta los 70min). Los datos se resumen en la Figura 22b.



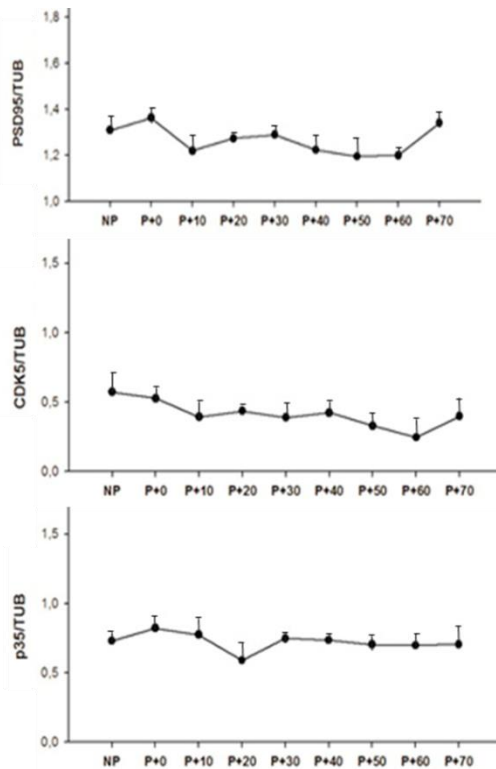


Fig.22b: La expresión de proteínas relacionadas a plasticidad sináptica, PSD-95, Cdk5 y p35, no se ve modificada por la pre-exposición a un contexto novedoso en sujetos de PN23. Curva temporal de los niveles de expresión de PSD-95, Cdk5 y p35 en fracciones sinaptosomales de HPCd de sujetos de PN23, No Pre-expuestos al contexto (NP) y pre-expuestos (P), obtenidos a diferentes tiempos posteriores a la pre-exposición. No se observan diferencias en la expresión temporal de ninguna de estas proteínas, ni se observan modificaciones en la expresión de las mismas en respuesta al tratamiento de pre-exposición. Las barras verticales ilustran el error estándar de la media. \* $p < 0.05$

### Experimento 3b – PN17

La Figura 23 (compuesta por 23a y 23b) refleja los resultados encontrados en la expresión de las proteínas evaluadas en sinaptosomas de HPCd de sujetos de PN17.

El ANOVA para evaluar la expresión temporal de las proteínas de interés de sujetos de PN17 no reflejó efectos principales en la expresión de NR2B/TUB. Al igual que lo observado en los sujetos PN23, la expresión de la subunidad fosforilada con respecto al total, demostró una curva temporal de activación que fue significativa con respecto a los controles en los minutos 20 y 40 posteriores a la pre-exposición [ $F(4, 22) = 2.8362$ ,  $p < 0.05$ ], estos resultados se resumen en la Figura 23a.

Nuevamente, a esta edad, no se observaron diferencias en la expresión temporal en sinaptosomas de HPCd de cdk5, p35 ni PSD-95. Los resultados se observan en la Figura 23b.

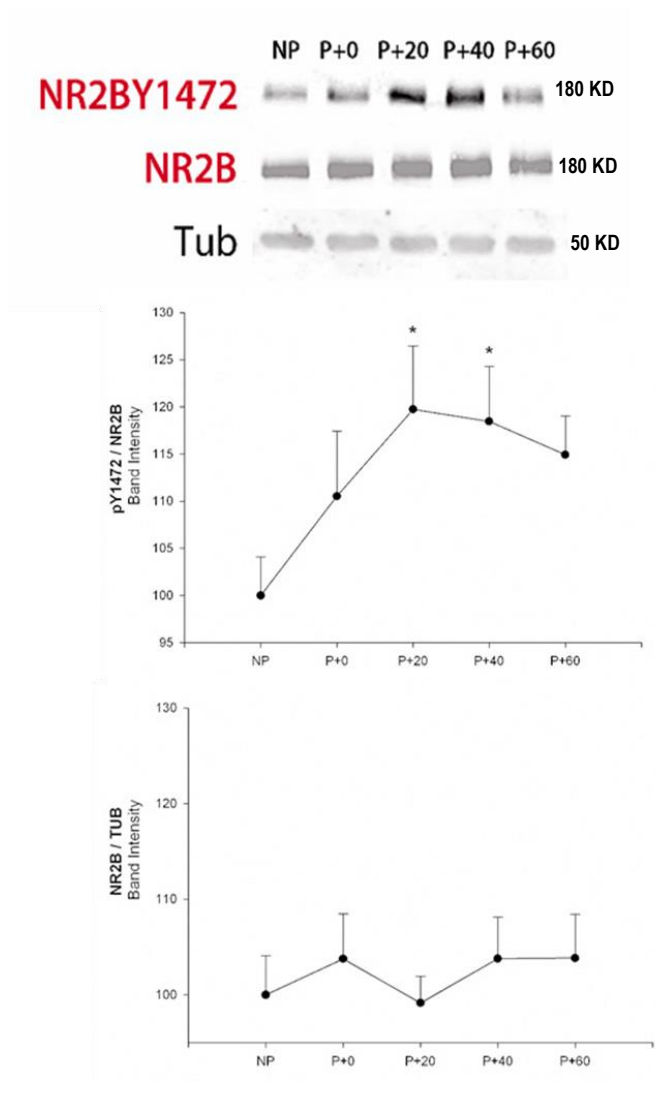


Fig.23a: **Aumento de la expresión de NR2BY1472 luego de la pre-exposición en un contexto novedoso en sujetos de PN17.** Curva temporal de los niveles de expresión de NR2B y NR2BY1472 en fracciones sinaptosomales de HPCd de sujetos de PN17, No Pre-expuestos al contexto (NP) y pre-expuestos (P), obtenidos a diferentes tiempos posteriores a la pre-exposición. La figura muestra el análisis de Western Blot que se encuentra cuantificado en las subfiguras siguientes para NR2B/Tub y para NR2BY/NR2B. Se observa un marcado incremento de los niveles de NR2BY1472/NR2B a los 20 y 40min. posteriores a la pre-exposición. Las barras verticales ilustran el error estándar de la media. \* $p < 0,05$

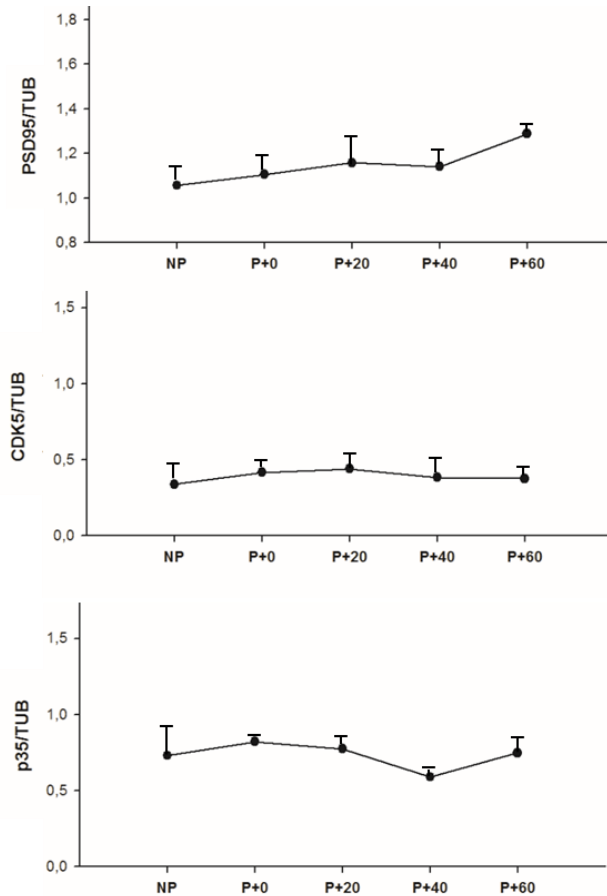


Fig.23b: La expresión de proteínas relacionadas a plasticidad sináptica, PSD-95, Cdk5 y p35, no se ve modificada por la pre-exposición a un contexto novedoso en sujetos de PN17. Curva temporal de los niveles de expresión de PSD-95, Cdk5 y p35 en fracciones sinaptosomales de HPCd de sujetos de PN17, No Pre-expuestos al contexto (NP) y pre-expuestos (P), obtenidos a diferentes tiempos posteriores a la pre-exposición. No se observan diferencias en la expresión temporal de ninguna de estas proteínas, ni se observan modificaciones en la expresión de las mismas en respuesta al tratamiento de pre-exposición. Las barras verticales ilustran el error estándar de la media. \* $p < 0.05$

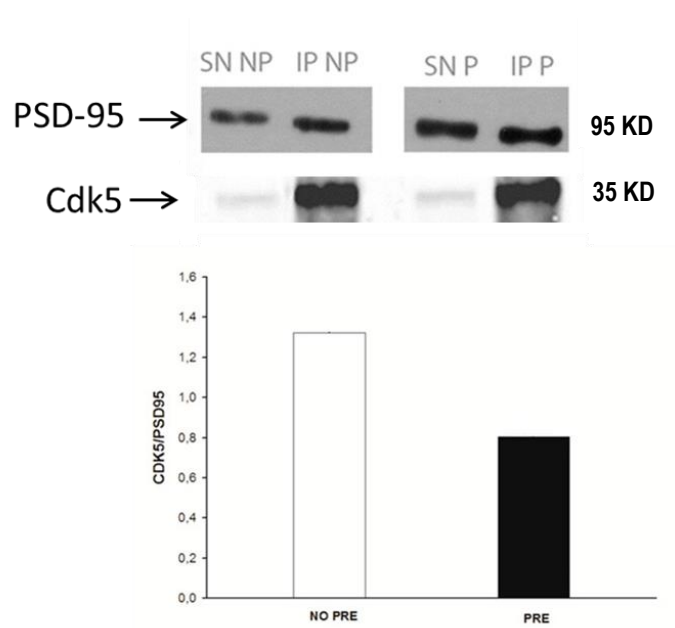
En resumen, la serie experimental número 3, en sus subsecciones a y b revelaron, tanto en PN23 (3a) como PN17 (3b), una actividad dinámica del estado fosforilado de NR2B (NR2BY1472), el cual se ha relacionado funcionalmente con la localización subcelular de los NMDAR, y de esta manera, con su disponibilidad para la sinapsis. Los datos obtenidos en esta serie mostraron un aumento en la expresión del estado fosforilado de la subunidad NR2B (y no de la expresión total de la subunidad), posterior al tratamiento de pre-exposición en un contexto novedoso, observado en comparación a los niveles de expresión en los controles no pre-expuestos. De manera interesante, esta curva de expresión temporal se detectó en ambas edades, a los PN23 y a los PN17, mostrando un patrón de curva en respuesta a la adquisición de información contextual (Figs.22 y 23).

### *Experimento 3c – PN23: Inmunoprecipitación de PSD-95*

Teniendo en cuenta los resultados previos en los cuales mostramos un aumento significativo en la expresión del estado fosforilado de la subunidad NR2B a los 40 y 50 minutos posterior al tratamiento de pre-exposición en un contexto novedoso en comparación a los niveles de expresión en los controles no pre-expuestos, abordamos el estudio de la interacción entre PSD-95 y la proteína Cdk5. El objetivo de este análisis fue evaluar si hay una alteración en la interacción entre estas proteínas durante la adquisición de aprendizaje contextual, y de este modo contribuir con más evidencias a la hipótesis sostenida por diversos autores que indica que la proteína Cdk5 regula de manera negativa a esta función (Hawasli et al., 2007; Bianchetta et al., 2012), mediante la interacción con PSD-95 en el dominio de esta proteína de anclaje, que es a su vez el sitio de unión a NR2BY1472 con el cual compite, y que esta subunidad requiere para su inserción en la membrana sináptica durante el aprendizaje (Morabito et al., 2004; Zhang et al., 2008a).

Para ello, se evaluaron los niveles de expresión de Cdk5 que co-inmunoprecipitaron con PSD-95 en sinaptosomas de HPCd de sujetos de PN23 luego de 40 minutos de preexposición a un contexto novedoso, uno de los tiempos en el que se encontró un aumento significativo en la expresión de NR2B fosforilado en el sitio Y1472 (experimento 3a). Consideramos este experimento como un piloto debido a que se utilizaron sólo 3 sujetos para cada condición, realizando un pool, debido a la imposibilidad de realizarlo de manera individual por la poca cantidad de muestra que se obtiene a partir del fraccionamiento de sinaptosomas, y, además, sólo se utilizó el tercio superior del HPC que corresponde a un segmento enriquecido en HPCd.

En primer lugar, se ensayó la eficiencia del anticuerpo para inmunoprecipitar PSD-95. En la figura 24 se observa la presencia de PSD-95 tanto en el sobrenadante del inmunoprecipitado (SN) y en el inmunoprecipitado propiamente dicho (IP), confirmando la eficiencia del anticuerpo.



**Fig.24: Asociación entre CDk5 y la proteína de anclaje PSD-95 en respuesta a la pre-exposición a un contexto novedoso.** Ensayo de inmunoprecipitación (IP) de PSD-95 de sinaptosomas de HPCd realizado en sujetos de PN23, No Pre-expuestos al contexto (NP) y Pre-expuestos (P), a los 40min posteriores a la pre-exposición. Se observan las bandas de las fracciones correspondientes al sobrenadante (SN) del IP y al IP propiamente dicho. La evaluación de la expresión de Cdk5 en relación a PSD-95 en el IP fue mayor en sujetos NP que en P, lo cual se encuentra cuantificado en la figura. No se observan barras correspondientes al error estándar de la media debido a que se realizó este ensayo con un pool de sinaptosomas de 3 sujetos de cada condición.

Posteriormente, se analizó la presencia de la proteína Cdk5 en el IP, lo cual indica que co-inmunoprecipita con PSD-95 en ambas condiciones experimentales. A partir de este hecho, se cuantificaron los niveles de expresión de Cdk5 en relación a los de PSD-95 inmunoprecipitada, a través de la relación Cdk5/PSD-95 en ambos grupos experimentales. Este análisis nos mostró que los sujetos que no fueron preexpuestos al contexto novedoso (NP) presentaron mayores niveles de Cdk5 asociada a PSD-95 que aquellos que fueron pre-expuestos al contexto (P). Esta primera aproximación nos estaría indicando que podría existir una relación inversa, entre Cdk5 y NR2B, a través de PSD-95, en el proceso de adquisición de aprendizaje contextual, con respecto a su participación y contribución, mediante su localización subcelular, lo cual fue propuesto como hipótesis de esta tesis.

Sin embargo, y debido a que este abordaje es preliminar, es necesaria la realización de experimentos que apunten a dilucidar esta interacción, así como también completar el número de réplicas de esta serie para fortalecer los resultados. Los hallazgos preliminares se encuentran representados en la Figura 24.

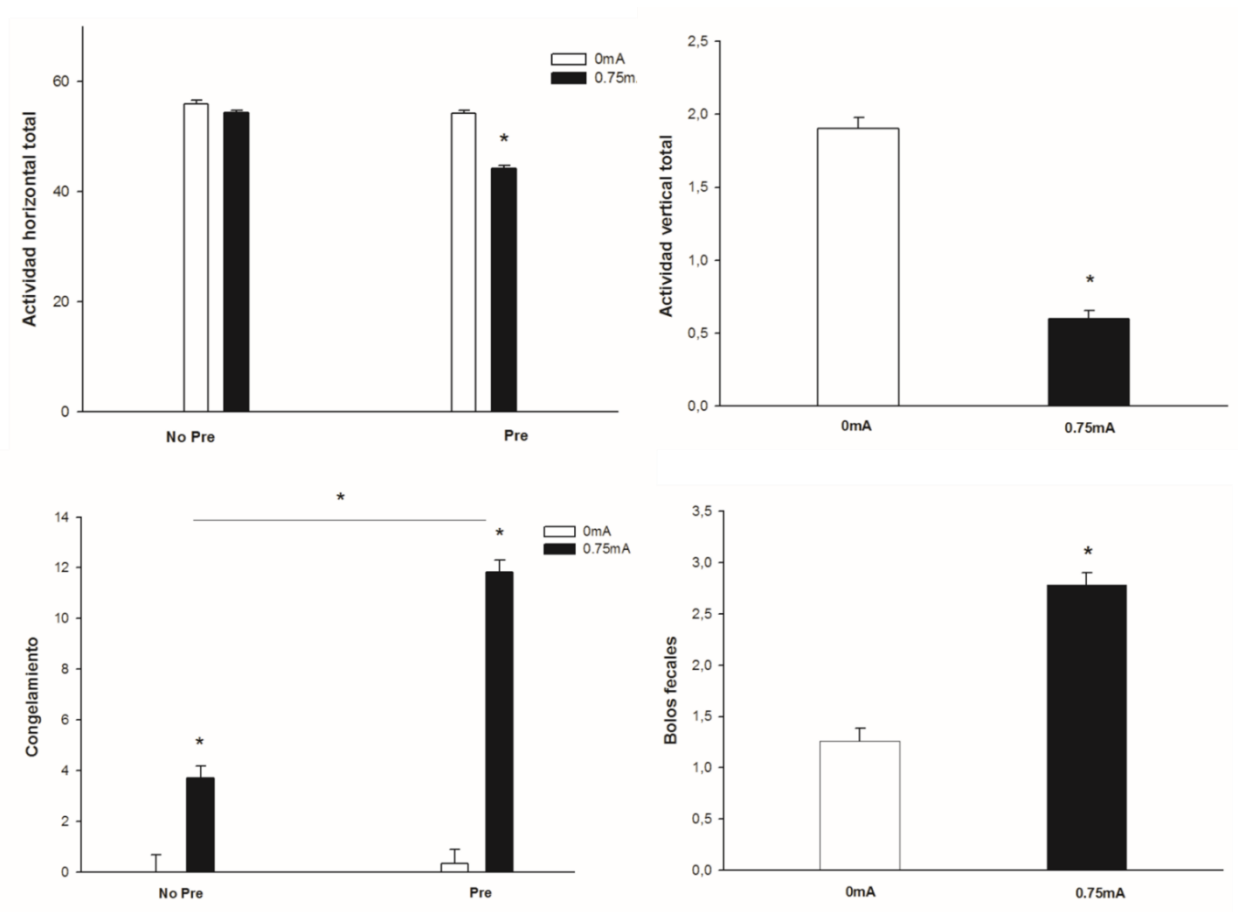
#### ***5.4 Serie experimental 4: Evaluación del número y tipo de espinas dendríticas en el hipocampo dorsal, de ratones entrenados en el paradigma FCPC.***

##### *Experimento 4a – FCPC en ratones Thy1-GFP*

En primer lugar, se entrenaron ratones macho de la cepa Thy1-GFP en el paradigma FCPC con el fin de replicar los resultados encontrados en la serie experimental 1, agregando en el diseño experimental las mismas variables dependientes analizadas, y los grupos controles correspondientes. Los ratones utilizados tuvieron entre PN30-35 al comienzo del experimento, los mismos fueron previamente genotipificados para, al finalizar la evaluación en el FCPC, ser sacrificados para el análisis estructural de la densidad y morfología de las espinas dendríticas. Los procedimientos de esta serie experimental están descritos en la sección 4. Brevemente, el paradigma FCPC se realizó siguiendo el procedimiento generalmente realizado en ratones, descrito en diversas fuentes de literatura (Brown et. al, 2011), en donde se realiza una fase de pre-exposición (Fase 1), de libre exploración en el contexto de entrenamiento durante 5 minutos, para el grupo correspondiente (sujetos pre-expuestos), seguido a las 24 hs de una sesión de condicionamiento (Fase 2) en donde a los sujetos de condiciones pre- y no pre-expuestos se les otorgó una descarga eléctrica inmediata de 0mA o 0.75mA (la cuál equivale en ratones a la descarga más elevada utilizada en ratas de 1.5mA, y fue tomada de la literatura) y, en una tercera etapa a las 24hs posteriores al condicionamiento, se evaluaron los animales individualmente durante 5 minutos en la caja de condicionamiento. Inmediatamente después de la sesión de evaluación, los ratones fueron anestesiados e inmediatamente perfundidos y sus cerebros fijados para obtener los cortes para el análisis de las imágenes de las que se obtuvieron los resultados de la densidad y morfología de

espinas dendríticas en el HPCd de sujetos de las cuatro condiciones (No pre-expuestos-0mA, No pre-expuestos-0.75mA, Pre-expuestos-0mA y Pre-expuestos-0.75mA), y se agregó una condición Naive (sin ningún tratamiento) para conocer el estado basal de la densidad y morfología de espinas dendríticas.

En la lámina correspondiente a la Figura 25, se observan los resultados principales arrojados del procedimiento del FCPC en ratones.



**Fig.25: Ratones Thy1-GFP expresan evidencias de aprendizaje de contexto a través de múltiples variables, al ser entrenados en el paradigma FCPC.** Etograma de ratones Thy1-GFP en el FCPC. Se observan en la figura los principales efectos obtenidos, la disminución en la actividad horizontal en los sujetos pre-expuestos-condicionados, el efecto de condicionamiento para las variables actividad vertical (seg) y Bolos fecales y el conocido efecto de facilitación que se observó para la variable congelamiento, en función de los tratamientos de pre-exposición (No pre-expuestos o pre-expuestos) y el condicionamiento (0 ó 0.75mA). Las barras verticales ilustran el error estándar de la media. \*p<0.05.

Actividad horizontal: El ANOVA para esta variable reflejó un efecto principal de *pre-exposición* [ $F(1, 21)=19,457, p<0.05$ ], un efecto principal de *condicionamiento* [ $F(1, 21)=18,927, p<0.05$ ] y una *doble interacción* entre los factores pre-exposición y condicionamiento [ $F(1, 21)=9,5462, p<0.05$ ]. El análisis post-hoc para esta variable reflejó que los sujetos que corresponden a la condición pre-expuestos y condicionados son los que muestran la menor actividad para esta variable (Fig.25).

Actividad vertical: En esta variable, el análisis correspondiente reflejó un efecto principal de *condicionamiento* [ $F(1, 21)=16,209, p<0.05$ ], que indicó una menor actividad en los sujetos condicionados, independientemente del tratamiento de pre-exposición recibido (Fig.25).

Higiene: Para esta variable no se detectaron efectos significativos en el análisis realizado.

Congelamiento: El ANOVA para el tiempo de congelamiento reflejó un efecto de *pre-exposición*, un efecto principal de *condicionamiento* y una *doble interacción* entre ambos factores (pre-exposición x condicionamiento) también significativa [ $F(1, 21)=9,9221, p<0.05$ ;  $F(1, 21)=32,164, p<0.05$  y  $F(1, 21)=8,4179, p<0.05$ , respectivamente]. Pruebas post hoc de Duncan, para indagar acerca de donde residen estas diferencias significativas, detectaron que los sujetos correspondientes a la condición pre-expuestos condicionados, son los que realizan significativamente mayor tiempo de congelamiento total en este modelo, reflejando el conocido efecto de facilitación que caracteriza al paradigma FCPC (Fig.25).

% de Congelamiento: El análisis de la variable % de congelamiento, al igual que el tiempo de congelamiento del ítem anterior, arrojó un efecto principal de *pre-exposición* [ $F(1, 21)=12,420, p<0.05$ ], de *condicionamiento* [ $F(1, 21)=36,144, p<0.05$ ] y la *interacción* entre ambos factores [ $F(1, 21)=12,420, p<0.05$ ], que, al analizar mediante pruebas post hoc, determinaron que la mayor actividad para esta variable, la realizan los sujetos pre-expuestos condicionados (Fig.25).

Bolos fecales: El ANOVA correspondiente demostró, al igual que en las series experimentales anteriores, un efecto de condicionamiento que indica que la defecación es significativamente mayor en animales que recibieron una descarga



eléctrica, en comparación con los controles no condicionados, lo cual se evaluó mediante pruebas post hoc a partir del efecto principal hallado [ $F(1, 23)=6,1392$ ,  $p<0.05$ ] (Fig.25).

En resumen, este experimento reflejó el conocido efecto de facilitación característico del paradigma FCPC, en donde los sujetos pre-expuestos condicionados realizan mayor % de congelamiento, y tiempo de congelamiento total, que el resto de las condiciones. Así mismo, la variable exploración horizontal reflejó este efecto, ya que el grupo experimental que muestra la facilitación es el que ejecuta menor tiempo en esta variable, debido a que los animales están comprometidos en la conducta de inmovilización. La defecación es en este modelo, al igual que en los modelos anteriores, la variable más sensible que responde al condicionamiento, independientemente del tratamiento de pre-exposición de los sujetos. Por otro lado, la conducta de higiene no reflejó respuesta significativa entre los grupos en este análisis. Es importante destacar que los ratones presentan mayor hiperactividad que las ratas, por lo que esta variable es difícil de detectar en este modelo, creemos que si la evaluación hubiese sido de mayor tiempo, quizás comenzaban los sujetos a desempeñar esta tarea, tal como ocurrió en la serie experimental 1 en los sujetos de PN17 (Fig.25).

#### *Experimento 4b – Análisis de la densidad y morfología de espinas dendríticas de neuronas piramidales de CA1 en el HPCd de ratones Thy1-GFP*

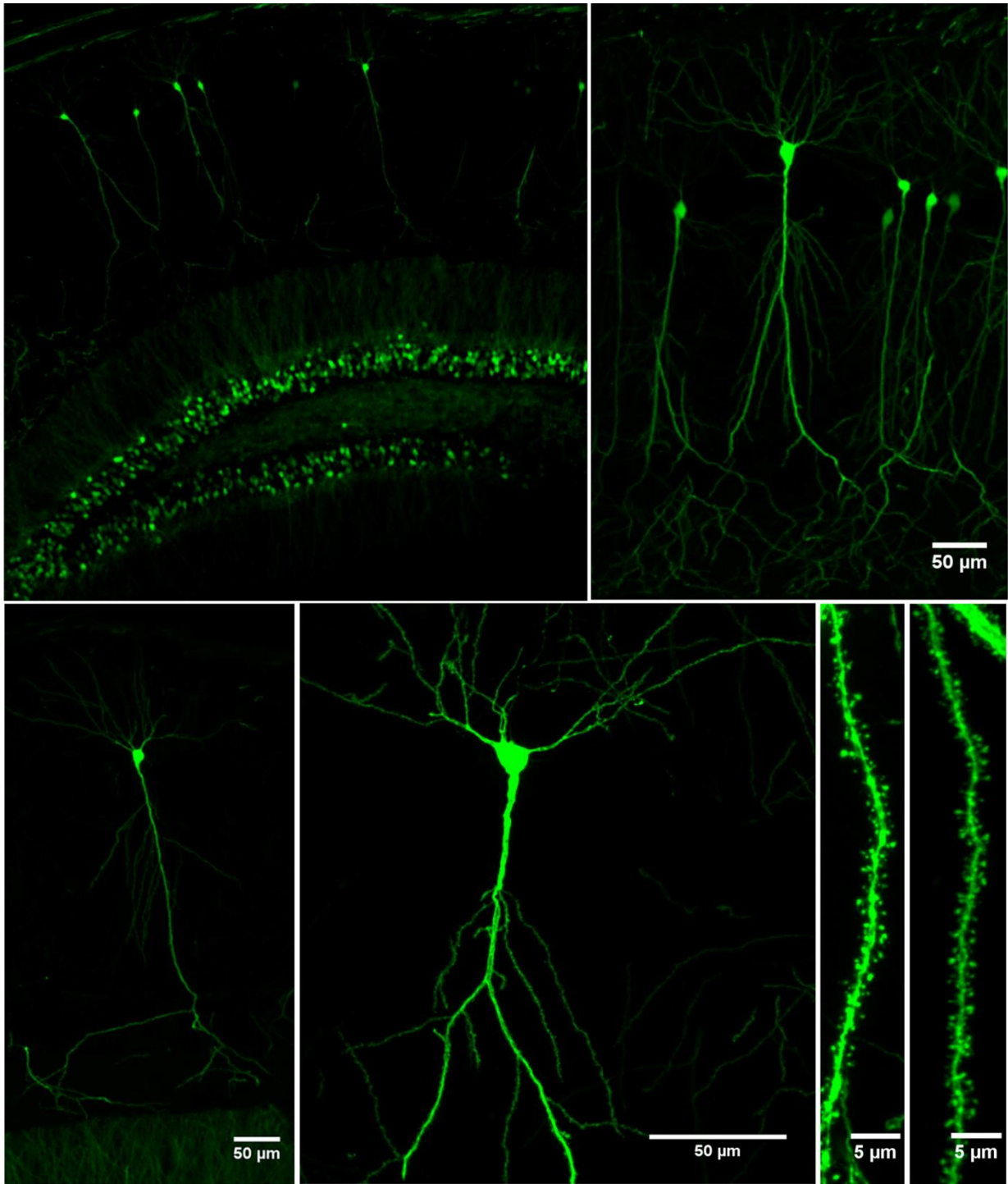
El objetivo del experimento 4.2 fue evaluar la densidad y morfología de las espinas dendríticas de ratones que fueron entrenados en el FCPC, siendo las espinas el sitio donde reside la plasticidad estructural del aprendizaje contextual, mediada por la acción de los NMDAr, que son los actores que se analizan en este trabajo de tesis.

En los procedimientos (sección 4) se describieron las metodologías empleadas en el desarrollo de este experimento, en donde se analizaron tanto la densidad como la morfología de las espinas dendríticas de neuronas piramidales de HPCd pertenecientes a ratones sometidos al entrenamiento FCPC y cuyos resultados se reflejaron en el experimento 4.1 en el ítem anterior. Tanto la densidad como la

morfología de las espinas dendríticas fueron cuantificadas en imágenes de microscopía confocal adquiridas a partir de cortes de HPCd. Las imágenes se tomaron de las dendritas apicales terciarias o cuaternarias, seleccionando tres segmentos por neurona de al menos 100µm, de 3 neuronas piramidales por ratón, cada una seleccionada de un corte de HPCd diferente. Se analizaron por grupo experimental las neuronas piramidales de 3 sujetos. Las imágenes fueron procesadas y deconvolucionadas utilizando el Software AutoQuant, y luego utilizando el software NeuroStudio se obtuvieron los conteos automáticos de la densidad y morfología de espinas de cada imagen.

La figura 26a está compuesta por una lámina que refleja las imágenes obtenidas de los ratones Thy1-GFP, mientras que la lámina de la Figura 26b refleja los principales resultados del análisis estadístico de la densidad y morfología de espinas dendríticas de los sujetos pertenecientes a los grupos experimentales evaluados en el FCPC: no pre-expuestos – no condicionados, no pre-expuestos – condicionados, pre-expuestos – no condicionados y pre-expuestos – condicionados, y se agregó para el análisis de las espinas dendríticas al grupo Naive (sin ninguna manipulación).

a. Densidad de espinas dendríticas: El ANOVA para el análisis de la variable densidad de espinas dendríticas/10µm se representa en la Figura 26b, y arrojó un resultado significativo para el factor principal *pre-exposición* [ $F(4, 36)=2,8293, p<0.05$ ], en donde, a través de pruebas post hoc de Duncan, muestra que los sujetos que tuvieron experiencia previa en el contexto de condicionamiento presentan un número significativamente mayor de espinas dendríticas por segmento de 10µm, que el resto de las condiciones (no pre-expuestos) y que este aumento es independiente del tratamiento de condicionamiento que recibieron los sujetos (Fig26b).



**Fig.26a: Neuronas piramidales de CA1 de HPCd de ratones Thy1-GFP.** Se observa en esta lámina a las imágenes tomadas por microscopía confocal para la cuantificación y posterior análisis de la densidad y morfología dendríticas. Se observa un corte en donde se representa el área CA1 de donde se seleccionaron las neuronas piramidales representadas en la lámina, y un segmento de una dendrita terciaria-cuaternaria de donde se realiza el análisis de la densidad y morfología de espinas.

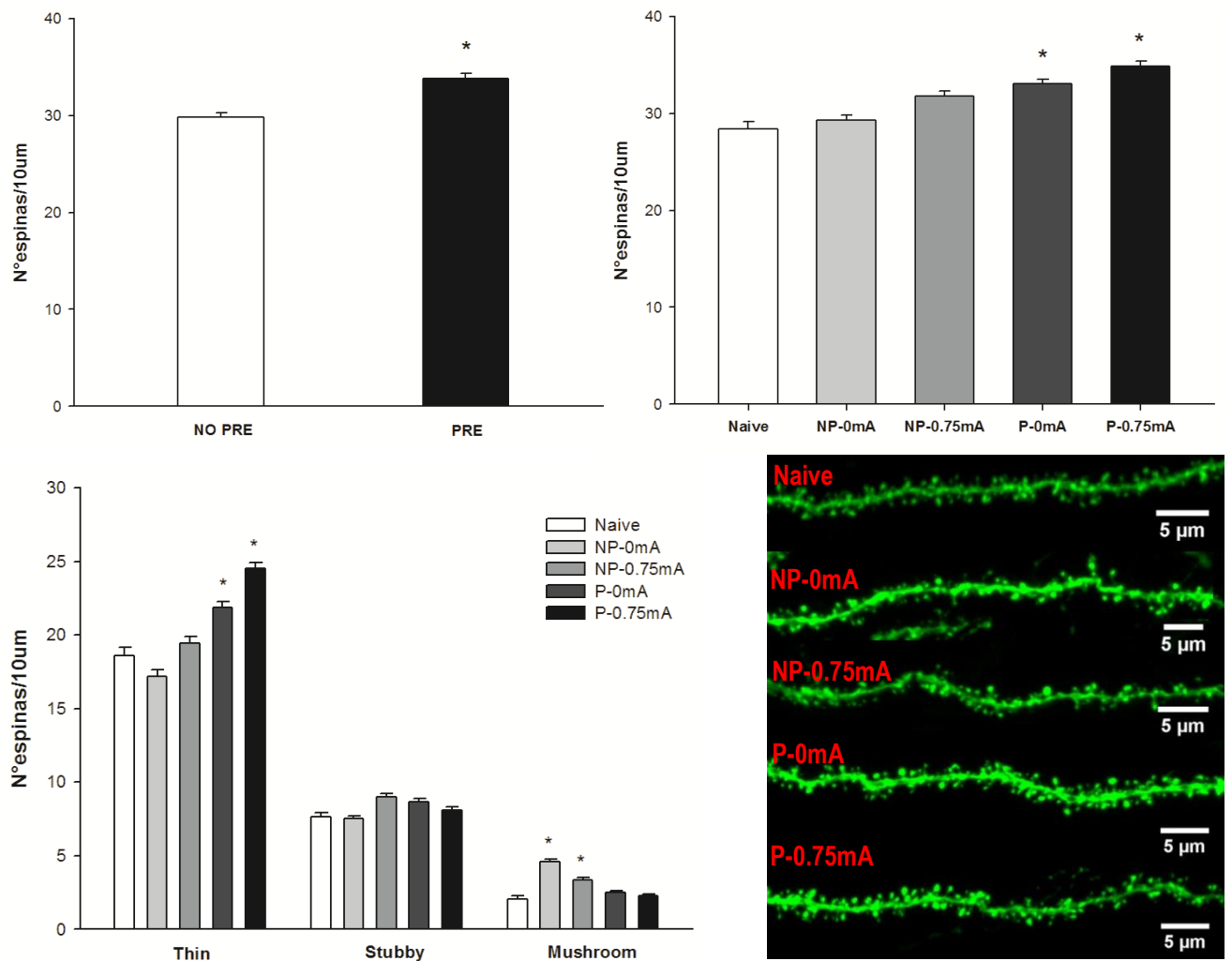


Fig.26b: El entrenamiento en el paradigma FCPC produce un aumento en la densidad de espinas dendríticas del tipo filopódicas en respuesta al tratamiento de pre-exposición en ratones Thy1-GFP postdestetados. Densidad y morfología de espinas dendríticas de CA1 de neuronas piramidales de HPCd en respuesta al entrenamiento en el FCPC de ratones Thy1-GFP de PN23. Los sujetos pertenecientes a los grupos que fueron pre-expuestos al contexto en la fase 1 del FCPC mostraron una mayor densidad de espinas con respecto a los no pre-expuestos y a los sujetos del grupo naive. La morfología de las espinas en los sujetos pre-expuestos arrojó una diferencia significativamente mayor de espinas del tipo “thin”, y una menor cantidad de espinas del tipo “mushroom” en el análisis correspondiente. Las barras verticales ilustran el error estándar de la media. \* $p < 0.05$ .

#### b. Morfología de espinas dendríticas:

**Espinas “thin”:** El ANOVA para evaluar la morfología de las espinas dendríticas arrojó un efecto de *pre-exposición* [ $F(4, 36) = 5,6034$ ,  $p < 0.05$ ] para la densidad de espinas de este tipo, que se observa a la vez, en los grupos pre-expuestos en donde esta variedad es mayor.

**Espinas “stubby”:** No se encontraron diferencias significativas en la densidad de este tipo de espinas entre los grupos experimentales de las distintas condiciones.

**Espinas “mushroom”:** El ANOVA reflejó un nuevo efecto de pre-exposición para el análisis de la densidad de espinas con esta morfología, representando una menor cantidad de espinas “mushroom” en los sujetos pre-expuestos [ $F(4, 36)=5,7655$ ,  $p<0.05$ ].

Resumiendo los resultados de este análisis, podemos decir que la densidad y la morfología de las espinas dendríticas se vieron afectadas por la pre-exposición al contexto de condicionamiento en el paradigma FCPC. La exposición a un contexto novedoso desencadena los mecanismos de adquisición de aprendizaje contextual, que, como sugieren los resultados de la serie experimental 2, están mediados por los NMDAR; y a su vez, tal como obtuvimos en la serie experimental 3, la dinámica de estos receptores involucra cambios en respuesta a sesiones de pre-exposición a contextos novedosos. En esta serie 4, se detectaron evidencias de que este aprendizaje contextual está acompañado de un aumento en la densidad de espinas dendríticas.

Con respecto a la morfología de las espinas dendríticas analizadas, si bien las diferencias observadas son sutiles, podemos sugerir a partir de nuestros resultados que las nuevas espinas que se generaron por efecto de pre-exposición en el FCPC corresponderían a espinas dinámicas del tipo “thin”. Por otra parte, se considera que las espinas del tipo “mushroom” son las menos dinámicas, ya que en ellas se sustenta el aprendizaje a largo plazo (Matsuzaki et al., 2001). Las espinas de esta morfología son las menos frecuentes de encontrar, por lo que creemos que, si bien el resultado del análisis de las mismas arroja una disminución por el tratamiento de pre-exposición, la estrategia de cuantificación de las mismas partiendo de segmentos cortos de análisis podría interferir con la tendencia encontrada (Fig.26b).

# 6

## Discusión

La presente tesis fue pensada con el objetivo general de realizar un abordaje amplio y abarcativo del estudio de los diversos actores que participan, a diferentes escalas, en el proceso de *adquisición del aprendizaje acerca del contexto durante el desarrollo*.

La idea principal de este proyecto fue la de encontrar un modelo o paradigma comportamental adecuado y sensible a nuestro objeto de estudio, que nos permitiese trazar un eje a lo largo de dos edades, de las que se reportan evidencias que una de ellas, la inferior, es incapaz de adquirir información acerca del contexto, y otra en la que esa capacidad se encuentra desarrollada; siendo este paradigma idóneo en reflejar respuestas de las que pudiésemos partir para profundizar en el fenómeno a *niveles orgánicos*. El estudio de la ontogenia del aprendizaje contextual no se encuentra del todo desarrollado ya que se asume mayoritariamente, a partir de evidencias en modelos animales, que tal aprendizaje no está disponible en la infancia. De este modo, a través del paradigma FCPC y de las ventajas que el mismo ofrece, pudimos intervenir metodológicamente sobre diversos parámetros, teniendo en cuenta el punto de vista del modelo ecológico, y llegar a concluir algunos puntos importantes. Los mismos, ya relevantes *per se*, nos permitieron, a su vez, ahondar en los mecanismos más generales que están involucrados en el aprendizaje, como son la acción y funcionalidad

de los sistemas que lo subyacen. Así, tanto la implicancia de los NMDAr, la dinámica de subunidades específicas de los mismos en el HPCd durante las sesiones sensibles a la adquisición del aprendizaje de contexto, la correlación de la expresión de estos receptores con proteínas reguladoras de los mecanismos implicados, y el análisis final de la expresión de eventos de plasticidad sináptica estructural en respuesta a este aprendizaje, fueron algunos de los puntos de los que pudimos aportar nueva información, contribuyendo al campo general de la Psiconeurobiología del Desarrollo.

El estudio de la neurociencia que involucra al *aprendizaje asociativo* agrupa a tres preguntas generales, planteadas en distintos niveles de sistemas, comenzando por la primera acerca de ¿qué, cuáles, y/o de qué manera los circuitos cerebrales median la asociación entre los estímulos ambientales y el comportamiento adquirido?, y, en segundo lugar, en esos circuitos ¿qué sinapsis deben atravesar modificaciones para que ocurra el aprendizaje?, siendo la tercera pregunta la que profundiza acerca de ¿qué eventos intracelulares ocurren en esos sitios de plasticidad, que les confieren la eficacia sináptica que subyace a la formación de nuevos aprendizajes?. La utilización de paradigmas del tipo de condicionamiento Pavloviano, en donde las relaciones dependientes entre dos estímulos resultan en reacciones alteradas por el desencadenamiento de alguno de esos estímulos, han sido ampliamente utilizadas para indagar acerca de las preguntas que se plantearon anteriormente. De este modo, uno de los hallazgos principales es que el **EI** y el tipo de respuesta obtenida, determinarán qué circuitos nerviosos y/o que sitios de plasticidad son los que median la ocurrencia de cambios particulares en el comportamiento. Una de las implicancias de esta premisa es que no hay un único mecanismo para explicar al aprendizaje asociativo. De lo contrario, existen sistemas de aprendizaje, que, aunque compartan entre ellos algunas características o converjan en estructuras nerviosas relacionadas, son diferentes entre ellos. Esto indica que, teniendo en cuenta fines analíticos, es crítico enfocarse en modelos específicos para entender a las bases neurobiológicas del aprendizaje.

En este trabajo, como se ha mencionado, se utilizó un paradigma de condicionamiento de miedo contextual como modelo de sistema y objeto de estudio.

En este procedimiento el *contexto* es el EC y el EI es una descarga eléctrica que se entrega de manera inmediata, en un procedimiento de 3 días, en donde, en el primero se realiza una pre-exposición al contexto con el fin de censar y obtener información acerca del mismo, el cual será posteriormente asociado con el EI en el segundo día, y al tercer día se somete a los animales al mismo contexto y se analizan las curvas comportamentales que los sujetos realizan. Este procedimiento, denominado FCPC, ofrece la ventaja de separar temporalmente la adquisición de información del contexto, lo cual ocurre durante la pre-exposición, de la asociación entre EI – EC que ocurre en el condicionamiento. Ambos fenómenos involucran a diferentes estructuras y circuitos nerviosos. De este modo, el procedimiento FCPC fue utilizado en esta tesis para responder diversas preguntas, en primer lugar acerca de la posibilidad de encontrar evidencias de aprendizaje de contexto en crías de edades previas al destete, mediante el análisis de diferentes variables dependientes (que se describe en la sección 1); en segundo lugar acerca de la intervención de los NMDAr en el proceso de adquisición de aprendizaje en edades pre y post- destete (descrito en la sección 2); en tercer lugar preguntas acerca de la dinámica de expresión de ciertas proteínas que específicamente están involucradas en el aprendizaje de contexto en el HPCd (sección 3); y por último, utilizamos el paradigma FCPC para evaluar si existen modificaciones derivadas del entrenamiento en el mismo, en la estructura del HPCd a través del análisis de la densidad y morfología de las espinas dendríticas, que son el sitio donde reside la mayor parte de la plasticidad estructural dependiente de la experiencia (sección 4).

En este capítulo discutiremos acerca de los hallazgos principales de este trabajo de tesis y de las implicancias que traen aparejados los mismos, serie por serie.

Desde el principio de la discusión queremos resaltar, con entusiasmo, que los avances alcanzados abren numerosas puertas, permitiendo la generación de nuevas preguntas y desafíos que alcanzar, dejando de manifiesto principalmente, el amplio camino que se abre a partir de la detección de evidencias de aprendizaje de contexto en crías pre-destetadas, de las que poco se ha profundizado en torno a los mecanismos y desarrollo de estructuras que subyacen al mismo, debido a la consideración por parte de diversos autores que reportaron que no es posible que sujetos de tal edad sean capaces de adquirir información de estas características.



### **6.1 Evidencias de aprendizaje contextual en crías de rata de PN17 y PN23, y análisis de modificación del comportamiento en el contexto de entrenamiento por la acción de una descarga eléctrica inmediata, en relación a los eventos previos de pre-exposición.**

Los contextos tienen una función psicológica, son esenciales para extraer significados informados acerca de situaciones, dan forma y definen la percepción de trazas sensoriales, memorias de episodios pasados, contenidos e intenciones (Maren et al., 2013). Por este motivo, el *aprendizaje de contexto* es un tipo de aprendizaje que presenta ventajas adaptativas que se conservan en todo el reino animal, que permite predecir amenazas y modular el comportamiento de manera específica y acorde a las señales del entorno.

Diversos estudios han reportado que existe una retención débil de memorias de miedo contextual en roedores infantiles, cuando se comparan con sujetos de edades posteriores al destete o adultos. Esta observación ha llevado a ciertos autores a postular que la memoria a largo plazo de contexto emerge entre el PN18 – PN23 (Rudy & Morledge 1994; Hunt et al. 2007; Burman et al. 2009; Schiffino et al. 2011). Existen dos hipótesis, no excluyentes entre sí, que se han propuesto para explicar este déficit, la primera, hace alusión a la inmadurez de ciertos sistemas que subyacen al aprendizaje, ya sea por incompleto desarrollo del HPC, o por falta de desarrollo en las conexiones entre el HPC y la A en esa edad (por ejemplo, (Rudy, 2009)); y, la segunda, asume que el análisis del aprendizaje contextual en crías debe tener en cuenta que la capacidad de procesar algunas de las claves del entorno es limitada en sujetos de PN17 que en adultos (Pugh & Rudy, 1998; Brassler & Spear, 1996). El procedimiento FCPC, variante de los paradigmas clásicos de condicionamiento de miedo contextual, el cual permite separar temporalmente las etapas del condicionamiento de miedo contextual, evidenciando en la primera de ellas la necesidad de la funcionalidad del HPC requerida para la adquisición de aprendizaje de contexto; ha sido utilizado por diversos autores, para indagar acerca de la primera de las hipótesis planteadas. En este sentido, ciertas investigaciones han concluido que, en el FCPC, se detectan evidencias de condicionamiento contextual en roedores de PN24 en adelante, y que la fuerza del El

(intensidad de descarga eléctrica) es independiente de la capacidad de adquirir este aprendizaje durante la ontogenia (Schiffino et al., 2011).

A partir de este hallazgo, nos planteamos repetir los experimentos realizados por el grupo del Investigador Mark Stanton (Stanton, 2000; Chadman et al., 2006; Hunt et al., 2007; Burman et al., 2009; Watson y Stanton, 2010; Schiffino et al., 2011a), realizando el procedimiento de FCPC en ratas pre-expuestas el PN17, condicionadas el PN18 y evaluadas el PN19; así como también en sujetos que reciben el entrenamiento en PN23 – PN24 y PN25, para responder nuestra primera pregunta acerca de si es posible detectar evidencias de miedo en estas edades.

En primer lugar, *tanto en sujetos destetados como pre-destetados*, los resultados obtenidos mostraron *evidencias claras de aprendizaje de miedo en el contexto de condicionamiento*.

Para comparar los resultados obtenidos por nuestro grupo con los publicados en la literatura, encontramos en ratas de **PN23**, que el análisis del *% de Congelamiento*, considerada la principal variable que se evalúa en los procedimientos de condicionamiento de miedo contextual, reveló un patrón similar al reportado previamente por otros autores (Burman et al, 2009; Schiffino et al, 2011; Jablonski et al, 2012), que indicaron que los niveles de la variable congelamiento fueron mayores en sujetos pre-expuestos condicionados con una descarga de 1.5mA, que en sujetos no pre-expuestos tratados con la misma intensidad de descarga eléctrica: efecto de Facilitación del condicionamiento por pre-exposición al contexto (experimento 1a).

Es importante analizar en este punto que el nivel de *% de congelamiento* ejecutado por los sujetos pertenecientes al grupo *no pre-expuesto condicionado*, es decir, el efecto de la descarga inmediata (ya que son sujetos sin experiencia previa en el contexto pero que reciben una descarga eléctrica durante el condicionamiento) ha sido generalmente interpretado como un nivel basal indicativo de ausencia de condicionamiento, y en general se ha considerado que los sujetos pertenecientes a este grupo son los controles de la posible respuesta de sensibilización o de los efectos de pseudo-condicionamiento.

En nuestro diseño experimental (en todas las series en donde se realizó el procedimiento FCPC) se agregaron grupos de sujetos, tanto pre-expuestos como no pre-expuestos, que en el día de condicionamiento (fase 2 del FCPC) no recibieron ninguna descarga eléctrica (0mA), sino que fueron colocados en la caja de condicionamiento donde permanecieron por 2 seg., y se retiraron inmediatamente a su jaula hogar hasta el día de la evaluación. Estos sujetos *NO condicionados* fueron los controles para cada una de las condiciones evaluadas. Encontramos en **PN23**, experimento 1a, que los sujetos *no pre-expuestos condicionados* con una descarga de 1.5mA, alcanzaron un nivel de congelamiento significativamente mayor que los controles no condicionados, indicando que la descarga por sí misma induce un cierto grado de miedo en ese grupo experimental. El mismo resultado fue encontrado en **PN17**, en el experimento 1b, al comparar los sujetos condicionados de los no condicionados, pre y no pre-expuestos.

Otra particularidad de nuestro diseño experimental fue considerar el análisis del etograma comportamental completo ejecutado por los sujetos de las distintas condiciones experimentales durante la evaluación, y no solamente el % de congelamiento que es la variable comúnmente utilizada indicativa de aprendizaje en los paradigmas de miedo condicionado. Diversos autores han detectado evidencias de aprendizaje en ciertas condiciones, por ejemplo con intensidades de descarga eléctrica inferiores (0.5 o 1mA) a las comúnmente empleadas en estos procedimientos (1.5mA) (Bevins & Ayres, 1995; Bevins et al., 1997), al registrar variables como la exploración o la defecación. Por este motivo, el patrón general de exploración fue registrado (temporalmente, minuto a minuto) en todos los análisis de la evaluación del FCPC, el cuál se dividió en 4 variables excluyentes entre ellas: exploración horizontal, exploración vertical, higiene, congelamiento (por minuto), además de agregar los índices % de congelamiento y bolos fecales al final de la sesión de evaluación.

Dadas las evidencias en literatura de condicionamiento de miedo contextual en paradigmas en donde se entrega una descarga eléctrica inmediata con intensidades inferiores a 1.5mA, es que se agregó en el diseño, además de los controles antes mencionados que recibieron 0mA, una intensidad leve de 0.5mA (experimentos 1a y 1b).

El análisis del resto de las *variables dependientes* que constituyeron un *etograma exhaustivo* de la sesión de evaluación, aportaron resultados relevantes que permitieron detectar evidencias de aprendizaje contextual, en ambas edades. Algunas de estas evidencias no se hubiesen detectado en ciertos grupos experimentales si se analizaba la variable comúnmente utilizada en la literatura (% de congelamiento). En este sentido, el tratamiento con una descarga eléctrica (0.5 o 1.5mA) suprimió las conductas de higiene e indujo la defecación, independientemente del tratamiento de pre-exposición. Por otro lado, la pre-exposición afectó a la exploración vertical inducida por la descarga eléctrica, que fue suprimida por los sujetos pre-expuestos y se observó aumentada en los sujetos no pre-expuestos, principalmente evidenciado en el primer minuto de evaluación del test. Finalmente, la utilización de la descarga eléctrica más elevada (1.5mA) suprimió a su vez, la exploración horizontal, independientemente de la condición de pre-exposición, en sujetos de **PN23** pero también en sujetos de **PN17**.

Otro ejemplo de cómo el comportamiento de los sujetos varía de acuerdo a la pre-exposición al contexto se puede tomar del análisis de la variable de actividad vertical. Durante el primer minuto de evaluación, los sujetos no pre-expuestos condicionados ejecutan durante un mayor tiempo la conducta de exploración vertical, con respecto al resto de las condiciones experimentales, lo que se observó tanto en **PN23** como en crías de **PN17**. Este resultado podría indicar que los sujetos, que no tuvieron experiencia previa en el contexto, excepto por los segundos de condicionamiento durante la descarga inmediata, podrían estar intentando escapar de la caja de condicionamiento, ya que ejecutan esta variable apenas se colocan en la sesión de evaluación (1<sup>er</sup> minuto) y luego esta conducta desaparece, probablemente porque evalúan, a través de la exploración de la caja de condicionamiento, que no hay posibilidades de salir de la misma, y comienzan a expresar el miedo a través del aumento en la congelación (tiempo), cuya ejecución va aumentando a lo largo de la prueba. En contraste, los sujetos pre-expuestos condicionados no mostraron el aumento en la exploración vertical en el primer minuto, sino que ejecutan elevados niveles de congelamiento en el primer período (efecto de facilitación). De este modo, podemos interpretar que *es la experiencia previa en el contexto la que determina de*

*qué manera se expresará el condicionamiento a una descarga eléctrica, entre los diferentes grupos experimentales.*

En conjunto, los resultados del análisis de las variables múltiples en el paradigma FCPC, con los grupos controles adecuados, mostraron evidencias claras de miedo en las ratas entrenadas con una descarga eléctrica, e indicaron que, el modo en el que los animales se comportan y el patrón general de repertorio conductual en la sesión de evaluación, cambia en respuesta al tratamiento de condicionamiento, varía de acuerdo a la experiencia de exposición previa al contexto y está relacionado con la intensidad de descarga eléctrica utilizada. Al ser las variables registradas mutuamente excluyentes, se pudo detectar que la descarga eléctrica más elevada (1.5mA), que acentuó el tiempo en que los animales ejecutan respuestas de congelamiento, suprimió a su vez la exploración horizontal y disminuyó significativamente el tiempo de ejecución de conductas de higiene. Sin embargo, la descarga de 0.5mA empleada no aumentó los niveles de congelamiento o redujo la actividad horizontal, pero inhibió el tiempo de ejecución de conductas de higiene. De estos datos se pueden sacar dos conclusiones importantes: (1) la ausencia de congelamiento no necesariamente indica ausencia de miedo (o déficits en la memoria), ya que, por ejemplo, el tratamiento con descarga eléctrica de 0.5mA no indujo congelamiento pero suprimió la higiene y aumentó la defecación independientemente del tratamiento de pre-exposición; y (2) la inhibición de la higiene podría ser considerada un indicador de miedo más sensible que el congelamiento.

EL FCPC no necesariamente implica un *déficit de aprendizaje* en la condición de *descarga inmediata*. El efecto de facilitación está basado, a nivel teórico, en un déficit de aprendizaje que es revertido por un tratamiento de pre-exposición en el contexto de condicionamiento, que es deducido a partir de la observación de la conducta de congelamiento (Wiltgen et al., 2001; Bevins et al., 1997; Landeira-Fernandez et al., 2006). En la serie experimental 1 (en ambas edades) encontramos consistentemente un nivel de congelamiento elevado en sujetos pre-expuestos condicionados en comparación a los no pre-expuestos, pero, considerando los resultados del resto de las variables dependientes, es difícil concluir que esta diferencia en los niveles de congelamiento reflejaría un déficit de aprendizaje. En la evaluación, tanto los sujetos

pre como no pre-expuestos, mostraron niveles similares de defecación, inhibición de la higiene y un patrón temporal de expresión de la actividad vertical diferencial entre los sujetos que reciben una descarga eléctrica y los controles no condicionados. Alternativamente, como se sugirió anteriormente, esta serie de resultados podría reflejar que las ratas pre y no pre-expuestas expresan el miedo de manera diferencial debido a que cada condición recibió distinta cantidad de información acerca del contexto, por la experiencia previa en el mismo, conociendo o no si existen posibilidades de escapar, que se evidencia a través de la exploración vertical, por ejemplo, lo cual se diferencia en los sujetos no pre-expuestos condicionados de los pre-expuestos.

Se mencionó con anterioridad que el análisis general del etograma comportamental en las crías pre-destetadas (**PN17**) reveló un patrón similar de resultados que en las destetadas (**PN23**). Sujetos pre-expuestos condicionados con 1.5mA realizaron más tiempo de congelamiento que los no pre-expuestos: el característico efecto de facilitación descrito para el FCPC. A su vez, el resto de las variables analizadas reflejaron información relevante acerca de los posibles patrones comportamentales que se ejecutan por la experiencia previa a un contexto y/o condicionamiento. Por un lado, los sujetos pre-expuestos condicionados comenzaron de manera más tardía a realizar conductas de higiene y defecaron más que los controles. También los sujetos de la condición no pre-expuestos se vieron afectados por la descarga eléctrica, ya que los condicionados ejecutaron durante un tiempo significativo una mayor actividad vertical en el primer minuto de evaluación, defecaron más que sus controles, realizaron durante menos tiempo repertorio de higiene y pasaron más tiempo inmovilizados que los no condicionados, de manera similar a los sujetos de **PN23**. Estos resultados muestran fuertes evidencias de miedo en ratas pre destetadas, independientemente del tratamiento de pre-exposición, y demuestra que el aprendizaje de contexto durante la ontogenia en el paradigma FCPC se debe abordar mediante el análisis del abanico comportamental que despliegan los sujetos durante la evaluación.

De los estudios previos, que no encontraron evidencias de aprendizaje en crías, surgen diversos puntos a tener en cuenta. En general, la pre-exposición al contexto

antes de la sesión de condicionamiento no aumenta la respuesta de congelamiento en **PN17**, al ser comparada con la de los sujetos que no fueron pre-expuestos y que reciben la descarga inmediata, es decir no encuentran el conocido efecto de facilitación típico del FCPC (Burman et al., 2009; Schiffino et al., 2011b; Murawski y Stanton, 2011; Jablonski et al., 2012), aun cuando duplican la intensidad de la descarga eléctrica, condicionando en la sesión con dos descargas eléctricas seguidas de 1.5mA (Burman et al., 2009). En nuestro trabajo encontramos que los animales de esta edad, pre-expuestos condicionados, realizaron mayor tiempo de congelamiento que los grupos condicionados no pre-expuestos, y menor tiempo de exploración horizontal (experimento 1b). La posibilidad que nos planteamos acerca de la discrepancia en los resultados obtenidos entre nuestro y otros grupos, es que, en esta tesis, el tratamiento de pre-exposición no involucró la exposición a otro contexto alternativo, sino que, en esa fase, los sujetos solo fueron manipulados y colocados en su jaula hogar nuevamente en donde permanecieron hasta el día siguiente que fueron condicionados. Sin embargo, existe un estudio que evalúa el FCPC en esta edad (**PN17**) en el que el tratamiento que recibieron los sujetos no pre-expuestos durante la fase 1, fue el mismo que el procedimiento realizado en esta tesis, y sus resultados son similares a los reportados por otros autores que los pre-expusieron a un contexto alternativo (Foster y Burman, 2010). Hay otros posibles escenarios que podrían explicar estas discrepancias entre los resultados, y que deberían ser probadas en investigaciones futuras. Por ejemplo, en nuestro trabajo sólo utilizamos machos, mientras que en otros utilizan sujetos de ambos sexos (Burman & Stanton, 2009) si bien no reportan evidencias de diferencias en las respuestas entre machos y hembras, ni existen publicaciones que contemplen alguna diferencia entre los sexos a esta edad (**PN17**). Por otro lado, podría haber diferencias en la ontogenia del miedo contextual a través de las cepas de animales que se utilizaron. En este estudio las ratas son de la cepa Wistar, mientras que el grupo de Mark Stanton utiliza Long Evans (Murawski y Stanton, 2011; Jablonski et al., 2012; Schiffino et al., 2011b) y el grupo de Michael Burman utiliza Sprague Dawley. Independientemente de estas posibilidades, y como se describió anteriormente, la incorporación de grupos experimentales controles (sin condicionamiento) y el uso de otras variables que representen al etograma exhaustivo agudizaron los efectos derivados del entrenamiento en el FCPC en **PN17**. Más adelante

se discutirán los resultados obtenidos de la manipulación farmacológica sobre los receptores NMDA, que otorgan mayor fortaleza a lo evidenciado en la serie experimental 1, ya que replican los resultados de la misma para ambas edades.

## **6.2 Modulación del FCPC por la acción de los NMDAr en ratas pre y post-destetadas: abordaje a través de la manipulación farmacológica.**

Durante los últimos 30 años se ha debatido si ratas pre-destetadas son capaces de adquirir, retener y utilizar información contextual. En algunos de los estudios que abordan esta pregunta, los autores no encuentran evidencias de condicionamiento de miedo contextual durante la infancia, o modulación contextual de los efectos de interferencia de aprendizaje (como la inhibición latente o extinción – para revisión ver Revillo et al. 2014). Estos resultados son consistentes con otros que muestran que, en edades tempranas, estos sujetos no son capaces de utilizar señales distales para orientar su comportamiento, lo que sugiere importantes limitaciones en el aprendizaje espacial y contextual en esta etapa de desarrollo.

Debido a que el aprendizaje contextual se ha relacionado con la actividad del HPC en roedores adultos, se desprende la hipótesis de que esta estructura del cerebro *no es funcional* durante las tres primeras semanas de vida postnatal. Por lo tanto, durante este período ontogenético, se establece que el aprendizaje y la conducta son *independientes de contexto*. De este modo, resultados empíricos de otros grupos han concluido que ratas pre-destetadas adquieren un condicionamiento de miedo contextual que se considera leve en comparación a las adultas. Esta diferencia ontogenética es explicada por diversos autores como una inmadurez en los sistemas que sustentan a este tipo de aprendizaje a esa edad (por ejemplo, del HPCd), o como una inmadurez en la conectividad entre los sub-sistemas involucrados (principalmente entre HPCd y A). Como fue mencionado anteriormente, el FCPC es un procedimiento que permite a los investigadores separar el rol de HPC, que es principalmente la adquisición del aprendizaje contextual, y ocurre en la fase 1 del procedimiento, *temporalmente* del resto del procesamiento de la información y de la formación de la



asociación EC-EI, lo que ocurriría en la fase 2 del FCPC, en donde intervienen HPC y A. Durante la pre-exposición, los sujetos de la condición pre-expuestos, forman una representación contextual dependiente del HPC, que está disponible durante el condicionamiento para ser rápidamente recuperada y así formar la asociación para la formación de la memoria contextual (que ocurre en sujetos pre-expuestos y no en los no pre-expuestos al contexto) (Rudy, 2009). Por lo tanto, si el FCPC requiere de la formación de una representación configuracional del contexto y del HPCd maduro y funcional, y los resultados obtenidos en la serie experimental 1 de esta tesis mostraron que ratas de **PN17** pueden adquirir esta representación, nos preguntamos entonces si es posible que el HPCd sea lo suficientemente maduro y funcional a esta edad para la formación de la representación configuracional del contexto lo cual será discutido en esta y la siguiente sección, y hace referencia a las series experimentales 2 y 3 de esta tesis.

Las respuestas específicas de condicionamiento encontradas en el análisis de las variables múltiples por el entrenamiento en el FCPC (como la defecación y la higiene) y las respuestas que integran la asociación entre la exploración en el contexto y el condicionamiento (como la exploración vertical y el congelamiento) se observaron en sujetos de **PN17**, y arrojaron curvas similares a las obtenidas en **PN23**, lo que nos indicaría *a priori* que, no sólo el HPCd es maduro y funcional en este rango etario, sino que la integración con la A permite la formación de la asociación entre estímulos y la generación de respuestas específicas.

Consistente con la importancia del HPC en la tarea de aprender acerca de relaciones complejas entre estímulos, pero no en episodios de aprendizaje asociativo simple, al HPCd se lo ha implicado en el condicionamiento de contexto clásico, pero no a estímulos discretos (como un tono), a través del rol central específico que se les ha atribuido a los mediadores de este aprendizaje: los NMDAr (Bast et al., 2003). Se asume que el LTP es el mecanismo que subyace al aprendizaje asociativo (Cook & Bear, 2012), el cual es evocado por estimulaciones de alta frecuencia de vías aferentes que resultan en un aumento de la eficacia sináptica a largo plazo. Dos ejemplos de cambios en la fuerza sináptica son los mecanismos de LTD y LTP, que se inducen en una gran variedad de áreas del cerebro a través de diversos protocolos de estimulación

(Fanselow y Poulos, 2005). La mayoría de las sinapsis excitatorias en el cerebro utilizan al glutamato para transmitir impulsos entre neuronas. Durante la transmisión rápida, el neurotransmisor usualmente activa una combinación de NMDAr y AMPAr en las células postsinápticas. Para la ocurrencia de LTD, además de la estimulación de los NMDAr, se requiere una remoción de los AMPAr de la membrana postsináptica, mientras que para la ocurrencia de LTP se requiere una inserción de los mismos en la postsinapsis (Mori y Mishina, 2003). Ambos tipos de receptores conforman canales catiónicos que convierten una señal química en una señal eléctrica (cambio en el voltaje de la membrana postsináptica debido al influjo de cationes por el poro del canal iónico) (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004; Yashiro y Philpot, 2009). Los diferentes subtipos de NMDAr (según las subunidades que los conforman) presentan propiedades biofísicas particulares, pero requieren la coincidencia tanto de la liberación presináptica de glutamato, la presencia del co-agonista glicina y la despolarización postsináptica de la membrana para liberar el  $Mg^{2+}$  que bloquea a los canales, para su apertura. Los NMDAr son permeables a  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , siendo el último de estos cationes el que actuará como segundo mensajero para modificar las sinapsis (Gruart et al., 2015). Muchas de las formas de LTD y LTP requieren la activación de los NMDAr y la subsecuente cascada de eventos desencadenada por el influjo de  $Ca^{2+}$  por estos canales.

Investigadores de diversos grupos, desde hace años, han indicado que los NMDAr median el aprendizaje a través del aumento del influjo de  $Ca^{2+}$  y la iniciación de eventos intracelulares que conducen a la expresión de genes puntuales y el reforzamiento sináptico (Morris et al., 1990). De hecho, existen evidencias que proponen a los NMDAr como un blanco terapéutico para la mejora cognitiva, lo cual ha sido posible en condiciones específicas (Tang et al., 1999). Se sugiere que la ocurrencia de LTP mediada por los NMDAr en el HPC, conduce a la adquisición del miedo condicionado, y de este modo, al aprendizaje y la memoria. En consecuencia, se establece que la acción regulada de los NMDAr modulan procesos emergentes superiores como la cognición (Corcoran y Maren, 2001).

De este modo, diversas evidencias indican que el bloqueo de la acción de los NMDAr en animales debería prevenir la ocurrencia de LTP, así como los cambios

concomitantes en la fuerza sináptica y la posterior adquisición de aprendizaje asociativo (Gruart et al., 2015). Además, la inhibición de estos receptores durante la exploración en un contexto, previa al condicionamiento, en un paradigma estándar de condicionamiento de miedo contextual, disminuye los beneficios de la exploración y el efecto de facilitación por pre-exposición, en ratas adultas (Stote y Fanselow, 2004).

El MK-801 (Dizocilpina) es un antagonista no competitivo de los NMDAr que bloquea al poro del canal que forman las subunidades que conforman el receptor. El MK-801 impide cualquier tipo de señalización mediada por los NMDAr. Esta droga despliega una variedad de acciones fisiológicas en el SNC, como anestésica o anticonvulsiva (Kovacic y Somanathan, 2010). Cuando se administra en humanos, la utilización de esta droga mimetiza algunos de los síntomas de la Esquizofrenia, incluyendo alucinaciones, paranoia y modificación de la conducta. De manera similar, el uso de MK-801 en modelos animales resulta en comportamientos del tipo psicóticos y alteraciones que incluyen déficits sensoriales y motores, hiperactividad o aislamiento social, además de disfunción en la en el aprendizaje y la memoria (revisado en Lim et al. 2012). Sin embargo, el espectro de acciones que produce el MK-801 depende de la administración (aguda o crónica) y la dosis empleada. En general, se ha evidenciado que los efectos principales producidos por dosis leves de este antagonista tienen que ver con un impedimento en la ganancia de peso corporal normal (dosis iguales o mayores a 0.25mg/kg), mientras que el uso de MK-801 en dosis mayores y de manera crónica (en general, en protocolos de dos administraciones diarias y en ventanas temporales de 4 días como mínimo), producen un aumento en la actividad locomotora, algunos impedimentos en la memoria espacial, disminución del volumen y peso cerebral, entre otras (ver tablas 1-4 de revisión de (Lim et al., 2012).

En general el empleo de MK-801 en procedimientos de condicionamiento de miedo contextual suele ser realizado de manera sistémica o intra-hipocampal, dependiendo del procedimiento, en dosis de 0.1 a 0.2mg/Kg, de manera aguda (una única inyección) y se establece en la literatura que las mismas no producen modificaciones en el patrón comportamental de roedores de PN23 en adelante (Foster y Burman, 2010; Schiffino et al., 2011b; Jablonski et al., 2012). Un estudio en el que se realiza una curva de dosis-respuesta en un procedimiento de condicionamiento de

miedo contextual en sujetos de PN26, reporta que la administración previa a la adquisición de aprendizaje contextual de MK-801 de 0.056mg/Kg no produce alteraciones, mientras que comienza a verse un efecto a partir de 0.1mg/Kg y consideran que la dosis de 0.18mg/Kg corresponde al límite mayor aceptable en donde el efecto de la droga está acompañado de efectos motores modestos en algunos de los sujetos experimentales (Chadman et al., 2006). En esta tesis basamos nuestro procedimiento de administración farmacológica en los resultados previos del grupo de Mark Stanton, y realizamos una inyección sistémica de MK-801 previa a la sesión de pre-exposición de 0.1mg/Kg (experimentos 2a-PN23 y 2b-PN17) y una inyección de MK-801 sistémica de 0.1 o 0.2mg/Kg antes de la sesión de condicionamiento, en un experimento separado (sugerido por la comisión asesora de tesis) con el fin de revisar si la dosis de MK-801 más elevada, revertía completamente el efecto de condicionamiento encontrado en los sujetos no pre-expuestos condicionados – (experimento 2c). Es importante resaltar que no existen evidencias previas que hayan evaluado las implicancias de la inhibición farmacológica de los NMDAr en crías de edades tempranas, hasta la fecha.

Los conceptos que prevalecen acerca del rol del HPCd y la señalización local mediada por los NMDAr, durante el condicionamiento de miedo, predicen que la utilización de MK-801 impediría el desarrollo del mismo, si es administrado de manera local en esta estructura responsable de la adquisición de aprendizaje contextual (Cercato et al., 2014). Por otra parte, diversos estudios realizan el bloqueo de los NMDAr de manera sistémica, a través de inyecciones ip de MK-801, por lo que no sólo manipulan la acción de los receptores en la formación de la configuración del contexto, sino que interfieren en procesos asociativos a nivel de otras estructuras, como la A (Burman et al., 2009; Schiffino et al., 2011a; Heroux et al., 2016). De igual modo, la ventaja de la utilización de un paradigma tipo FCPC, que permite separar temporalmente la acción de cada uno de los sistemas de asociación, por lo que, en esta tesis, la estrategia de uso del MK-801 ha sido de manera sistémica y se ha tenido en cuenta el momento de la inyección.

Se ha descrito en la literatura que el bloqueo farmacológico de los NMDAr a través del uso de MK-801, produce un déficit en la característica respuesta de

facilitación encontrada en el FCPC en sujetos de **PN23** (Schiffino et al. 2011), un efecto que ya ha sido evidenciado para ratas adultas, y se ha estudiado a través del uso de antagonistas de los receptores NMDA, no sólo de manera periférica sino localmente en el HPCd (Shimizu et al., 2000; Young et al., 1994).

Es importante resaltar que el efecto de los antagonistas de los NMDAr sobre el aprendizaje contextual no se ha explorado en ratas pre-destetadas debido a la hipótesis general de ausencia de este tipo de aprendizaje en sujetos menores a **PN23**.

Luego del hallazgo de las respuestas comportamentales indicativas de aprendizaje en **PN17** encontradas en la serie experimental 1 de este trabajo de tesis (Pisano et al., 2012), abordamos el segundo objetivo, que conforman la serie experimental 2, evaluando el efecto de la inhibición de los receptores NMDA en *ambas edades* durante el FCPC, para luego estudiar la dinámica temporal de expresión de la subunidad NR2B en la sección 3.

El primer experimento de esta serie fue diseñado para evaluar si MK-801, el principal antagonista no competitivo de los NMDAr, interfiere con el condicionamiento de miedo contextual en ratas destetadas (**PD23**, Experimento 2a) o pre-destetadas (**PD17**, Experimento 2b).

Los resultados obtenidos demostraron, en ambos grupos de edades, que la administración sistémica de un antagonista de los NMDAr, MK-801, antes de la fase de pre-exposición suprimió el efecto de FCPC, y principalmente, modificó el patrón comportamental descrito en la serie experimental 1 para los sujetos pre-expuestos.

En sintonía con lo esperado, se observó en sujetos de **PN23** que los animales pre-expuestos condicionados y administrados con la droga ejecutaron, para todas las variables dependientes analizadas, un patrón comportamental similar a los sujetos no pre-expuestos condicionados. Las respuestas de condicionamiento que observamos en ésta y en la serie experimental 1, que fueron guiadas por la descarga eléctrica inmediata, se mantuvieron para los animales no pre-expuestos condicionados, al igual que para los sujetos pre-expuestos condicionados que recibieron el vehículo (disminución en la actividad horizontal, aumento en la defecación y disminución en las conductas de higiene); mientras que, en las variables guiadas por el efecto de pre-

exposición (como la actividad vertical), observamos que el grupo pre-expuesto condicionado – MK-801 se comportó como los no pre-expuestos condicionados, mostrando los principales efectos de las variables de expresión de condicionamiento de los sujetos no pre-expuestos (1° minuto de exploración vertical y ausencia del efecto de facilitación).

Tal como hipotetizamos, al evaluar el efecto en la pre-exposición de MK-801 en crías de **PN17**, encontramos que las variables que fueron influenciadas por el efecto de condicionamiento, no modificaron el patrón de respuesta, mientras que las variables en las que la pre-exposición guía la respuesta comportamental, como el congelamiento, el % de congelamiento o la exploración vertical, demostraron que en esta edad el MK-801 ejerce una acción que hace que los niveles de expresión de estas variables se acerquen más al comportamiento de los grupos NP condicionados.

En este sentido, se detectó que la inhibición de los NMDAr durante la fase de pre-exposición *NO elimina las respuestas de miedo condicionadas*, sino que hace que los sujetos que fueron pre-expuestos condicionados, se comporten de manera similar a los no pre-expuestos condicionados, lo cual es observado en animales de edades *pre* y *post-destete*, con patrones comportamentales similares. De este resultado podemos concluir, tal como lo describe la literatura que *el aprendizaje contextual es dependiente de los NMDAr en PN23*, y más importante aún, *extendemos estos hallazgos a PN17*.

Es interesante resaltar que en esta serie experimental se replicaron las curvas principales para las variables comportamentales obtenidas en la serie 1 (en los sujetos inyectados con solución salina) que fueron diferentes a las observadas en los grupos administrados con MK-801 durante la pre-exposición. Además, la acción del MK-801 en ambas edades determinó una línea similar, modificando el patrón conductual de los animales pre-expuestos condicionados similar al de sujetos sin experiencia previa en el contexto.

Al evaluar el efecto del bloqueo de los NMDAr en el condicionamiento, sólo en sujetos de PN23 no pre-expuestos al contexto (grupo experimental que recibe la descarga eléctrica inmediata como EI), obtuvimos, en primer lugar, que la administración farmacológica de MK-801 (0.1 o 0.2mg/Kg) en los sujetos controles no

condicionados, no altera el patrón conductual observado en este grupo experimental. En cambio, cuando a los sujetos que se les administró el antagonista, y recibieron una descarga eléctrica de 1.5mA, las conductas ejecutadas en respuesta a la descarga inmediata se vieron modificadas en ciertas variables, siendo en algunos casos revertidas por completo con la dosis de 0.2mg/Kg (actividad horizontal, primer minuto de actividad vertical, congelamiento y % de congelamiento), mientras que otras variables, como los bolos fecales, demostraron efectos de condicionamiento independientes de la manipulación farmacológica (Fig.21).

En conclusión, los resultados de la serie 2 muestran que el aprendizaje contextual, que se determina *a priori* que está menos desarrollado en crías que en roedores adultos, indican nuevamente (al igual que en la serie experimental 1) *evidencias de condicionamiento de miedo contextual*. Además, en ambos grupos de edades, la administración de MK-801 durante la pre-exposición modifica el aprendizaje contextual generando un patrón de respuesta que se asemeja a sujetos que no tuvieron experiencia previa en el contexto. Este resultado sugiere que el aprendizaje de contexto podría estar mediado por mecanismos similares que implican a los NMDAr, tanto en **PN23** como en **PN17**, si bien la utilización de MK-801 no elimina el miedo condicionado en estos grupos animales. Por otro lado, obtuvimos en esta serie que los efectos producidos por la descarga inmediata en los animales del grupo no pre-expuesto condicionado, se revierten por la administración de MK-801 sólo en dosis elevadas (0.2mg/Kg).

### **6.3 Dinámica de NR2B y de su actividad específica mediada por la fosforilación NR2B-Y1472 en el HPCd, durante la adquisición del aprendizaje contextual, en respuesta a la pre-exposición en ratas pre y post-destetadas.**

Como se describió en la introducción, los NMDAr son canales iónicos permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  que están formados por 4 subunidades que, según la combinación de las mismas, le confieren al canal propiedades biofísicas particulares (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004). Las subunidades NR2A y NR2B son las que predominan en el cerebro anterior, y presentan particularidades que las diferencian entre sí, no sólo por

su expresión diferencial en el desarrollo y en las regiones cerebrales, sino también por su localización subcelular y por las capacidades de interactuar con distintos complejos de proteínas y así desencadenar cascadas de señalización que acercan a cada una de ellas a procesos diferenciales en las que se encuentran involucradas (Yashiro et al., 2008). Las características diferenciales en la sensibilidad a moduladores endógenos, permeabilidad o bloqueo de los canales, cinética e interacción con proteínas intracelulares hacen que los NMDAr conformen una familia que presenta un amplio rango funcional. Se han relacionado particularmente a los receptores que contienen subunidades del tipo NR2B en procesos de aprendizaje y memoria (Berberich et al., 2005a, 2007; Oh-Nishi et al., 2009; Müller et al., 2013; Chen et al., 2014). En este sentido, estudios previos han evidenciado que, tanto en ratones knockdown de NR2B, o debido a la disminución de la fosforilación de tirosinas de NR2B (aunque sea de manera parcial) se observa un impedimento en la ocurrencia de LTP hipocampal o cortical, y en consecuencia en el desempeño en el aprendizaje (Clayton et al., 2002; Takehara et al., 2004; Zhao et al., 2005; Cravens et al., 2006; Gardoni et al., 2009b), mientras que la sobreexpresión transgénica o la disminución de la degradación de NR2B reflejan un aumento del LTP en el HPC y una mejora en el aprendizaje (Tang et al., 1999; Hawasli y Bibb, 2007).

Para inducir mecanismos de LTD o LTP dependiente de los NMDAr, las vías de señalización que se desencadenan deben estar acopladas a las subunidades que forman al receptor, por lo que las proteínas de interacción con las mismas son determinantes claves de la dirección de la plasticidad sináptica (Carlisle y Kennedy, 2005). NR2B se une a compañeros únicos, por ejemplo, se une e interactúa con RasGRF1 (del inglés, Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1) o con RasGAP (Ras GTPase activating protein), a través de la proteína asociada a la sinapsis 102 (SAP102). Esta asociación única afecta la inducción de plasticidad (Zhu et al., 2002). Uno de los sustratos a los que se une específicamente NR2B es CaMKII, que se encuentra ampliamente expresada en las sinapsis, y se conoce su acción en la generación de LTP (Lisman et al., 2002). Esta proteína CaMKII se une con mucha afinidad a NR2B y con baja afinidad a NR2A. El  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa a la célula postsináptica a través de los canales NMDAr, se asocia con la proteína de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , la calmodulina, formando un



complejo que interactúa y activa a CaMKII, que se une fuertemente a NR2B, permitiéndole que se mantenga en estado activado aún luego de la disociación del complejo  $Ca^{2+}$ /calmodulina. Esta asociación de NR2B con CaMKII es requerida para la inducción de LTP (Barria y Malinow, 2005). Por otra parte, se ha establecido que tanto NR2A como NR2B contienen un motivo de unión PDZ en su extremo C-terminal, que mantiene a las subunidades en la densidad postsináptica a través de la unión con proteínas de anclaje de la familia de las MAGUKs, como la PSD-95 o SAP102. Interesantemente, la unión a PDZ es requerida para la localización sináptica de NR2B pero no de NR2A (Lin et al., 2004; Prybylowski et al., 2005). Ambas subunidades NR2 contienen señales endocíticas en su extremo C-terminal, siendo el motivo YEKL en NR2B el que se une a la proteína adaptadora de clatrina, AP2, para mediar la endocitosis mediada por clatrina. Cuando se fosforila en NR2B el motivo YEKL en la tirosina *tyr*-1472 (Y1472), por la acción de la proteína quinasa Fyn (de la familia de las Src), la misma se protege de la unión a AP2 y, por lo tanto, de su endocitosis, siendo este un mecanismo regulatorio de la localización subcelular de NR2B y de su disponibilidad sináptica (Lavezzari et al., 2003; Rodrigues et al., 2001; Zhang et al., 2008a). Además, se ha reportado que la fosforilación de la subunidad NR2B en Y1472, se encuentra aumentada después de la inducción de LTP en el hipocampo, y se propone que Y1472 es un sitio de fosforilación principal que participa en la modulación de la plasticidad sináptica del HPC (Nakazawa et al., 2001). En un procedimiento de condicionamiento de miedo Pavloviano, se observó un aumento de Y1472-NR2B luego de la asociación entre el contexto y el condicionamiento, lo cual no fue observado en respuesta a la descarga inmediata, lo que indicaría que no hay cambios en la dinámica de los NMDAr en el déficit de la descarga inmediata (Isosaka et al., 2008). Estos datos demuestran la importancia de la subunidad NR2B en la actividad mediada por los NMDAr, y resaltan el sitio de fosforilación Y1472 como candidato de la dinámica de la subunidad NR2B durante la adquisición de aprendizaje contextual.

Por otra parte, se ha establecido que el complejo Cdk5/p35 cumple un papel importante en la regulación de las subunidades del receptor NMDA (Sato et al., 2008; Morabito et al., 2004; Hawasli y Bibb, 2007; Hawasli et al., 2007; Zhang et al., 2013). El complejo Cdk5/p35 es un importante regulador de la función sináptica y de la

señalización glutamatérgica (Dhavan y Tsai, 2001; Angelo et al., 2006; Lai et al., 2012b). Ha sido demostrado que Cdk5 facilita la degradación de la subunidad NR2B mediada por clatrina (Hawasli et al., 2009) y, además, fosforila directamente al extremo N-terminal de la PSD-95 facilitando la internalización de la subunidad NR2B (Morabito et al., 2004; Zhang et al., 2008b).

La posibilidad que nos presentaron los hallazgos de la serie experimental 2, a través de los resultados obtenidos por la inhibición de los NMDAr durante la fase de pre-exposición y la consecuente provocación de la modificación del patrón comportamental de sujetos tanto de **PN23** como de **PN17**, se encuentra reforzada por los resultados obtenidos en la serie experimental 3. La misma fue diseñada para evaluar la dinámica de los NMDAr, específicamente de la subunidad NR2B, luego de la exposición a un contexto novedoso desconocido. Este abordaje se realizó a través de la evaluación de su expresión en sinaptosomas de HPCd, a distintos tiempos posteriores a la finalización de la pre-exposición, tanto en los sujetos pre como post-destetados. Es importante destacar que la pre-exposición al contexto de entrenamiento se realizó en una única sesión de 10 minutos de libre exploración, y luego de su finalización se analizaron los niveles de expresión de NR2B, NR2BY1472, PSD-95, Cdk5 y p35 a distintos tiempos (desde minuto 0 a 70 post pre-exposición) en comparación con sujetos no pre-expuestos que fueron sacrificados sin ninguna manipulación.

Los resultados de esta serie revelaron una actividad temporal dinámica del estado fosforilado de NR2B, en el sitio específico Y1472, que está funcionalmente relacionado con la determinación de la localización subcelular del receptor, y en consecuencia su disponibilidad para la sinapsis.

Los datos obtenidos muestran un aumento en la expresión de este estado fosforilado de NR2B (y no de la subunidad NR2B total) posterior a un tratamiento de pre-exposición en un contexto nuevo, el cual no fue detectado en el grupo no pre-expuesto. Este resultado fue encontrado en **PN23** y, de manera interesante, en **PN17**. En ambas edades, la relación NR2BY1472 / NR2B muestra un aumento transiente luego de la adquisición de la información de contexto. Lo novedoso de este hallazgo es que es la primera vez que se ha detectado en ratas pre-destetadas, un resultado que

va en contra de la hipótesis de que el hipocampo dorsal no es funcional durante esta etapa ontogenética. Nuevamente, este resultado refuerza la idea de que los mecanismos a través de los cuales los sujetos de las edades estudiadas adquieren el aprendizaje de contexto parecen ser similares, e involucran a la subunidad candidata, según la literatura, como mediadora de esta tarea en adultos.

Por otra parte, no encontramos diferencias en sinaptosomas de HPCd en los niveles de expresión de las proteínas regulatorias propuestas: Cdk5, p35 ni PSD-95, en ninguna de las edades. Sin embargo, no necesariamente la ausencia de diferencias en la expresión total de las mismas reflejaría que estos complejos de proteínas no interactúan entre sí durante la adquisición de aprendizaje de contexto. Se desprende de este resultado la necesidad de realizar un análisis más profundo para evaluar la interacción entre los actores propuestos en la regulación de la localización de NR2B, como por ejemplo, a través de metodologías de biotinilación de proteínas de membrana, o realización de ensayos de coimmunoprecipitación. A modo preliminar, realizamos un ensayo de inmunoprecipitación de la proteína PSD-95 en sinaptosomas de HPCd de sujetos pre-expuestos y no pre-expuestos al contexto, y estudiamos la relación entre la expresión de esta proteína con Cdk5. En la sección 3 se encuentra este resultado preliminar, en donde observamos que la relación Cdk5/PSD-95 es mayor en los sujetos no pre-expuestos en comparación con los sujetos pre-expuestos, lo que nos sugiere que podría existir una relación indirecta, e inversa, entre Cdk5 y NR2B, a través de PSD-95, en el proceso de adquisición de aprendizaje contextual, con respecto a su participación y contribución, mediante su localización subcelular, lo cual fue propuesto como hipótesis de esta tesis.

Entre los mecanismos que proponen a Cdk5 como proteína que participa en la regulación de la transmisión sináptica a través de la interacción con los NMDAr, existe sólo una evidencia que la vincula con la subunidad NR2A. Esta relación se evaluó *in vitro* y en células intactas, e indica que Cdk5 fosforila directamente NR2A en la serina 1232. Esta fosforilación se revierte por acción de Roscovitina (inhibidor selectivo de Cdk5) y bloquea la inducción de LTP y las corrientes eléctricas evocadas por NMDA en neuronas hipocámpales de CA1 de rata (Li et al., 2001). Por otra parte, la literatura demuestra que existen múltiples formas de interacción entre Cdk5 y la subunidad

NR2B en mecanismos relacionados a la plasticidad sináptica y al aprendizaje (Morabito et al., 2004; Hawasli et al., 2007; Zhang et al., 2008a). Si bien la acción de Cdk5 sobre esta subunidad es indirecta, ya que la subunidad NR2B no posee sitio de fosforilación para Cdk5, su interacción se realiza a través de la proteína PSD-95 (Bianchetta et al., 2012), como se describió anteriormente, e interrumpiendo la interacción entre PSD-95 y NR2B, que, al no estar unida a PSD-95, se internaliza (Lavezzari et al., 2003). Nuestro resultado preliminar apoya a esta corriente de evidencias, concluyendo que en procesos de adquisición de aprendizaje NR2B es requerido (Figs.22ay 23a) y, por ende, la relación entre PSD-95 y Cdk5 no se encuentra favorecida (Fig.24).

#### **6.4 Plasticidad sináptica estructural en respuesta al FCPC.**

Los cambios en la estructura sináptica que ocurren por actividad neuronal son el mecanismo propuesto como base del aprendizaje y la memoria. Las espinas dendríticas, que son protrusiones especializadas que conforman los sitios para los contactos sinápticos excitatorios, pueden atravesar cambios en su tamaño, forma y número en respuesta a la actividad. La densidad de espinas dendríticas es un buen indicador del número de sinapsis excitatorias presentes en el HPC (Mahmmoud et al., 2015). Debido a que el efecto del aprendizaje contextual produce cambios que se mantienen en el tiempo, las dinámicas de las sinapsis hipocámpales acompañan a este proceso. Se ha establecido que las modificaciones en las sinapsis en el HPC en respuesta al entrenamiento en paradigmas de aprendizaje contextual, son un mecanismo que se desencadena en las fases finales del LTP y está mediado por la acción de los NMDAR (Matsuzaki, 2007). En el HPC, durante el procesamiento de la información de contexto en la adquisición del aprendizaje, las neuronas de CA1 del hipocampo juegan un papel crucial integrando la entrada sináptica excitatoria de CA3 y la corteza entorrinal. Estas neuronas reciben inervaciones casi exclusivamente en las espinas dendríticas. La formación y la eliminación (plasticidad estructural) de las espinas dendríticas, reflejan cambios directos de la actividad de la estructura hipocámpal, en respuesta a la experiencia (Chen et al., 2014; Müller et al., 2013; Cravens et al., 2006; Morris, 2013).

Como ya se describió, las espinas dendríticas representan la plataforma estructural para los contactos sinápticos excitatorios entre neuronas (Chapleau et al., 2008), con la creciente evidencia que sugiere que la remodelación sináptica acompaña a la formación de la memoria contextual (Restivo et al., 2009). De acuerdo a este punto de vista, la codificación de una representación contextual novedosa, podría resultar en una rápida reorganización sináptica a través de un aumento en la densidad de espinas dendríticas, particularmente en el HPC pero también en otras áreas como la corteza cingular y entorrinal (Vetere et al., 2011), lo cual ha sido observado a través de ciertos paradigmas de memoria, incluyendo los paradigmas de memoria de miedo contextual, bajo condiciones especiales de entrenamiento (Leuner et al., 2003; Restivo et al., 2009; Vetere et al., 2011).

Por otra parte, estudios recientes han demostrado que las espinas dendríticas son notablemente estables en la vida adulta (Yang et al., 2009a). Por lo tanto, las conexiones sinápticas no sólo son capaces de experimentar cambios rápidos en respuesta a nuevas experiencias, sino que también pueden servir como sustratos para el almacenamiento de información a largo plazo. Sin embargo, sigue siendo desconocido cómo y en qué medida las sinapsis se pueden reorganizar durante el aprendizaje y cómo dicha reorganización se transforma en recuerdos estables a largo plazo. De este modo, se considera que las espinas maduras de gran tamaño se mantienen estables por períodos prolongados de tiempo, expresan mayor cantidad de AMPAr, mientras que espinas pequeñas pueden modificar su estructura dinámicamente. Así, algunos autores sugieren que las espinas actúan como unidades de memoria, siendo las espinas mayores las que representan a las trazas físicas de memorias a largo plazo, y han encontrado que las mismas son resistentes al LTP, que es crítico para la incorporación de nueva información, asumiendo que las espinas mayores y maduras protegen a través de este mecanismo, que ocurran nuevos eventos de potenciación (Yang et al., 2009a; Kasai et al., 2003, 2010).

Como última pregunta de esta tesis, se buscó evaluar si los factores de pre-exposición y condicionamiento presentes en el esquema de FCPC, se asocian con diferencias en la densidad y/o morfología de las espinas dendríticas, debido a que las mismas se consideran estructuras extremadamente plásticas en respuesta a la

experiencia, cuya dinámica se ve afectada especialmente por la acción de los NMDAr, los cuales están implicados, tal como vimos en las series experimentales antes descritas (series experimentales 2 y 3) en la adquisición del aprendizaje contextual.

Investigamos en esta sección de la tesis acerca de la plasticidad estructural de dendritas apicales de neuronas piramidales de CA1 en cortes de HPCd. Este abordaje, se realizó solo en sujetos de un solo rango etario y utilizando un modelo animal de ratón transgénico que nos permitió observar detalladamente a estas pequeñas estructuras, debido a la expresión de fluorescencia intrínseca marcadas en bajo porcentaje de neuronas del SNC, incluyendo neuronas piramidales del HPCd, por la modificación genética de los ratones utilizados bajo la expresión de la proteína GFP por el promotor Thy-1.

En este modelo, ratones Thy1-GFP, fueron primero entrenados en el FCPC con la intención de replicar los resultados de la serie experimental 1. Así, los efectos principales del paradigma pudieron ser detectados. Se encontraron diferencias significativas en variables sensibles al condicionamiento tales como defecación y diferencias en la exploración vertical, y otras respuestas al entrenamiento específicamente en respuesta al tratamiento de pre-exposición, y a la interacción entre ambos factores, como el congelamiento.

Luego del entrenamiento se evaluó la densidad de espinas, la cual arrojó un resultado que reflejó un aumento en las mismas en neuronas piramidales de CA1, específicamente en respuesta a la exposición a un contexto novedoso, independientemente del condicionamiento recibido, lo que se correlaciona con lo obtenido en la serie experimental 3, donde obtuvimos que la pre-exposición a un contexto novedoso desencadena una dinámica de los NMDAr, lo que fue específicamente detectado a través de la expresión temporal de NR2B activo (NR2BY1472). La espinogénesis obtenida se corresponde a lo encontrado en otros modelos de aprendizaje de contexto como el Radial Arm Maze (RAM) (Mahmmoud et al., 2015) o el Morris Water Maze (MWM), ampliamente utilizado en el campo del aprendizaje de contexto (Fonseca et al., 2004).

Por otra parte, el análisis de la morfología de las espinas dendríticas en sujetos de las diferentes condiciones experimentales a las que fueron sometidos durante el FCPC, reveló que en la condición de pre-exposición, independientemente del tratamiento de condicionamiento, se observa que las nuevas espinas formadas son del tipo filopódicas (nuevas, dinámicas). Estos resultados están en sintonía con la hipótesis de que las espinas inmaduras son más plásticas a experimentar cambios que sustentan el aprendizaje contextual, en relación a las espinas inmaduras, más resistentes (Yang et al., 2009a). Así, las fluctuaciones intrínsecas en el volumen de las sinapsis pueden explicar el mantenimiento de las espinas durante largos períodos de tiempo, así como también la plasticidad rápida, desencadenada por la actividad puede relacionarse con procesos cognitivos dinámicos. Estas premisas atribuyen a las espinas como estructuras celulares con importantes implicancias en el aprendizaje y la memoria.

Estos resultados cierran la idea general de esta tesis de relacionar eventos específicos de aprendizaje contextual, con cambios estructurales secundarios al mismo. Por otro lado, abre la posibilidad de pensar en modelos que evalúen estos fenómenos en la ontogenia, ya que, en esta tesis, hemos contribuido con hallazgos que nos permitirían pensar que, a edades tempranas, el aprendizaje contextual existe y se puede detectar ya que se manifiesta con certeza en variables específicas y se correlaciona con los mecanismos que ocurren en edades adultas. Más aún, son mecanismos que, por asumirse inexistentes, no han sido explorados a nivel orgánico, por lo que mucho hay aún por aportar en este campo.

Como resumen, esta tesis aporta con la siguiente información al campo de la  
Psiconeurobiología del desarrollo:

- (1) La *incorporación de variables que reflejen el etograma exhaustivo de comportamiento* en el análisis de la ontogenia del aprendizaje contextual, nos permitió detectar evidencias de este aprendizaje en animales pre-destetados, en donde se postula, a partir del modelo neuro-maduracional, que el aprendizaje de este tipo es independiente de contexto.

- (2) Estas incorporaciones nos permitieron, a su vez, en sujetos destetados, detectar evidencias de condicionamiento al utilizar variables que reflejan mayor sensibilidad, así como efectos de condicionamiento en grupos experimentales sin evidencias previas en el contexto y a *intensidades de descarga eléctrica menores* que las generalmente utilizadas, lo que sería interesante aplicar como parámetro en futuros estudios para mejorar condiciones de bienestar animal.
- (3) Estos resultados se asociaron con la *implicancia de mecanismos mediados por los NMDAr en ambas edades*, y se evidenció, a través de estudios farmacológicos y bioquímicos, que los sujetos pre-destetados (PN17) son capaces de procesar la información contextual compartiendo características, a este nivel, con animales mayores a quienes se le atribuyen funciones superiores de procesamiento de información por haber logrado un desarrollo y maduración de los sistemas evaluados y comparados en este trabajo.
- (4) Describimos además, un mecanismo temporal en donde se manifiesta la dinámica de proteínas que participan en la plasticidad sináptica, específicamente, de la subunidad NR2B de los NMDAr, en su sitio fosforilado NR2BY1472, determinando la composición de los NMDAr y de este modo su función.
- (5) En ratones THy1-GFP pudimos replicar algunos de los fenómenos observados en el FCPC en nuevas variables sensibles de condicionamiento, así como también encontrar el efecto de facilitación descrito para este paradigma.
- (6) En los mismos, pudimos asociar el entrenamiento realizado con un aumento en la densidad de espinas dendríticas que subyacen a la plasticidad estructural, y que se encuentran íntimamente relacionadas a mecanismos inducidos por NMDAr.



# 7

## Bibliografía

- Aarts, MM, Tymianski, M. 2004. Molecular mechanisms underlying specificity of excitotoxic signaling in neurons. *Curr. Mol. Med.* 4: 137-47.
- Aguado, L. 2003. Neuroscience of Pavlovian conditioning: a brief review. *Span. J. Psychol.* 6: 155-67.
- Ainge, JA, Langston, RF. 2012. Ontogeny of neural circuits underlying spatial memory in the rat. *Front. Neural Circuits* 6: 8.
- Albani, SH, McHail, DG, Dumas, TC. 2014. Developmental studies of the hippocampus and hippocampal-dependent behaviors: Insights from interdisciplinary studies and tips for new investigators. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 43: 183-190.
- Allison, DW, Gelfand, VI, Spector, I, Craig, AM. 1998. Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. *J. Neurosci.* 18: 2423-36.
- Andersen, P. Inhibitory circuits in the thalamus and hippocampus--an appraisal after 40 years. *Prog. Neurobiol.* 78: 264-71.
- Angelo, M, Plattner, F, Giese, KP. 2006. Cyclin-dependent kinase 5 in synaptic plasticity, learning and memory. *J. Neurochem.* 99: 353-70.
- Baez, MV, Oberholzer, MV, Cercato, MC, Snitcofsky, M, Aguirre, AI, Jerusalinsky, DA. 2013. NMDA Receptor Subunits in the Adult Rat Hippocampus Undergo Similar Changes after 5 Minutes in an Open Field and after LTP Induction. *PLoS One* 8.
- Bannerman, DM, Rawlins, JNP, McHugh, SB, Deacon, RMJ, Yee, BK, Bast, T, Zhang, W-N, Pothuizen, HHJ, Feldon, J. 2004. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28: 273-83.
- Bard, L, Groc, L. 2011. Glutamate receptor dynamics and protein interaction: Lessons from the NMDA receptor. *Mol. Cell. Neurosci.* 48: 298-307.

- Barria, A, Malinow, R. 2005. NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron* 48: 289-301.
- Barrientos, RM, Higgins, EA, Sprunger, DB, Watkins, LR, Rudy, JW, Maier, SF. 2002. Memory for context is impaired by injecting anisomycin into dorsal hippocampus following context exploration. *Behav. Brain Res.* 134: 299-306.
- Bast, T, Zhang, WN, Feldon, J. 2003. Dorsal hippocampus and classical fear conditioning to tone and context in rats: Effects of local NMDA-receptor blockade and stimulation. *Hippocampus* 13: 657-675.
- Bayley, PJ, Gold, JJ, Hopkins, RO, Squire, LR. 2005. The neuroanatomy of remote memory. *Neuron* 46: 799-810.
- Bednarek, E, Caroni, P. 2011.  $\beta$ -Adducin is required for stable assembly of new synapses and improved memory upon environmental enrichment. *Neuron* 69: 1132-46.
- Berberich, S, Jensen, V, Hvalby,  $\emptyset$ , Seeburg, PH, Köhr, G. 2007. The role of NMDAR subtypes and charge transfer during hippocampal LTP induction. *Neuropharmacology* 52: 77-86.
- Berberich, S, Punnakkal, P, Jensen, V, Pawlak, V, Seeburg, PH, Hvalby,  $\emptyset$ . 2005a. Lack of NMDA Receptor Subtype Selectivity for Hippocampal Long-Term Potentiation. *Nat. Rev. Neurosci.* 25: 6907- 6910.
- Berberich, S, Punnakkal, P, Jensen, V, Pawlak, V, Seeburg, PH, Hvalby,  $\emptyset$ , Köhr, G. 2005b. Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* 25: 6907-10.
- Bevins, R a, McPhee, JE, Rauhut, a S, Ayres, JJ. 1997. Converging evidence for one-trial context fear conditioning with an immediate shock: importance of shock potency. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* 23: 312-324.
- Bevins, R a., Ayres, JJB. 1995. One-trial context fear conditioning as a function of the interstimulus interval. *Anim. Learn. Behav.* 23: 400-410.
- Bevins, RA, Ayres, JJB. 1994. A deficit in one-trial context fear conditioning is not due to opioid analgesia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49: 183-186.
- Bianchetta, MJ, Lam, TT, Jones, SN, Morabito, MA. 2012. Cdk5 regulates PSD-95 ubiquitination in neurons. *J Neurosci* 31: 12029-12035.
- Blair, HT, Wu, A, Cong, J. 2014. Oscillatory neurocomputing with ring attractors: a network architecture for mapping locations in space onto patterns of neural synchrony. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369: 20120526.
- Blanpied, TA, Scott, DB, Ehlers, MD. 2002. Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron* 36: 435-49.
- Von Bohlen und Halbach, O. 2009. Structure and function of dendritic spines within the hippocampus. *Ann. Anat.* 191: 518-531.
- Bourne, J, Harris, KM. 2007. Do thin spines learn to be mushroom spines that

- remember? *Curr. Opin. Neurobiol.* 17: 381-6.
- Bourne, JN, Harris, KM. 2008. Balancing Structure and Function at Hippocampal Dendritic Spines. *Annu Rev Neurosci* 31: 47-67.
- Brasser, SM, Spear, NE. 1998. A sensory-enhanced context facilitates learning and multiple measures of unconditioned stimulus processing in the preweanling rat. *Behav. Neurosci.* 112: 126-40.
- Brasser, SM, Spear, NE. 2004. Contextual conditioning in infants, but not older animals, is facilitated by CS conditioning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 81: 46-59.
- Brigman, JL, Wright, T, Talani, G, Prasad-Mulcare, S, Jinde, S, Seabold, GK, Mathur, P, Davis, MI, Bock, R, Gustin, RM, Colbran, RJ, Alvarez, V a, Nakazawa, K, Delpire, E, Lovinger, DM, Holmes, A. 2010. Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning. *J. Neurosci.* 30: 4590-600.
- Burgess, N, O'Keefe, J. 1996. Cognitive graphs, resistive grids, and the hippocampal representation of space. *J. Gen. Physiol.* 107: 659-62.
- Burman, M a, Murawski, NJ, Schiffino, FL, Rosen, JB, Stanton, ME. 2009. Factors governing single-trial contextual fear conditioning in the weanling rat. *Behav. Neurosci.* 123: 1148-1152.
- Burwell, RD, Saddoris, MP, Bucci, DJ, Wiig, KA. 2004. Corticohippocampal contributions to spatial and contextual learning. *J. Neurosci.* 24: 3826-36.
- De Camilli, P, Harris, SM, Huttner, WB, Greengard, P. 1983. Synapsin I (Protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. II. Its specific association with synaptic vesicles demonstrated by immunocytochemistry in agarose-embedded synaptosomes. *J. Cell Biol.* 96: 1355-73.
- Campbell, RA, Raskin, LA. 1978. Ontogeny of behavioral arousal: the role of environmental stimuli. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 92: 176-84.
- Canteras, NS, Swanson, LW. 1992. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 324: 180-94.
- Carlisle, HJ, Kennedy, MB. 2005. Spine architecture and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 28: 182-7.
- Caroni, P, Donato, F, Muller, D. 2012. Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nat. Rev. Neurosci.* 13: 478-490.
- Cercato, MC, Coletti, N, Snitcowsky, M, Aguirre, AI, Kornisiuk, EE, Baez, M V., Jerusalinsky, DA. 2014. Hippocampal NMDA receptors and the previous experience effect on memory. *J. Physiol. Paris* 108: 263-269.
- Chadman, KK, Watson, DJ, Stanton, ME. 2006. NMDA receptor antagonism impairs reversal learning in developing rats. *Behav. Neurosci.* 120: 1071-83.
- Chang, CH, Knapska, E, Orsini, CA, Rabinak, CA, Zimmerman, JM, Maren, S. 2009. Fear

- extinction in rodents. *Curr. Protoc. Neurosci.*
- Chapleau, CA, Carlo, ME, Larimore, JL, Pozzo-Miller, L. 2008. The actions of BDNF on dendritic spine density and morphology in organotypic slice cultures depend on the presence of serum in culture media. *J. Neurosci. Methods* 169: 182-90.
- Chen, B-S, Roche, KW. 2007. Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology* 53: 362-8.
- Chen, L, Chetkovich, DM, Petralia, RS, Sweeney, NT, Kawasaki, Y, Wenthold, RJ, Brecht, DS, Nicoll, RA. Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408: 936-43.
- Chen, Y, Chen, AQ, Luo, XQ, Guo, LX, Tang, Y, Bao, CJ, Lin, L, Lin, C. 2014. Hippocampal NR2B-containing NMDA receptors enhance long-term potentiation in rats with chronic visceral pain. *Brain Res.* 1570: 43-53.
- Cheung, HH, Teves, L, Wallace, MC, Gurd, JW. 2003. Inhibition of protein kinase C reduces ischemia-induced tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Neurochem.* 86: 1441-1449.
- Chotro, MG, Alonso, G. 2003. Stimulus preexposure reduces generalization of conditioned taste aversions between alcohol and non-alcohol flavors in infant rats. *Behav. Neurosci.* 117: 113-22.
- Clayton, DA, Mesches, MH, Alvarez, E, Bickford, PC, Browning, MD. 2002. A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *J. Neurosci.* 22: 3628-37.
- Coan, EJ, Saywood, W, Collingridge, GL. 1987. MK-801 blocks NMDA receptor-mediated synaptic transmission and long term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 80: 111-4.
- Colgin, LL, Moser, EI, Moser, M-B. 2008. Understanding memory through hippocampal remapping. *Trends Neurosci.* 31: 469-77.
- Collingridge, G. Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. *Nature* 330: 604-5.
- Collingridge, GL, Singer, W. 1990. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 290-6.
- Collingridge, GL, Volianskis, A, Bannister, N, France, G, Hanna, L, Mercier, M, Tidball, P, Fang, G, Irvine, MW, Costa, BM, Monaghan, DT, Bortolotto, ZA, Molnar, E, Lodge, D, Jane, DE. 2013a. The NMDA receptor as a target for cognitive enhancement. *Neuropharmacology* 64: 13-26.
- Collingridge, GL, Volianskis, A, Bannister, N, France, G, Hanna, L, Mercier, M, Tidball, P, Fang, G, Irvine, MW, Costa, BM, Monaghan, DT, Bortolotto, ZA, Molnár, E, Lodge, D, Jane, DE. 2013b. The NMDA receptor as a target for cognitive enhancement. *Neuropharmacology* 64: 13-26.
- Contestabile, A. 2000. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res. Rev.* 32: 476-509.

- Cooney, JR, Hurlburt, JL, Selig, DK, Harris, KM, Fiala, JC. 2002. Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *J. Neurosci.* 22: 2215-24.
- Corcoran, K a, Maren, S. 2001. Hippocampal inactivation disrupts contextual retrieval of fear memory after extinction. *J. Neurosci.* 21: 1720-1726.
- Cravens, CJ, Vargas-Pinto, N, Christian, KM, Nakazawa, K. 2006. CA3 NMDA receptors are crucial for rapid and automatic representation of context memory. *Eur. J. Neurosci.* 24: 1771-1780.
- Cull-Candy, SG, Leszkiewicz, DN. 2004. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci. STKE* 2004: re16.
- Dhavan, R, Tsai, LH. 2001. A decade of CDK5. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 749-759.
- Dingledine, R, Borges, K, Bowie, D, Traynelis, SF. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51: 7-61.
- Dumas, TC. 2005. Developmental regulation of cognitive abilities: Modified composition of a molecular switch turns on associative learning. *Prog. Neurobiol.* 76: 189-211.
- Esmorís-Arranz, FJ, Méndez, C, Spear, NE. 2008. Contextual fear conditioning differs for infant, adolescent, and adult rats. *Behav. Processes* 78: 340-350.
- Fanselow, MS. 2000. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav. Brain Res.* 110: 73-81.
- Fanselow, MS. 1994. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychon. Bull. Rev.* 1: 429-438.
- Fanselow, MS, Dong, HW. 2010. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron* 65: 7-19.
- Fanselow, MS, LeDoux, JE. 1999. Why we think plasticity underlying pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron* 23: 229-232.
- Fanselow, MS, Poulos, AM. 2005. The neuroscience of mammalian associative learning. *Annu. Rev. Psychol.* 56: 207-234.
- Fendt, M, Fanselow, MS, Koch, M. 2005. Lesions of the dorsal hippocampus block trace fear conditioned potentiation of startle. *Behav. Neurosci.* 119: 834-838.
- Feng, G, Mellor, RH, Bernstein, M, Keller-Peck, C, Nguyen, QT, Wallace, M, Nerbonne, JM, Lichtman, JW, Sanes, JR. 2000. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28: 41-51.
- Fernández-Monreal, M, Brown, TC, Royo, M, Esteban, JA. 2012. The balance between receptor recycling and trafficking toward lysosomes determines synaptic strength during long-term depression. *J. Neurosci.* 32: 13200-5.
- Figueredo, LZP, Moreira, KM, Ferreira, TL, Fornari, RV, Oliveira, MGM. 2008. Interaction between glutamatergic-NMDA and cholinergic-muscarinic systems in classical fear conditioning. *Brain Res. Bull.* 77: 71-76.

- Fischer, A, Sananbenesi, F, Schrick, C, Spiess, J, Radulovic, J. 2002. Cyclin-dependent kinase 5 is required for associative learning. *J. Neurosci.* 22: 3700-3707.
- Fischer, A, Sananbenesi, F, Schrick, C, Spiess, J, Radulovic, J. 2003. Regulation of contextual fear conditioning by baseline and inducible septo-hippocampal cyclin-dependent kinase 5. *Neuropharmacology* 44: 1089-1099.
- Fischer, L, Poeckel, D, Buerkert, E, Steinhilber, D, Werz, O. 2005. Inhibitors of actin polymerisation stimulate arachidonic acid release and 5-lipoxygenase activation by upregulation of Ca<sup>2+</sup> mobilisation in polymorphonuclear leukocytes involving Src family kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1736: 109-19.
- Fischer, M, Kaech, S, Wagner, U, Brinkhaus, H, Matus, A. 2000. Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nat. Neurosci.* 3: 887-94.
- Fonseca, R, Nägerl, UV, Morris, RGM, Bonhoeffer, T. 2004. Competing for memory: hippocampal LTP under regimes of reduced protein synthesis. *Neuron* 44: 1011-20.
- Foster, J a, Burman, M a. 2010. Evidence for hippocampus-dependent contextual learning at postnatal day 17 in the rat. *Learn. Mem.* 17: 259-266.
- Fu, M, Yu, X, Lu, J, Zuo, Y. 2012. Repetitive motor learning induces coordinated formation of clustered dendritic spines in vivo. *Nature* 483: 92-5.
- Fyhn, M, Hafting, T, Witter, MP, Moser, EI, Moser, M-B. 2008. Grid cells in mice. *Hippocampus* 18: 1230-8.
- Gale, GD, Anagnostaras, SG, Godsil, BP, Mitchell, S, Nozawa, T, Sage, JR, Wiltgen, B, Fanselow, MS. 2004. Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. *J. Neurosci.* 24: 3810-5.
- García-López, P, García-Marín, V, Freire, M. 2007. The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience. *Prog. Neurobiol.* 83: 110-30.
- Gardoni, F, Marcello, E, Di Luca, M. 2009a. Postsynaptic density-membrane associated guanylate kinase proteins (PSD-MAGUKs) and their role in CNS disorders. *Neuroscience* 158: 324-33.
- Gardoni, F, Mauceri, D, Malinverno, M, Polli, F, Costa, C, Tozzi, A, Siliquini, S, Picconi, B, Cattabeni, F, Calabresi, P, Di Luca, M. 2009b. Decreased NR2B subunit synaptic levels cause impaired long-term potentiation but not long-term depression. *J. Neurosci.* 29: 669-77.
- Gilmartin, MR, Helmstetter, FJ. 2010. Trace and contextual fear conditioning require neural activity and NMDA receptor-dependent transmission in the medial prefrontal cortex. *Learn. Mem.* 17: 289-96.
- Golden, SA, Russo, SJ. 2012. Mechanisms of psychostimulant-induced structural plasticity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2.
- Griesbach, GS, Amsel, A. 1998. Immediate and long-term effects of neonatal MK-801 treatment on nonspatial learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 11435-9.

- Groc, L, Heine, M, Cousins, SL, Stephenson, FA, Lounis, B, Cognet, L, Choquet, D. 2006. NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 18769-74.
- van Groen, T, Wyss, JM. 1990. Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J. Comp. Neurol.* 302: 515-28.
- Gruart, A, Leal-Campanario, R, López-Ramos, JC, Delgado-García, JM. 2015. Functional basis of associative learning and their relationships with long-term potentiation evoked in the involved neural circuits: Lessons from studies in behaving mammals. *Neurobiol. Learn. Mem.* 124: 3-18.
- Gungabissoon, RA, Bamberg, JR. 2003. Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/cofilin. *J. Histochem. Cytochem.* 51: 411-20.
- Hafting, T, Fyhn, M, Bonnevie, T, Moser, M-B, Moser, EI. 2008. Hippocampus-independent phase precession in entorhinal grid cells. *Nature* 453: 1248-52.
- Halpain, S. 2006. They're plastic, but they recycle. *Neuron* 52: 746-8.
- Hanley, JG. 2014. Subunit-specific trafficking mechanisms regulating the synaptic expression of Ca(2+)-permeable AMPA receptors. *Semin. Cell Dev. Biol.* 27: 14-22.
- Hanley, JG, Henley, JM. 2005. PICK1 is a calcium-sensor for NMDA-induced AMPA receptor trafficking. *EMBO J.* 24: 3266-78.
- Hansen, KB, Furukawa, H, Traynelis, SF. 2010. Control of assembly and function of glutamate receptors by the amino-terminal domain. *Mol. Pharmacol.* 78: 535-49.
- Harris, KM, Jensen, FE, Tsao, B. 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J. Neurosci.* 12: 2685-705.
- Harris, M. 1992. Three-Dimensional Structure of Dendritic Spines and Synapses Rat Hippocampus ( CA1 ) at Postnatal Day 15 and Adult Ages : Implications for the Maturation of Synaptic Physiology and Long-term Potentiation. 12: 2685-2705.
- Harvey, CD, Yasuda, R, Zhong, H, Svoboda, K. 2008. The spread of Ras activity triggered by activation of a single dendritic spine. *Science* 321: 136-40.
- Hattori, K, Uchino, S, Isosaka, T, Maekawa, M, Iyo, M, Sato, T, Kohsaka, S, Yagi, T, Yuasa, S. 2006. Fyn is required for haloperidol-induced catalepsy in mice. *J. Biol. Chem.* 281: 7129-7135.
- Hawasli, AH, Benavides, DR, Nguyen, C, Kansy, JW, Hayashi, K, Chambon, P, Greengard, P, Powell, CM, Cooper, DC, Bibb, JA. 2007. Cyclin-dependent kinase 5 governs learning and synaptic plasticity via control of NMDAR degradation. *Nat. Neurosci.* 10: 880-6.
- Hawasli, AH, Bibb, JA. 2007. Alternative roles for Cdk5 in learning and synaptic plasticity. *Biotechnol. J.* 2: 941-948.

- Hawasli, AH, Koovakkattu, D, Hayashi, K, Anderson, AE, Powell, CM, Sinton, CM, Bibb, JA, Cooper, DC. 2009. Regulation of hippocampal and behavioral excitability by cyclin-dependent kinase 5. *PLoS One* 4.
- Henson, MA, Roberts, AC, Pérez-Otaño, I, Philpot, BD. 2010. Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog. Neurobiol.* 91: 23-37.
- Heroux, NA, Robinson-Drummer, PA, Rosen, JB, Stanton, ME. 2016. NMDA receptor antagonism disrupts acquisition and retention of the context preexposure facilitation effect in adolescent rats. *Behav. Brain Res.* 301: 168-77.
- Highfield, DA, Nixon, K, Amsel, A. 1996. The NMDA antagonist MK-801 affects nonspatial learning in preweanling rats. *Behav. Neurosci.* 110: 300-4.
- Holson, RR, Pearce, B. Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol. Teratol.* 14: 221-8.
- Holtmaat, AJGD, Trachtenberg, JT, Wilbrecht, L, Shepherd, GM, Zhang, X, Knott, GW, Svoboda, K. 2005. Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron* 45: 279-91.
- Honkura, N, Matsuzaki, M, Noguchi, J, Ellis-Davies, GCR, Kasai, H. 2008. The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron* 57: 719-29.
- Horton, AC, Ehlers, MD. 2004. Secretory trafficking in neuronal dendrites. *Nat. Cell Biol.* 6: 585-91.
- De Houwer, J, Barnes-Holmes, D, Moors, A. 2013. What is learning? On the nature and merits of a functional definition of learning. *Psychon. Bull. Rev.* 20: 631-42.
- Hunt, PS, Fanselow, MS, Richardson, R, Mauk, MD, Freeman, JH, Stanton, ME. 2007. Synapses, circuits, and the ontogeny of learning. *Dev. Psychobiol.* 49: 649-63.
- Isosaka, T, Hattori, K, Kida, S, Kohno, T, Nakazawa, T, Yamamoto, T, Yagi, T, Yuasa, S. 2008. Activation of Fyn tyrosine kinase in the mouse dorsal hippocampus is essential for contextual fear conditioning. *Eur. J. Neurosci.* 28: 973-981.
- Isosaka, T, Hattori, K, Yagi, T. 2006. NMDA-receptor proteins are upregulated in the hippocampus of postnatal heterozygous reeler mice. *Brain Res.* 1073-1074: 11-19.
- Jablonski, SA, Schiffino, FL, Stanton, ME. 2012. Role of age, post-training consolidation, and conjunctive associations in the ontogeny of the context preexposure facilitation effect. *Dev. Psychobiol.* 54: 714-22.
- Ji, J, Maren, S. 2005. Electrolytic lesions of the dorsal hippocampus disrupt renewal of conditional fear after extinction. *Learn. Mem.* 12: 270-276.
- Kasai, H, Fukuda, M, Watanabe, S, Hayashi-Takagi, A, Noguchi, J. 2010. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci.* 33: 121-129.
- Kasai, H, Matsuzaki, M, Noguchi, J, Yasumatsu, N, Nakahara, H. 2003. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.* 26: 360-368.



- Kim, E, Sheng, M. 2004. PDZ domain proteins of synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 771-81.
- Kim, J, Jung, S-C, Clemens, AM, Petralia, RS, Hoffman, DA. 2007. Regulation of dendritic excitability by activity-dependent trafficking of the A-type K<sup>+</sup> channel subunit Kv4.2 in hippocampal neurons. *Neuron* 54: 933-47.
- Kim, JJ, Fanselow, MS. 1992. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* (80-). 256: 675-677.
- Kim, JJ, Jung, MW. 2006. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30: 188-202.
- Kolb, B, Whishaw, IQ. 1998. Brain plasticity and behavior. *Annu. Rev. Psychol.* 49: 43-64.
- Komiyama, NH, Watabe, AM, Carlisle, HJ, Porter, K, Charlesworth, P, Monti, J, Strathdee, DJC, O'Carroll, CM, Martin, SJ, Morris, RGM, O'Dell, TJ, Grant, SGN. 2002. SynGAP regulates ERK/MAPK signaling, synaptic plasticity, and learning in the complex with postsynaptic density 95 and NMDA receptor. *J. Neurosci.* 22: 9721-32.
- Kornau, HC, Schenker, LT, Kennedy, MB, Seeburg, PH. 1995. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269: 1737-40.
- Korobova, F, Svitkina, T. 2010. Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* 21: 165-76.
- Kourrich, S, Glasgow, SD, Caruana, DA, Chapman, CA. 2008. Postsynaptic signals mediating induction of long-term synaptic depression in the entorhinal cortex. *Neural Plast.* 2008: 840374.
- Kovacic, P, Somanathan, R. 2010. Clinical physiology and mechanism of dizocilpine (MK-801): electron transfer, radicals, redox metabolites and bioactivity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 3: 13-22.
- Kraemer, PJ, Brown, RW, Randall, CK. 1995. Signal intensity and duration estimation in rats. *Behav. Processes* 34: 265-8.
- Lai, CSW, Franke, TF, Gan, W-B. 2012a. Opposite effects of fear conditioning and extinction on dendritic spine remodeling. *Nature* 483: 87-91.
- Lai, K-O, Wong, ASL, Cheung, M-C, Xu, P, Liang, Z, Lok, K-C, Xie, H, Palko, ME, Yung, W-H, Tessarollo, L, Cheung, ZH, Ip, NY. 2012b. TrkB phosphorylation by Cdk5 is required for activity-dependent structural plasticity and spatial memory. *Nat. Neurosci.* 15: 1506-15.
- Landeira-Fernandez, J, DeCola, JP, Kim, JJ, Fanselow, MS. 2006. Immediate shock deficit in fear conditioning: effects of shock manipulations. *Behav. Neurosci.* 120: 873-879.
- Langston, RF, Ainge, JA, Couey, JJ, Canto, CB, Bjerknes, TL, Witter, MP, Moser, EI,

- Moser, M-B. 2010. Development of the spatial representation system in the rat. *Science* 328: 1576-1580.
- Lau, CG, Zukin, RS. 2007. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 8: 413-26.
- Lavezzari, G, McCallum, J, Lee, R, Roche, KW. 2003. Differential binding of the AP-2 adaptor complex and PSD-95 to the C-terminus of the NMDA receptor subunit NR2B regulates surface expression. *Neuropharmacology* 45: 729-37.
- Leuner, B, Falduto, J, Shors, TJ. 2003. Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J. Neurosci.* 23: 659-65.
- Li, BS, Sun, MK, Zhang, L, Takahashi, S, Ma, W, Vinade, L, Kulkarni, a B, Brady, RO, Pant, HC. 2001. Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 12742-12747.
- Lim, AL, Taylor, DA, Malone, DT. 2012. Consequences of early life MK-801 administration: Long-term behavioural effects and relevance to schizophrenia research. *Behav. Brain Res.* 227: 276-286.
- Lin, H, Huganir, R, Liao, D. 2004. Temporal dynamics of NMDA receptor-induced changes in spine morphology and AMPA receptor recruitment to spines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316: 501-11.
- Lisman, J, Schulman, H, Cline, H. 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 175-90.
- Liu, JL, Li, M, Dang, XR, Wang, ZH, Rao, ZR, Wu, SX, Li, YQ, Wang, W. 2009. A NMDA receptor antagonist, MK-801 impairs consolidating extinction of auditory conditioned fear responses in a Pavlovian model. *PLoS One* 4.
- Lourenco, SF, Addy, D, Huttenlocher, J. 2009. Location representation in enclosed spaces: what types of information afford young children an advantage? *J. Exp. Child Psychol.* 104: 313-25.
- Lu, W, Man, H, Ju, W, Trimble, WS, MacDonald, JF, Wang, YT. 2001. Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 29: 243-54.
- Mahmmoud, RR, Sase, S, Aher, YD, Sase, A, Gröger, M, Mokhtar, M, Höger, H, Lubec, G. 2015. Spatial and Working Memory Is Linked to Spine Density and Mushroom Spines. *PLoS One* 10: e0139739.
- Maren, S. 2001. Neurobiology of Pavlovian. *Neuroscience*: 897-931.
- Maren, S, Aharonov, G, Fanselow, MS. 1997. Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav. Brain Res.* 88: 261-274.
- Maren, S, Phan, KL, Liberzon, I. 2013. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 14: 417-28.
- Maren, S, Quirk, GJ. 2004. Neuronal signalling of fear memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 5:

844-852.

- Martinez, LA, Klann, E, Tejada-Simon, M V. 2007. Translocation and activation of Rac in the hippocampus during associative contextual fear learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 88: 104-113.
- Matsuzaki, M. 2007. Factors critical for the plasticity of dendritic spines and memory storage. *Neurosci. Res.* 57: 1-9.
- Matsuzaki, M, Ellis-Davies, GC, Nemoto, T, Miyashita, Y, Iino, M, Kasai, H. 2001. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.* 4: 1086-92.
- Matus, A. 2000. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science* 290: 754-8.
- Matus-Amat, P, Higgins, E a, Sprunger, D, Wright-Hardesty, K, Rudy, JW. 2007. The role of dorsal hippocampus and basolateral amygdala NMDA receptors in the acquisition and retrieval of context and contextual fear memories. *Behav. Neurosci.* 121: 721-731.
- van der Meulen, JAJ, Bilbija, L, Joosten, RNJMA, de Bruin, JPC, Feenstra, MGP. 2003. The NMDA-receptor antagonist MK-801 selectively disrupts reversal learning in rats. *Neuroreport* 14: 2225-8.
- Migaud, M, Charlesworth, P, Dempster, M, Webster, LC, Watabe, AM, Makhinson, M, He, Y, Ramsay, MF, Morris, RG, Morrison, JH, O'Dell, TJ, Grant, SG. 1998. Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396: 433-9.
- Miller, M, Peters, A. 1981. Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *J. Comp. Neurol.* 203: 555-73.
- Morabito, MA, Sheng, M, Tsai, LH. 2004. Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates the N-terminal domain of the postsynaptic density protein PSD-95 in neurons. *J. Neurosci.* 24: 865-876.
- Mori, H, Mishina, M. 2003. Roles of diverse glutamate receptors in brain functions elucidated by subunit-specific and region-specific gene targeting. *Life Sci.* 74: 329-336.
- Morris, RGM. 2013. NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology* 74: 32-40.
- Morris, RGM, Davis, S, Butcher, SP. 1990. Hippocampal synaptic plasticity and NMDA receptors - A role in information storage. *Philos. Trans. R. Soc. London. Series B Biol. Sci.* 329: 187-204.
- Müller, L, Tokay, T, Porath, K, Köhling, R, Kirschstein, T. 2013. Enhanced NMDA receptor-dependent LTP in the epileptic CA1 area via upregulation of NR2B. *Neurobiol. Dis.* 54: 183-93.
- Murawski, NJ, Stanton, ME. 2011. Effects of dose and period of neonatal alcohol exposure on the context preexposure facilitation effect. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 35: 1160-1170.

- Nakazawa, K, McHugh, TJ, Wilson, M a, Tonegawa, S. 2004. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 361-372.
- Nakazawa, T, Komai, S, Tezuka, T, Hisatsune, C, Umemori, H, Semba, K, Mishina, M, Manabe, T, Yamamoto, T. 2001. Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR $\epsilon$ 2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* 276: 693-699.
- Neves, G, Cooke, SF, Bliss, TVP. 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat. Rev. Neurosci.* 9: 65-75.
- Newpher, TM, Ehlers, MD. 2009. Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. *Trends Cell Biol.* 19: 218-27.
- Nicholson-Dykstra, S, Higgs, HN, Harris, ES. 2005. Actin dynamics: growth from dendritic branches. *Curr. Biol.* 15: R346-57.
- Nimchinsky, EA, Sabatini, BL, Svoboda, K. 2002. Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol.* 64: 313-53.
- Nishida, H, Okabe, S. 2007. Direct astrocytic contacts regulate local maturation of dendritic spines. *J. Neurosci.* 27: 331-40.
- Noguchi, J, Matsuzaki, M, Ellis-Davies, GCR, Kasai, H. 2005. Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling in dendrites. *Neuron* 46: 609-22.
- Norman, D a, Ourense Biblioteca Cabaleiro Go, Sebastiãjn Gascã<sup>3</sup>n, MV, Amo, T. 2001. Aprendizaje y memoria. *Rev. Neurol. (Paris).* 32: 373-381.
- O'Keefe, J, Nadel, L, Willner, J. 1979. Tuning out irrelevancy? Comments on Solomon's temporal mapping view of the hippocampus. *Psychol. Bull.* 86: 1280-9.
- Oertner, TG, Matus, A. 2005. Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. *Cell Calcium* 37: 477-82.
- Oh-Nishi, A, Saji, M, Satoh, S-Z, Ogata, M, Suzuki, N. 2009. Late phase of long-term potentiation induced by co-application of N-methyl-d-aspartic acid and the antagonist of NR2B-containing N-methyl-d-aspartic acid receptors in rat hippocampus. *Neuroscience* 159: 127-35.
- Ohnishi, H, Murata, Y, Okazawa, H, Matozaki, T. 2011. Src family kinases: Modulators of neurotransmitter receptor function and behavior. *Trends Neurosci.* 34: 629-637.
- Ostroff, LE, Fiala, JC, Allwardt, B, Harris, KM. 2002. Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron* 35: 535-45.
- Pachernegg, S, Strutz-Seebohm, N, Hollmann, M. 2012. GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. *Trends Neurosci.* 35: 240-9.
- Paglini, G, Cáceres, A. 2001. The role of the Cdk5--p35 kinase in neuronal development.

- Eur. J. Biochem. 268: 1528-33.
- Paglini, G, Peris, L, Diez-Guerra, J, Quiroga, S, Cáceres, A. 2001. The Cdk5-p35 kinase associates with the Golgi apparatus and regulates membrane traffic. *EMBO Rep.* 2: 1139-44.
- 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.
- PAOLETTI, P, NEYTON, J. 2007. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7: 39-47.
- Park, J-S, Voitenko, N, Petralia, RS, Guan, X, Xu, J-T, Steinberg, JP, Takamiya, K, Sotnik, A, Kopach, O, Huganir, RL, Tao, Y-X. 2009. Persistent inflammation induces GluR2 internalization via NMDA receptor-triggered PKC activation in dorsal horn neurons. *J. Neurosci.* 29: 3206-19.
- Park, M, Penick, EC, Edwards, JG, Kauer, JA, Ehlers, MD. 2004. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science* 305: 1972-5.
- Park, M, Salgado, JM, Ostroff, L, Helton, TD, Robinson, CG, Harris, KM, Ehlers, MD. 2006. Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron* 52: 817-30.
- Pérez-Otaño, I, Ehlers, MD. Learning from NMDA receptor trafficking: clues to the development and maturation of glutamatergic synapses. *Neurosignals.* 13: 175-89.
- Peters, A, Kaiserman-Abramof, IR. 1969. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The synapses upon dendritic spines. *Zeitschrift für Zellforsch. und mikroskopische Anat. (Vienna, Austria 1948)* 100: 487-506.
- Petrini, EM, Ravasenga, T, Hausrat, TJ, Iurilli, G, Olcese, U, Racine, V, Sibarita, J-B, Jacob, TC, Moss, SJ, Benfenati, F, Medini, P, Kneussel, M, Barberis, A. 2014. Synaptic recruitment of gephyrin regulates surface GABAA receptor dynamics for the expression of inhibitory LTP. *Nat. Commun.* 5: 3921.
- Pigino, G, Paglini, G, Ulloa, L, Avila, J, Cáceres, A. 1997. Analysis of the expression, distribution and function of cyclin dependent kinase 5 (cdk5) in developing cerebellar macroneurons. *J. Cell Sci.* 110 ( Pt 2: 257-70.
- Pisano, M V., Ferreras, S, Krapacher, FA, Paglini, G, Arias, C. 2012. Re-examining the ontogeny of the context preexposure facilitation effect in the rat through multiple dependent variables. *Behav. Brain Res.* 233: 176-190.
- Ponnusamy, R, Poulos, AM, Fanselow, MS. 2007. Amygdala-dependent and amygdala-independent pathways for contextual fear conditioning. *Neuroscience* 147: 919-927.
- Portera-Cailliau, C, Pan, DT, Yuste, R. 2003. Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *J. Neurosci.* 23: 7129-42.

- Poulin, B, Butcher, A, McWilliams, P, Bourgognon, J, Pawlak, R, Choi, K. 2010. The M3 - muscarinic receptor regulates learning and memory in a receptor phosphorylation / arrestin- dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 9440-9445.
- Prybylowski, K, Chang, K, Sans, N, Kan, L, Vicini, S, Wenthold, RJ. 2005. The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. *Neuron* 47: 845-57.
- Pugh, CR, Rudy, JW. 1996. A developmental analysis of contextual fear conditioning. *Dev. Psychobiol.* 29: 87-100.
- Punnakkal, P, Jendritza, P, Köhr, G. 2012. Influence of the intracellular GluN2 C-terminal domain on NMDA receptor function. *Neuropharmacology* 62: 1985-1992.
- Quinn, JJ, Loya, F, Ma, QD, Fanselow, MS. 2005. Dorsal hippocampus NMDA receptors differentially mediate trace and contextual fear conditioning. *Hippocampus* 15: 665-674.
- Raineki, C, De Souza, MA, Szawka, RE, Lutz, ML, De Vasconcellos, LFT, Sanvitto, GL, Izquierdo, I, Bevilaqua, LR, Cammarota, M, Lucion, AB. 2009. Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: Involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. *Neuroscience* 159: 31-38.
- Rampon, C, Tsien, JZ. 2000. Genetic analysis of learning behavior-induced structural plasticity. *Hippocampus* 10: 605-9.
- Restivo, L, Vetere, G, Bontempi, B, Ammassari-Teule, M. 2009. The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *J. Neurosci.* 29: 8206-14.
- Revillo, DA, Cotella, E, Paglini, MG, Arias, C. 2014. Contextual learning and context effects during infancy: 30years of controversial research revisited. *Physiol. Behav.*
- Robinson-Drummer, PA, Stanton, ME. 2014. Using the context preexposure facilitation effect to study long-term context memory in preweanling, juvenile, adolescent, and adult rats. *Physiol. Behav.* 148: 22-28.
- Roche, KW, Standley, S, McCallum, J, Dune Ly, C, Ehlers, MD, Wenthold, RJ. 2001. Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat. Neurosci.* 4: 794-802.
- Rodrigues, SM, Schafe, GE, LeDoux, JE. 2001. Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J. Neurosci.* 21: 6889-6896.
- De Roo, M, Klausner, P, Garcia, PM, Poglia, L, Muller, D. 2008. Spine dynamics and synapse remodeling during LTP and memory processes. *Prog. Brain Res.* 169: 199-207.
- Rudy, JW. 2009. Context representations, context functions, and the parahippocampal-hippocampal system. *Learn. Mem.* 16: 573-585.

- Rudy, JW, Morledge, P. 1994. Ontogeny of Contextual Fear Conditioning in Rats: Implications for Consolidation, Infantile Amnesia, and Hippocampal System Function. *Behav. Neurosci.* 108: 227-234.
- Rudy, JW, O'Reilly, RC. 1999. Contextual fear conditioning, conjunctive representations, pattern completion, and the hippocampus. *Behav. Neurosci.* 113: 867-80.
- Sabatini, BL, Maravall, M, Svoboda, K. 2001. Ca(2+) signaling in dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 349-56.
- Salter, MW, Kalia, L V. 2004. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 317-28.
- Sananbenesi, F, Fischer, A, Wang, X, Schrick, C, Neve, R, Radulovic, J, Tsai, L-H. 2007. A hippocampal Cdk5 pathway regulates extinction of contextual fear. *Nat. Neurosci.* 10: 1012-9.
- Sanders, MJ, Wiltgen, BJ, Fanselow, MS. 2003. The place of the hippocampus in fear conditioning. *Eur. J. Pharmacol.* 463: 217-223.
- Sanhueza, M, Lisman, J. 2013. The CaMKII/NMDAR complex as a molecular memory. *Mol. Brain* 6: 10.
- Sanz-Clemente, A, Nicoll, RA, Roche, KW. 2013. Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *Neuroscientist* 19: 62-75.
- Sargolini, F, Fyhn, M, Hafting, T, McNaughton, BL, Witter, MP, Moser, M-B, Moser, EI. 2006. Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex. *Science* 312: 758-62.
- Sato, S, Xu, J, Okuyama, S, Martinez, LB, Walsh, SM, Jacobsen, MT, Swan, RJ, Schlautman, JD, Ciborowski, P, Ikezu, T. 2008. Spatial Learning Impairment , Enhanced CDK5 / p35 Activity , and Downregulation of NMDA Receptor Expression in Transgenic Mice Expressing Tau-Tubulin Kinase 1. *J. Neurosci.* 28: 14511-14521.
- Savelli, F, Knierim, JJ. 2014. Strides toward a structure-function understanding of cortical representations of allocentric space. *Neuron* 84: 1108-9.
- Schiffino, FL, Murawski, NJ, Rosen, JB, Stanton, ME. 2011a. Ontogeny and neural substrates of the context preexposure facilitation effect. *Neurobiol. Learn. Mem.* 95: 190-198.
- Schiffino, FL, Murawski, NJ, Rosen, JB, Stanton, ME. 2011b. Ontogeny and neural substrates of the context preexposure facilitation effect. *Neurobiol. Learn. Mem.* 95: 190-198.
- Schmidt, H, Eilers, J. 2009. Spine neck geometry determines spino-dendritic cross-talk in the presence of mobile endogenous calcium binding proteins. *J. Comput. Neurosci.* 27: 229-43.
- Sekino, Y, Kojima, N, Shirao, T. Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochem. Int.* 51: 92-104.

- Shimizu, E, Tang, YP, Rampon, C, Tsien, JZ. 2000. NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science* 290: 1170-1174.
- Shipton, O a., El-Gaby, M, Apergis-Schoute, J, Deisseroth, K, Bannerman, DM, Paulsen, O, Kohl, MM. 2014. Left-right dissociation of hippocampal memory processes in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111: 15238-43.
- Solstad, T, Boccarda, CN, Kropff, E, Moser, M-B, Moser, EI. 2008. Representation of geometric borders in the entorhinal cortex. *Science* 322: 1865-8.
- Sotelo, C. 1990. Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice. *J. Exp. Biol.* 153: 225-49.
- Spacek, J, Harris, KM. 1997. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J. Neurosci.* 17: 190-203.
- Spear, NE, Smith, GJ. 1978. Alleviation of forgetting in preweanling rats. *Dev. Psychobiol.* 11: 513-29.
- Stanton, ME. 2000. Multiple memory systems , development and conditioning. 110: 25-37.
- Steward, O, Levy, WB. 1982. Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 2: 284-91.
- Stote, DL, Fanselow, MS. 2004. NMDA receptor modulation of incidental learning in Pavlovian context conditioning. *Behav. Neurosci.* 118: 253-7.
- Strange, B a, Witter, MP, Lein, ES, Moser, EI. 2014. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat. Publ. Gr.* 15: 655-669.
- Strong, KL, Jing, Y, Prosser, AR, Traynelis, SF, Liotta, DC. 2014. NMDA receptor modulators: an updated patent review (2013-2014). *Expert Opin. Ther. Pat.* 24: 1349-66.
- Tada, T, Sheng, M. 2006. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16: 95-101.
- Takehara, K, Kawahara, S, Munemoto, Y, Kuriyama, H, Mori, H, Mishina, M, Kirino, Y. 2004. The N-methyl-D-aspartate (NMDA)-type glutamate receptor GluRepsilon2 is important for delay and trace eyeblink conditioning in mice. *Neurosci. Lett.* 364: 43-7.
- Tang, J, Wotjak, CT, Wagner, S, Williams, G, Schachner, M, Dityatev, A. 2001. Potentiated amygdaloid auditory-evoked potentials and freezing behavior after fear conditioning in mice. *Brain Res.* 919: 232-241.
- Tang, YP, Shimizu, E, Dube, GR, Rampon, C, Kerchner, G a, Zhuo, M, Liu, G, Tsien, JZ. 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401: 63-69.
- Taniguchi, S, Nakazawa, T, Tanimura, A, Kiyama, Y, Tezuka, T, Watabe, AM, Katayama, N, Yokoyama, K, Inoue, T, Izumi-Nakaseko, H, Kakuta, S, Sudo, K, Iwakura, Y,



- Umemori, H, Inoue, T, Murphy, NP, Hashimoto, K, Kano, M, Manabe, T, Yamamoto, T. 2009. Involvement of NMDAR2A tyrosine phosphorylation in depression-related behaviour. *EMBO J.* 28: 3717-29.
- Tarsa, L, Goda, Y. 2002. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 1012-1016.
- Taube, JS, Muller, RU, Ranck, JB. 1990. Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis. *J. Neurosci.* 10: 420-35.
- Tokuoka, H, Goda, Y. 2008. Activity-dependent coordination of presynaptic release probability and postsynaptic GluR2 abundance at single synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 14656-61.
- TOLMAN, EC. 1948. Cognitive maps in rats and men. *Psychol. Rev.* 55: 189-208.
- Tovar, KR, Westbrook, GL. 1999. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J. Neurosci.* 19: 4180-8.
- Tsay, D, Yuste, R. 2004. On the electrical function of dendritic spines. *Trends Neurosci.* 27: 77-83.
- Tyler, WJ, Pozzo-Miller, L. 2003. Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *J. Physiol.* 553: 497-509.
- Vetere, G, Restivo, L, Cole, CJ, Ross, PJ, Ammassari-Teule, M, Josselyn, SA, Frankland, PW. 2011. Spine growth in the anterior cingulate cortex is necessary for the consolidation of contextual fear memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 8456-60.
- Vickers, CA, Stephens, B, Bowen, J, Arbuthnott, GW, Grant, SGN, Ingham, CA. 2006. Neurone specific regulation of dendritic spines in vivo by post synaptic density 95 protein (PSD-95). *Brain Res.* 1090: 89-98.
- Wang, JQ, Guo, ML, Jin, DZ, Xue, B, Fibuch, EE, Mao, LM. 2014. Roles of subunit phosphorylation in regulating glutamate receptor function. *Eur. J. Pharmacol.* 728: 183-187.
- Watson, DJ, Stanton, ME. 2009. Intrahippocampal administration of an NMDA-receptor antagonist impairs spatial discrimination reversal learning in weanling rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92: 89-98.
- Watson, DJ, Stanton, ME. 2010. NIH Public Access. 92: 89-98.
- Wegner, A. 1976. Head to tail polymerization of actin. *J. Mol. Biol.* 108: 139-50.
- Wills, TJ, Cacucci, F. 2014. The development of the hippocampal neural representation of space. *Curr. Opin. Neurobiol.* 24: 111-119.
- Wiltgen, BJ, Sanders, MJ, Behne, NS, Fanselow, MS. 2001. Sex Differences, Context Preexposure, and the Immediate Shock Deficit in Pavlovian Context Conditioning With Mice. *Behav. Neurosci.* 115: 26-32.

- Wiltgen, BJ, Sanders, MJ, Ferguson, C, Homanics, GE, Fanselow, MS. 2005. Trace fear conditioning is enhanced in mice lacking the  $\gamma$  subunit of the GABA A receptor. *Learn. Mem.*: 327-333.
- Witcher, MR, Kirov, SA, Harris, KM. 2007. Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus. *Glia* 55: 13-23.
- Wong, H-K, Liu, X-B, Matos, MF, Chan, SF, Pérez-Otaño, I, Boysen, M, Cui, J, Nakanishi, N, Trimmer, JS, Jones, EG, Lipton, SA, Sucher, NJ. 2002. Temporal and regional expression of NMDA receptor subunit NR3A in the mammalian brain. *J. Comp. Neurol.* 450: 303-17.
- Wyatt, RM, Tring, E, Trachtenberg, JT. 2012. Pattern and not magnitude of neural activity determines dendritic spine stability in awake mice. *Nat. Neurosci.* 15: 949-51.
- Xu, T, Yu, X, Perlik, AJ, Tobin, WF, Zweig, JA, Tennant, K, Jones, T, Zuo, Y. 2009. Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature* 462: 915-9.
- Yang, G, Pan, F, Gan, WB. 2009a. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature* 462: 920-924.
- Yang, G, Pan, F, Gan, W-B. 2009b. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature* 462: 920-4.
- Yashiro, K, Philpot, BD. 2009. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 55: 1081-1094.
- Young, SL, Bohenek, DL, Fanselow, MS. 1994. NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: Immunization against amnesia by context preexposure. *Behav. Neurosci.* 108: 19-29.
- Young, SL, Fanselow, MS. 1992. Associative Regulation of Pavlovian Fear Conditioning : Unconditional Stimulus Intensity Incentive Shifts, and Latent Inhibition. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* 18: 400-413.
- Yuan, H, Hansen, KB, Vance, KM, Ogden, KK, Traynelis, SF. 2009. Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain. *J. Neurosci.* 29: 12045-58.
- Yuan, T, Bellone, C. 2013. Glutamatergic receptors at developing synapses: the role of GluN3A-containing NMDA receptors and GluA2-lacking AMPA receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 719: 107-11.
- Yuste, R. 2015. The discovery of dendritic spines by Cajal. *Front. Neuroanat.* 9: 18.
- Yuste, R, Bonhoeffer, T. 2004. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 24-34.
- Zhang, S, Edelmann, L, Liu, J, Crandall, JE, Morabito, M a. 2008a. Cdk5 regulates the phosphorylation of tyrosine 1472 NR2B and the surface expression of NMDA receptors. *J. Neurosci.* 28: 415-424.

- Zhang, W, Benson, DL. 2001. Stages of synapse development defined by dependence on F-actin. *J. Neurosci.* 21: 5169-81.
- Zhang, X-H, Wu, L-J, Gong, B, Ren, M, Li, B-M, Zhuo, M. 2008b. Induction- and conditioning-protocol dependent involvement of NR2B-containing NMDA receptors in synaptic potentiation and contextual fear memory in the hippocampal CA1 region of rats. *Mol. Brain* 1: 9.
- Zhang, Z, Peterson, M, Liu, H. 2013. Essential role of postsynaptic NMDA receptors in developmental refinement of excitatory synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: 1095-100.
- Zhao, M-G, Toyoda, H, Lee, Y-S, Wu, L-J, Ko, SW, Zhang, X-H, Jia, Y, Shum, F, Xu, H, Li, B-M, Kaang, B-K, Zhuo, M. 2005. Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron* 47: 859-72.
- Zhu, JJ, Qin, Y, Zhao, M, Van Aelst, L, Malinow, R. 2002. Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 110: 443-55.
- Zito, K, Knott, G, Shepherd, GMG, Shenolikar, S, Svoboda, K. 2004. Induction of spine growth and synapse formation by regulation of the spine actin cytoskeleton. *Neuron* 44: 321-34.
- Ziv, NE, Smith, SJ. 1996. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17: 91-102.

# 8

## Publicaciones

De esta tesis derivaron las siguientes publicaciones:

***“Re-examining the ontogeny of the context preexposure facilitation effect in the rat through multiple dependent variables”***. Pisano, M.V., Ferreras, S, Krapacher, FA, Paglini, G, Arias, C. 2012. Behav. Brain Res. 233: 176-190

***“Pharmacological and biochemical association of NMDA receptors and the context preexposure facilitation effect during the preweanling period”***. Pisano, M.V., Arias, C. Paglini, M.G. Artículo em preparación.



## Research report

## Re-examining the ontogeny of the context preexposure facilitation effect in the rat through multiple dependent variables

M.V. Pisano<sup>a,\*</sup>, S. Ferreras<sup>a</sup>, F.A. Krapacher<sup>a</sup>, G. Paglini<sup>a,b,1</sup>, C. Arias<sup>a,c,1</sup><sup>a</sup> Laboratory of Neurobiology and Cell Biology, Instituto de Investigación Médica M. y M. Ferreyra (INIMEC – CONICET), Friuli 2434, C.P. 5000 Córdoba, Argentina<sup>b</sup> Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, CP 5000, Argentina<sup>c</sup> Facultad de Psicología, Universidad del País Vasco – UPV/EHU, Avda de Tolosa, 70, 20018 San Sebastián, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 February 2012

Received in revised form 18 April 2012

Accepted 20 April 2012

Available online 27 April 2012

## Keywords:

Context

Fear memory

Ontogeny

Rat

Preexposure

Hippocampus

## ABSTRACT

The capability to acquire context conditioning does not emerge until weaning, at least when the defining features of the context lack explicit and salient olfactory cues. Contextual learning deficits in preweaning rats have been associated with functional immaturity of the dorsal hippocampus. According to recent studies, the so-called context preexposure facilitation effect (CPFE) – a hippocampus-dependent effect – is not observed until postnatal day 23 (PD23). In these studies the footshock intensity employed was higher (1.5 mA) than in adult studies, and context conditioning was inferred from a single behavioral measure (percentage of freezing). The present study examined the CPFE on PD17 and PD23 by analyzing multiple dependent variables, including fecal boli and an ethogram covering the complete behavioral repertoire of the rat. A non-shocked control group was included in the design and two footshock intensities were employed (0.5 and 1.5 mA). Results showed clear evidence of contextual fear conditioning in preweaning and weaning rats, as well as evidence of conditioned fear in non-preexposed rats from both age groups. In some cases, some dependent variables, such as grooming or vertical exploration, were more sensitive than freezing for detecting evidence of memory. Strong fear responses were detected in weaning (but not preweaning) rats, when rats were evaluated in a different context from the one employed at conditioning. These results indicate that preweaning rats are capable of acquiring contextual conditioning, even in a context lacking explicit odor cues, and highlight the importance of multiple dependent variables for analyzing the ontogeny of memory.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Several studies have reported weaker retention of contextual fear memory in infants when compared with weanling or adult rats. This observation led some authors to postulate that long-term memory for contextual fear conditioning emerges between postnatal day 18 (PD18) and PD23 [1–4]. Two non-exclusive hypotheses have been put forward to explain this memory deficit in preweaning rats. Some authors allude to a functional immaturity of the neural circuits underlying contextual fear memory formation, including the hippocampal system [for example, 2–4], a complex brain structure functionally associated with contextual learning [5–8], or its connections with other brain areas involved in fear conditioning. For example, it has been proposed that the circuitry connecting the hippocampus and other brain structures, such as the amygdala, might not be fully functional around PD17 [9]. The second hypothesis claims that the ontogenetic analysis of contextual learning should take into consideration that the

capability to process some types of environmental cues may be more limited in preweaning (around PD17) than in postweaning animals. For example, rats may be less likely to become conditioned to visual aspects of context, because they open their eyes around PD14 [10–12]. Hence, the retention deficit of contextual fear memories that has been observed in preweaning rats may be related to a perceptual limitation and to the sensory modality of the cues that constitute the context, which usually consists of a clear Plexiglas chamber (without salient textures or explicit odors). In agreement with this hypothesis, Pugh and Rudy found that when rats were trained and tested in a black context, expression of contextual fear conditioning was similar in both 18-day-old and weanling rats [13]. Retention of contextual memory in preweaning rats also improved significantly when an explicit odor was added to the training context [12]. During recent years, several authors have employed a variant of the typical contextual fear conditioning procedure, the context preexposure facilitation effect (CPFE) [14,15], to study the ontogeny of contextual fear learning [2,9,16–18]. This hippocampus-dependent procedure [14,15] consists of three phases. In the preexposure phase (Phase 1), half of the rats are exposed to the training context (preexposed group),

\* Corresponding author. Tel.: +54 351 4681465x136; fax: +54 351 4695163.

E-mail address: [victoriapisano@gmail.com](mailto:victoriapisano@gmail.com) (M.V. Pisano).<sup>1</sup> These authors shared the last authorship.

while the rest of the subjects remain undisturbed in the home-cage [for example, 9] or are exposed to an alternative context [for example, 2]. Twenty-four hours later, at conditioning (Phase 2), all subjects receive a footshock immediately after being placed in the training context, and are then quickly removed from the context. On the testing day (usually 24 h after conditioning), rats are placed once again in the training context for 5 min. The dependent variable typically analyzed in these studies is the percentage of time that the rat is immobile (freezing) during the testing session. The common result is that non-preexposed subjects do not show any evidence of fear (the so-called “immediate shock-deficit”), which is alleviated by the preexposure treatment. In other words, preexposed rats remain immobilized for a longer period of time than their non-preexposed counterparts. This result has been interpreted as a facilitation of conditioning by the preexposure treatment, and has been consistently observed in weanling rats (PD23), but not in preweanling rats preexposed to the context on PD17, conditioned on PD18 and evaluated on PD19 [2,9,16]. These results lead to the conclusion that the immediate shock fails to induce contextual conditioning in non-preexposed subjects [for example, 9, 16]. The lack of contextual conditioning in infant rats has been explained in terms of a deficit in the long-term memory system [4], or in terms of an inability to build a configurational representation of the context, due to functional immaturity of the dorsal hippocampus [5,16].

It is striking that the shock intensity employed in the aforementioned ontogenetic studies was higher than the one used with adult rats. While in studies with adult rats the shock intensity varied between 0.5 and 1 mA, in ontogenetic studies with preweanling and weanling rats the authors employed 1.5 mA [2,9,16–18], even though infant rats are capable of acquiring cue-dependent fear conditioning with lower shock intensities (0.5 or 0.6 mA) [for example, 19, 20]. It is also remarkable that in those studies that analyzed the CPFE in infant rats, no non-shocked control group was included in the design [2,9,16–18]. The conclusions of these studies are based on the analysis of only one dependent variable (the percentage of freezing). Bevins et al. found evidence of fear conditioning in rats trained with an immediate shock procedure, even when the intensity of the footshock was lower than the one employed in studies using infant rats [21,22]. A similar conclusion was previously reached by Blanchard et al. when they compared the behavior induced by an immediate-shock condition with a non-shocked group [23]. The detection of evidence of conditioning after an immediate shock required a detailed analysis of the behavior of the animal, including different measures and a temporal distribution of the behavior. For example, Bevins and Ayres reported that freezing induced by an immediate shock treatment is expressed early in the test session [22]. Conditioning induced by an immediate shock varies in accordance with the footshock intensity and the behaviors analyzed [21].

The present study aimed to carry out a detailed analysis of the behavioral response in preweanling and weanling rats trained in a contextual fear conditioning paradigm. For this study we also employed the CPFE, but with some variations to the experimental design. Firstly, we included a non-shocked control group to analyze whether the behavioral pattern of the animals treated with the footshock at conditioning differed from the respective control condition of the same age group. This strategy enabled us to observe evidence of conditioning in the non-preexposed subjects [21]. Secondly, we employed two different shock intensities (0.5 and 1.5 mA), to explore whether contextual conditioning can be detected in preweanling and weanling rats with a less intense footshock than those normally employed in this ontogenetic period. Finally, after a preliminary analysis of the behavior displayed by the experimental groups at testing, we observed that the conditioning treatment may alter (time-dependently) not only freezing, but also the expression of the general pattern of exploration and

grooming. For this reason, we analyzed the expression of these behaviors (grooming, vertical and horizontal exploration, and defecation) temporally (minute by minute). This analysis may be useful for drawing more precise conclusions regarding the ontogeny of contextual conditioning. The specific goal of the first experiment was to study the expression of fear conditioning in weanling (Experiment 1a) and preweanling (Experiment 1b) rats in accordance with the preexposure treatment (preexposed vs non-preexposed conditions) and the shock intensity used at conditioning (0, 0.5 or 1.5 mA). Follow-up experiments (Experiments 2–4) were designed to examine whether the behavioral pattern modified by the conditioning treatment is expressed specifically in the training context or is generalized to an alternative and distinctive environment.

## 1. Experiments 1a and 1b: context preexposure facilitation effect in weanling and preweanling rats

In Experiment 1 we tested in both weanling (PD23; Experiment 1a) and preweanling rats (PD17; Experiment 1b) the expression of contextual fear conditioning induced by an immediate footshock (0, 0.5 or 1.5 mA) treatment, as a function of context preexposure. The aim of these experiments was to analyze: (a) whether context preexposure before conditioning alters the behavioral pattern displayed at testing; we were interested in detecting evidence of conditioning through different dependent variables; (b) whether the CPFE can be detected in young rats with a less intense footshock (0.5 mA) than the one (1.5 mA) that has been employed in the ontogenetic analysis of this phenomenon; and (c) whether non-preexposed rats show evidence of contextual fear conditioning.

### 1.1. Materials and methods

#### 1.1.1. Subjects

One hundred and fifty-nine Wistar rats, representative of 62 litters, were used for the present study (including Experiments 1a and 1b). Table 1 summarizes the total number of subjects included in each independent group in all the experiments included in the study. We only employed males, and in any case no more than one subject from a given litter was assigned to the same treatment condition to avoid overrepresentation of a particular litter [24]. Animals were born and reared at the vivarium of the Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, INIMEC–CONICET, under conditions of constant room temperature ( $22 \pm 1.0^\circ\text{C}$ ), on a 12-h light–12-h dark cycle. Births were examined daily and the day of parturition was termed postnatal day 0 (PD0). Subjects were 17 (PD17: Experiment 1b) or 23 days old (PD23: Experiment 1a) at the start of the experiments. After weaning (at PD21), rats from Experiment 1a were housed with 2 littermates. All procedures were approved by the National Department of Animal Care and Health (SENASA – Argentina) and were in compliance with the National Institute of Health’s general guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

#### 1.1.2. Apparatus

The context in which subjects were trained and tested consisted of a Plexiglas chamber (29 cm  $\times$  17 cm  $\times$  20 cm) with white opaque walls, except for the front one that was transparent to enable the testing sessions to be videotaped. The grid floor (30 cm  $\times$  18 cm) consisted of stainless steel rods measuring 0.2 cm in diameter and placed 0.5 cm apart. The grid was wired to a scrambling electrical stimulation generator (L.I.A.D.E. – FCEfyN, UNC, Cordoba, Argentina) that delivered a single 2-s, 0.5 mA or 1.5 mA footshock. Training and testing were carried out in an experimental room

**Table 1**  
Total number of subjects included in each experiment as a function of preexposure and conditioning treatments.

Preexp	Cond	Exp 1a (PD23)	Exp 1b (PD17)	Exp 2a (PD23)	Exp 2b (PD17)	Exp 3 (PD23)	Exp 4 (PD23)
Non-pre	0 mA	13	13	13	13	9	8
Non-pre	0.5 mA	12	13	13	12	8	
Non-pre	1.5 mA	13	13	13	13	9	8
Pre	0 mA	13	13	13	13	8	8
Pre	0.5 mA	14	13	13	13	8	
Pre	1.5 mA	16	13	12	11	8	9

illuminated with dim light and with a constant low white noise generated by an air extractor placed in the room.

### 1.1.3. Procedures

Subjects from PD23 and PD17 were analyzed in separated experiments (1a and 1b, respectively), because the time dedicated to the different behaviors varies substantially across age groups. For this reason we decided to include a non-shocked control group in each experiment. Experiments 1a and 1b were carried out in three phases: preexposure (Phase 1), conditioning (immediate footshock; Phase 2) and testing (Phase 3). The procedures employed were similar to those used in previous studies [2,16–18], with a few exceptions that will be indicated below.

**Preexposure:** On the corresponding day (PD23 for Experiment 1a, or PD17 for Experiment 1b), subjects from the preexposure condition were individually moved to the experimental room in a white Plexiglas cage (25 cm × 25 cm × 20 cm). Transportation from the vivarium to the experimental room took approximately 10 s. The same transport cage was employed in all the phases of this experiment. Subjects were then placed into the conditioning chamber for 5 min (preexposed group). In some studies, at preexposure, non-preexposed subjects were placed in an alternate context [2,16,17] while in others, subjects from this condition were left undisturbed at their home-cage [9]. Since the basic results from these studies were similar, we decided to leave subjects from the non-preexposed condition in their home-cages. The transport cage and the conditioning chamber were cleaned with a 70% ethylic alcohol solution after each subject in all the phases of the experiment.

**Conditioning (immediate footshock):** Phase 2 was carried out 24 h after preexposure. Animals from both conditions (non-preexposed and preexposed) were individually moved to the conditioning chamber where they received a single footshock (0, 0.5 or 1.5 mA, for 2 s) immediately after placement into the chamber (less than 5 s). Animals were removed as quickly as possible and transported back to their home-cage. Studies analyzing the ontogeny of the CPFE have used 1.5 mA, while in adult rats, the CPFE has been obtained with 0.5 mA and evidence of fear conditioning in non-preexposed subjects can be detected with 0.5 or 1 mA [21,22]. In infant rats, a footshock of 0.5 mA supports cue-mediated learning [19,20]. Considering these antecedents, we selected both intensities (0.5 and 1.5 mA) in order to analyze whether, at this age, the CPFE can be detected with a less intense unconditioned stimulus (US) and whether non-preexposed rats show evidence of conditioning with these treatments.

**Testing:** Twenty-four hours later, rats were placed again in the conditioning chamber for 5 min. The testing session was videotaped and analyzed by two trained researchers blind to the experimental conditions of the animals. Prior to the evaluation, an exhaustive ethogram was compiled based on the observation of a representative sample of animals, in order to select the most appropriate behaviors. In this preliminary phase of the study, researchers scoring these behaviors analyzed a representative subset of subjects in order to ensure inter-rater reliability. Since the ethogram was exhaustive and the measures mutually exclusive, animals were considered well scored if the total time registered for all the behaviors per minute was between 57 and 63 s. If this was not the case, all

the behaviors were scored again. The dependent variables considered for the present study were: (1) Horizontal exploration: time (s) spent exploring the chamber with all four paws on the grid floor. (2) Vertical exploration (including wall climbing and rearing): subjects were considered to be wall climbing when standing on their rear limbs with their forepaws against the wall of the testing chamber. (3) Grooming: time (s) spent paw licking or grooming, which was defined as a sequence of movements beginning with rapid elliptical strokes by the paws over the nose. The amplitude of such movements progressively increases and is followed by bilateral strokes. This sequence of movements ends with a postural turn followed by a period of body licking directed at the flank. (4) Freezing: time (s) with no movement except respiration. Any behavior displayed by the rat was included in one of these categories, and no behavior was included in more than one category. Two additional dependent variables were also measured. Firstly, percentage of freezing, because this score is usually employed as a measure of contextual fear conditioning, and would enable our results to be compared with those from previous studies analyzing the ontogeny of the CPFE [2,16–18]. In the present study, immobility was registered every 10 s. And secondly, we counted the number of fecal boli in the conditioning chamber at the end of the testing phase. This variable has been used as a sensitive measure for detecting a state of anxiety in rats [for example, 25], as well as for detecting conditioning after an immediate shock treatment in non-preexposed rats [21,22].

### 1.1.4. Data analysis

Scores corresponding to every dependent variable (horizontal activity, vertical activity, grooming and freezing) were analyzed with mixed ANOVAs including preexposure treatment (non-preexposed or preexposed) and conditioning (0, 0.5 or 1.5 mA) as between-group factors, and minute of testing (5 levels) as the within-group variable. The number of fecal boli and the percentage of freezing were analyzed by means of a between-factor ANOVA (preexposure treatment × conditioning). In both this and subsequent experiments, significant main effects and/or interactions were further analyzed by means of follow-up ANOVAs and post hoc analyses (Duncan's multiple range test). When justified by an a priori hypothesis, planned comparisons were conducted to explore specific interactions. All inferential analyses conducted in the present study employed an  $\alpha$  level equal to 0.05. The data collected in the subsequent experiments were analyzed using the same statistical strategy.

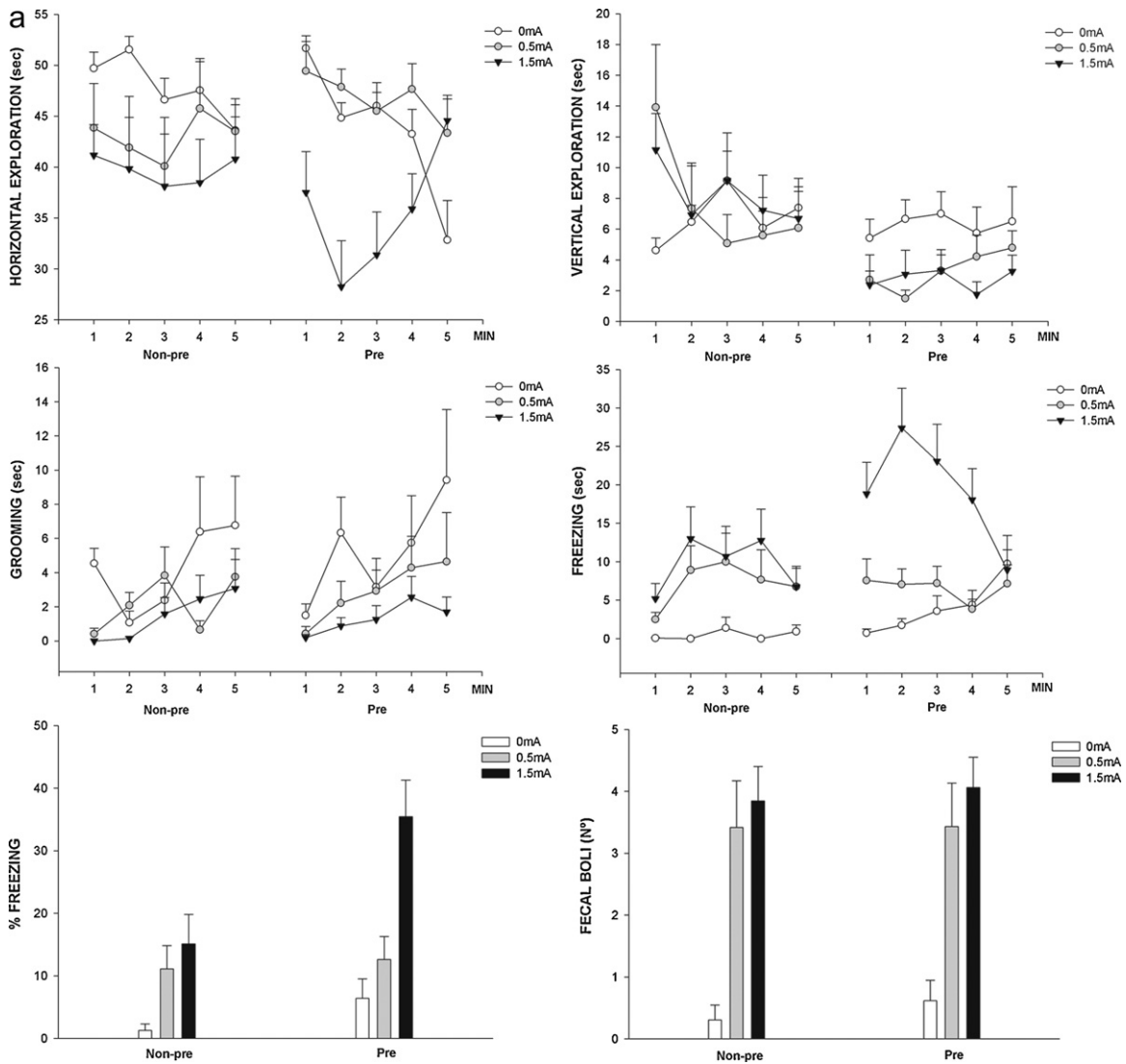
### 1.1.5. Results

Fig. 1a and b presents the scores for the dependent variables analyzed as a function of preexposure (non-preexposed or preexposed) and conditioning (0, 0.5 or 1.5 mA) treatments. Subjects from Experiment 1a (Fig. 1a) were preexposed on PD23, conditioned on PD24 and tested on PD25, while those from Experiment 1b (Fig. 1b) were preexposed on PD17, conditioned on PD18 and tested on PD19.

**1.1.5.1. Experiment 1a. Horizontal exploration:** The ANOVA revealed a significant main effect of conditioning [ $F(2,74) = 5.82$ ;  $p < 0.05$ ], indicating that subjects trained with 1.5 mA spent less

time exploring the chamber than their counterparts from the other conditions. This difference reached significance level for both pre and non-preexposed subjects. The ANOVA also revealed a significant preexposure  $\times$  conditioning  $\times$  minute of testing interaction [ $F(8,296)=2.19$ ;  $p<0.05$ ]. To explore this interaction, follow-up two-way ANOVAs (preexposure  $\times$  conditioning) were performed. In these analyses, the dependent variable was the score registered each minute. These ANOVAs revealed a significant main effect of conditioning at minutes 1, 2, 3 and 4 [all  $F_s(2,74)>4.54$ ; all  $ps<0.05$ ]. Post hoc analyses indicated that subjects given 1.5 mA at conditioning spent less time engaged in horizontal exploration than those treated with 0 mA or 0.5 mA, regardless of the preexposure condition. At minute 2, the preexposure  $\times$  conditioning interaction was close to significance [ $F(8,296)=2.19$ ;  $p=0.05$ ]. At this minute, post hoc analyses revealed that preexposed subjects trained with 1.5 mA spent less time engaged in horizontal exploration than their counterparts from other conditions. Additionally, horizontal exploration scores were significantly lower in non-preexposed subjects treated with 1.5 mA than in the corresponding control group (non-preexposed given 0 mA).

**Vertical exploration:** The ANOVA revealed a significant main effect of preexposure [ $F(1,74)=7.71$ ;  $p<0.05$ ], and a triple preexposure  $\times$  conditioning  $\times$  minute of testing interaction [ $F(8,296)=2.36$ ;  $p<0.05$ ]. To determine the locus of this significant interaction, follow-up two-way ANOVAs (preexposure  $\times$  conditioning) were performed with data from each minute as the dependent variable. The results of these analyses revealed a significant interaction between preexposure and conditioning at minute 1 [ $F(2,74)=4.71$ ;  $p<0.05$ ], indicating that subjects from the non-preexposed condition trained with 0.5 mA or 1.5 mA spent more time wall climbing than both the corresponding non-shocked control group and preexposed rats treated with the same shock intensities (0.5 or 1.5 mA). Footshock inhibited vertical exploration in preexposed rats. The minute by minute analysis did not reveal any significant differences in any specific minute. However, when data from preexposed and non-preexposed subjects were analyzed separately, the ANOVA showed a significant main effect of conditioning in preexposed rats [ $F(2,39)=3.89$ ;  $p<0.05$ ], indicating lower vertical activity scores in preexposed subjects trained with 0.5 or 1.5 mA, in comparison with the corresponding non-shocked control group.



**Fig. 1.** Results obtained in weaning (a) or preweaning (b) rats in the different dependent variables [horizontal and vertical exploration (s), grooming (s), freezing (s), % of freezing and number of fecal boli] as a function of preexposure (non-preexposed or preexposed) and conditioning (0, 0.5 or 1.5 mA) treatments. Vertical lines illustrate the standard error of the mean.



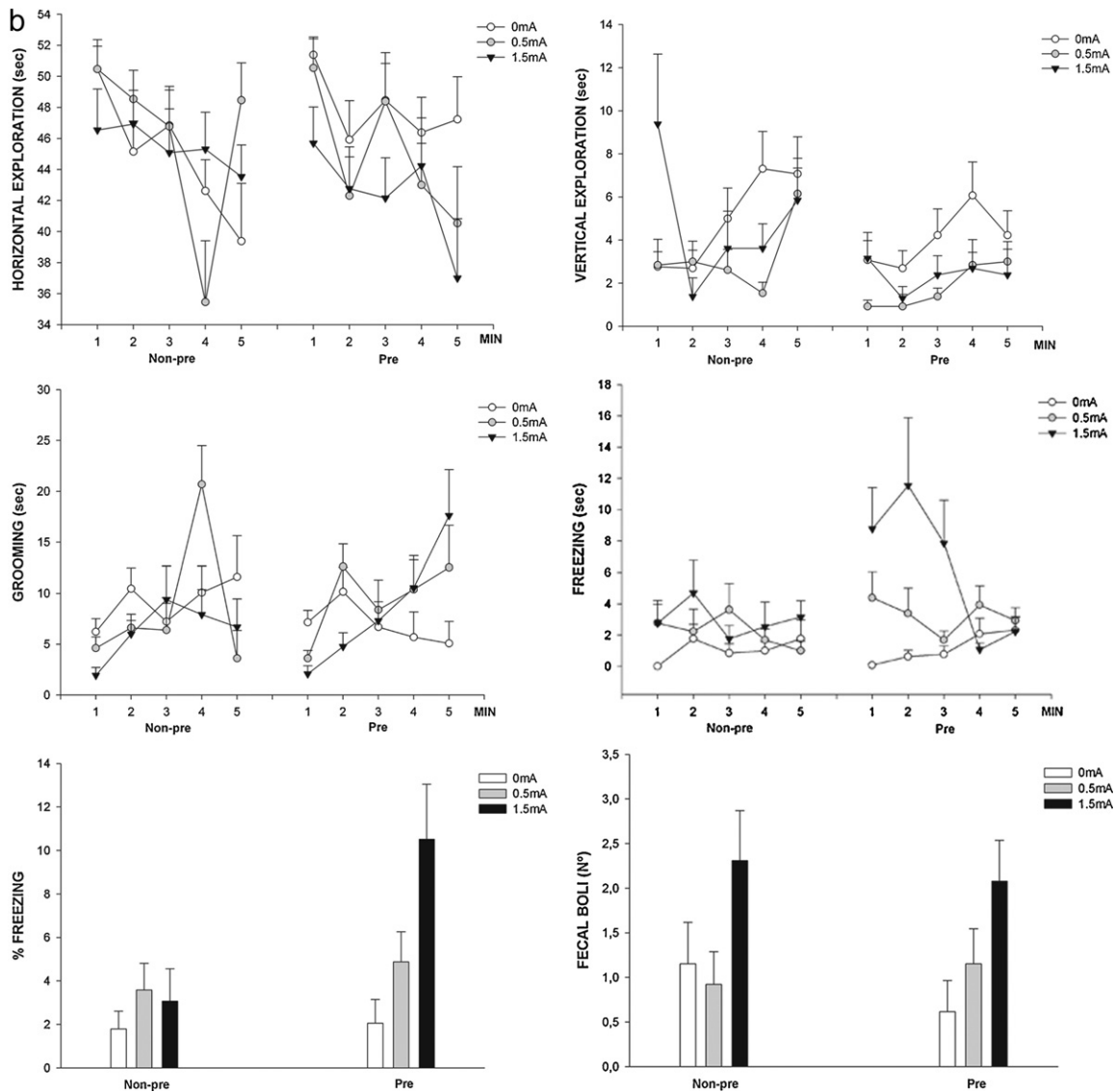


Fig. 1. (Continued).

**Grooming:** The ANOVA for this variable revealed a significant main effect of conditioning [ $F(2,74) = 11.69$ ;  $p < 0.05$ ]. According to the post hoc tests, despite the preexposure treatment, subjects treated with shock at conditioning (0.5 or 1.5 mA) spent less time engaged in grooming than non-shocked controls.

**Freezing:** The analysis for this dependent variable showed significant main effects of preexposure [ $F(1,74) = 4.68$ ;  $p < 0.05$ ] and conditioning [ $F(2,74) = 13.86$ ;  $p < 0.05$ ], indicating that animals treated with 1.5 mA spent more time immobilized than their counterparts from other conditions. This difference reached significance level for pre and non-preexposed subjects. Moreover, the difference between animals given 0.5 mA and controls was close to significance ( $p = 0.05$ ).

The triple interaction (preexposure  $\times$  conditioning  $\times$  minute of testing) also reached statistical significance level [ $F(8,296) = 2.56$ ;  $p < 0.05$ ]. Following the strategy employed with previous dependent variables, follow up two-way ANOVAs were conducted to explore this interaction. These analyses revealed a significant preexposure  $\times$  conditioning interaction at minutes 1 [ $F(2,74) = 3.47$ ;  $p < 0.05$ ] and 2 [ $F(2,74) = 3.27$ ;  $p < 0.05$ ]. During these minutes, preexposed subjects trained with 1.5 mA showed higher levels of freezing than their counterparts from the other experimental

conditions. Moreover, subjects from the non-preexposed condition treated with 1.5 mA spent more time immobilized than the corresponding non-shocked control group during the second minute of testing. At minute 3 and minute 4, the ANOVA indicated a significant main effect of conditioning [ $F(2,74) = 9.06$ ;  $p < 0.05$ , and  $F(2,74) = 10.18$ ;  $p < 0.05$ , respectively]. According to post hoc tests, subjects treated with 1.5 mA at conditioning engaged in more freezing behavior than non-shocked controls, regardless of the preexposure treatment.

**Percentage of freezing:** The ANOVA for this dependent variable revealed significant main effects of preexposure [ $F(1,74) = 6.76$ ;  $p < 0.05$ ] and conditioning [ $F(2,74) = 13.45$ ;  $p < 0.05$ ]. Post hoc analyses showed higher scores in subjects preexposed to the context than in non-preexposed animals, regardless of the conditioning treatment. Additionally, rats treated with the most intense shock (1.5 mA) scored higher than non-shocked controls or than those given 0.5 mA at conditioning. The difference between subjects treated with 0.5 mA and controls was close to significance level ( $p = 0.06$ ). The preexposure  $\times$  conditioning interaction was also near to statistical significance [ $F(2,74) = 2.90$ ;  $p = 0.06$ ]. According to planned comparisons, preexposed subjects trained with 1.5 mA scored significantly higher than non-preexposed rats trained with

**Table 2**

Summary of results obtained in Experiments 1 (a and b) and 2 (a and b). “<” means that scores were significantly lower than the corresponding non-shocked control. “>” means that scores were significantly higher than in the corresponding non-shocked control. “=” means no difference with controls. “</>” indicates that scores were lower than controls at the beginning of the testing session, and higher at the end of the testing session.

	Experiment 1a				Experiment 1b			
	Non-preexposed		Preexposed		Non-preexposed		Preexposed	
	0.5 mA	1.5 mA	0.5 mA	1.5 mA	0.5 mA	1.5 mA	0.5 mA	1.5 mA
Horizontal exploration	=	<	=	<	=	=	=	<
Vertical exploration: MIN 1	>	>	=	=	=	>	=	=
Vertical exploration: TOTAL	=	=	<	<	=	=	<	<
Grooming	<	<	<	<	</>	</>	</>	</>
Freezing	=	>	=	>	=	=	>	>
Percentage of freezing	=	>	=	>	=	=	=	>
Fecal boli	>	>	>	>	=	>	=	>
	Experiment 2a				Experiment 2b			
	Non-preexposed		Preexposed		Non-preexposed		Preexposed	
	0.5 mA	1.5 mA	0.5 mA	1.5 mA	0.5 mA	1.5 mA	0.5 mA	1.5 mA
Horizontal exploration	<	<	<	<	=	=	=	=
Vertical exploration: TOTAL	<	<	<	<	=	=	=	=
Grooming	<	<	<	<	=	=	=	=
Freezing	>	>	>	>	=	=	=	=
Percentage of freezing	>	>	>	>	=	=	=	=
Fecal boli	=	=	=	=	=	=	=	=

the same foot-shock intensity, or than preexposed rats trained with 0 or 0.5 mA [all  $F_{s(1,74)} \geq 12.53$ ; all  $p < 0.001$ ]. No more differences were detected between the remaining preexposed and non-preexposed conditions.

**Fecal boli:** Subjects treated at conditioning with footshock (0.5 mA or 1.5 mA) defecated more at testing than non-shocked control animals (0 mA), regardless of the intensity of the shock or the preexposure treatment, as revealed by the ANOVA [ $F(2,75) = 24.01$ ;  $p < 0.05$ ] and the post hoc analyses.

In short, the analysis of the percentage of freezing revealed a similar pattern to the one reported previously in other studies [2,9,16,17], that is, preexposed subjects treated with 1.5 mA engaged in more freezing behavior than non-preexposed controls treated with the same intensity of footshock. Moreover, the inclusion of non-shocked controls enabled us to observe that non-preexposed subjects given 1.5 mA also showed higher scores of freezing than the corresponding non-shocked controls. The lowest footshock (0.5 mA) only induced a marginal effect in terms of freezing. In some dependent variables (vertical exploration, grooming or fecal boli) subjects given 1.5 mA at conditioning behaved similarly to those given 0.5 mA, and both groups differed from controls. The footshock suppressed grooming and induced defecation, regardless of the preexposure treatment. Vertical exploration was reduced in preexposed subjects treated with footshock (0.5 or 1.5 mA), while in non-preexposed rats it increased during the first testing minute. Finally, footshock (only 1.5 mA) suppressed horizontal exploration, regardless of the preexposure condition (see Table 2 for a summary of the main results).

**1.1.5.2. Experiment 1b. Horizontal exploration:** The ANOVA revealed a significant preexposure  $\times$  conditioning interaction [ $F(2,72) = 3.27$ ;  $p < 0.05$ ], indicating that preexposed subjects from the 1.5 mA condition spent less time exploring horizontally than the corresponding non-shocked control group.

**Vertical exploration:** The ANOVA revealed significant main effects of preexposure and conditioning [ $F(1,72) = 5.96$ ;  $p < 0.05$  and  $F(2,72) = 3.21$ ;  $p < 0.05$ , respectively], as well as a conditioning  $\times$  minute of testing interaction [ $F(8,288) = 3.64$ ;  $p < 0.05$ ]. Post hoc tests showed that subjects non-preexposed to the context scored significantly higher than their preexposed counterparts. Follow-up ANOVAs were performed to analyze the double

interaction, considering scores from each minute as the dependent variable. These analyses showed a significant main effect of conditioning during the first and fourth minutes of testing [ $F(2,75) = 3.97$ ;  $p < 0.05$ ;  $F(2,75) = 7.76$ ;  $p < 0.05$ ]. Post hoc analyses revealed that, during the first minute, subjects treated with 1.5 mA at conditioning spent more time performing this kind of exploration than their counterparts from the other conditions, while at minute 4, subjects trained with footshock (0.5 or 1.5 mA) spent less time exploring vertically than controls. Although the triple interaction (preexposure  $\times$  conditioning  $\times$  minute of testing) was not significant, Fig. 1b clearly shows that the effect of conditioning during the first testing minute was driven mainly by the preexposure factor (similarly to Experiment 1a). Planned comparisons indicated that non-preexposed rats trained with 1.5 mA scored significantly higher in wall climbing than preexposed rats trained with 1.5 mA, or than non-preexposed subjects from the remaining conditions [all  $F_{s(1,72)} \geq 7.88$ ; all  $p < 0.01$ ]. These analyses did not reveal any other significant difference.

**Grooming:** The ANOVA revealed a significant triple interaction: preexposure  $\times$  conditioning  $\times$  minute of testing [ $F(8,288) = 2.39$ ;  $p < 0.05$ ]. To explore this interaction, follow-up two-way ANOVAs (preexposure  $\times$  conditioning) were performed with the score registered each minute as the dependent variable. These ANOVAs revealed a significant main effect of conditioning at minutes 1, 2 and 4 [all  $F_{s(2,72)} \geq 3.89$ ; all  $p < 0.05$ ]. Post hoc tests indicated that, during the first minute of evaluation, subjects given 0.5 and 1.5 mA groomed less than controls (0 mA), regardless of the preexposure condition. The same conditioning effect was detected at minute 2, but only with the highest shock intensity (1.5 mA). During the last minutes, those groups that groomed less at the beginning of the testing session started to groom more than controls. At minute 4, rats trained with 0.5 mA spent more time grooming than controls. During the last minute, the preexposure  $\times$  conditioning interaction reached statistical significance level [ $F(2,72) = 3.73$ ;  $p < 0.05$ ], indicating, according to the post hoc tests, that preexposed subjects trained with 1.5 mA groomed more than preexposed controls (0 mA) or non-preexposed rats trained with 1.5 mA.

**Freezing:** The ANOVA for this variable revealed significant main effects of preexposure and conditioning [ $F(1,72) = 4.79$ ;  $p < 0.05$ , and  $F(2,72) = 9.19$ ;  $p < 0.05$ , respectively], indicating that pups treated with 0.5 or 1.5 mA displayed significantly more freezing

than non-shocked controls. In this case, the effect was driven by the preexposure treatment, since it only reached significance level in preexposed animals. The triple interaction: preexposure  $\times$  conditioning  $\times$  minute of testing also reached statistical significance level [ $F(8,288) = 2.37$ ;  $p < 0.05$ ]. The follow-up two-way ANOVAs revealed significant effects of preexposure [ $F(1,72) = 4.47$ ;  $p < 0.05$ ] and conditioning [ $F(2,72) = 7.57$ ;  $p < 0.05$ ] during the first testing minute, a significant effect of conditioning [ $F(2,72) = 5.45$ ;  $p < 0.05$ ] during the second one, and the double interaction: preexposure  $\times$  conditioning during the third minute [ $F(2,72) = 4.32$ ;  $p < 0.05$ ]. Post hoc analyses showed that, at minute 1, preexposed animals spent more time freezing than non-preexposed groups. Also, subjects treated with 0.5 or 1.5 mA engaged in more freezing behavior than controls, regardless of the preexposure condition. At minute 2 the same difference was detected, but only between subjects treated with 1.5 mA and controls. At minute 3, levels of freezing in preexposed rats trained with 1.5 mA were higher than in their counterparts from the other conditions.

**Percentage of freezing:** The analysis showed significant main effects of preexposure and conditioning, and a double interaction between both factors [ $F(1,72) = 5.80$ ;  $p < 0.05$ ,  $F(2,72) = 5.13$ ;  $p < 0.05$  and  $F(2,72) = 3.26$ ;  $p < 0.05$ , respectively]. Post hoc analyses showed that scores from preexposed rats trained with 1.5 mA were significantly higher than those from the remaining conditions.

**Fecal boli:** The ANOVA revealed a significant main effect of conditioning [ $F(2,72) = 5.34$ ;  $p < 0.05$ ], indicating that rats given 1.5 mA at conditioning defecated more than controls or those treated with 0.5 mA, regardless of the preexposure treatment.

In short, PD17 preexposed rats treated with footshock showed an altered pattern of behavior when compared to their respective control group. Specifically, preexposed rats trained with 1.5 mA spent less time engaged in horizontal exploration and freezing behavior during a longer period of time. This group started to groom later in the testing session, and defecated more than controls. The behavior of non-preexposed subjects was also affected by the shock. At the beginning of the testing session, the non-preexposed group treated with 1.5 mA engaged in more vertical exploration than their counterparts from the other conditions (similarly to what was observed in weanling rats) and also groomed less and spent more time doing freezing behavior than their respective control group. This group also defecated more than its control group. Minimal evidence of conditioning was found at this age with the 0.5 mA shock, and then only in some of the dependent variables under analysis (grooming and wall climbing) (see Table 2 for a summary of the main results).

## 2. Experiments 2a and 2b: analysis of fear responses in an alternative context

The question explored in Experiment 2 was whether the behavioral pattern observed in conditioned subjects in Experiment 1 is expressed exclusively in the training context, or is also expressed in a novel, non-familiar context. To answer this question, subjects (PD23 in Experiment 2a; PD17 in Experiment 2b) were trained following the procedure employed in Experiment 1, but in this case they were evaluated in an alternative and distinctive context. If subjects trained with footshock show the same pattern of fear responses in this new context, we cannot conclude that the behavioral pattern induced by the footshock observed in Experiment 1 is a conditioned response. In this case it may be the result of a non-associative process, such as sensitization.

### 2.1. Materials and methods

#### 2.1.1. Subjects

One hundred and fifty-two Wistar rats, representative of 49 litters were used for Experiments 2a and 2b.

#### 2.1.2. Apparatus

The training context was the same as the one employed in Experiment 1. The testing context consisted of a circular Plexiglas chamber (37.5 cm in diameter  $\times$  18 cm in height), surrounded by white walls except for the front section that was transparent in order to enable the testing session to be videotaped. The floor was a white plastic sheet, and the context was covered by a wooden lid. The context was placed in a lit room, and after each subject, it was cleaned with a 10% isopropyl solution (the training context was cleaned with a 70% ethanol solution).

#### 2.1.3. Procedures

The procedures employed at preexposure and conditioning were similar to those described for Experiment 1, and at testing the only difference was that subjects were evaluated in the alternative environment.

#### 2.1.4. Results

Fig. 2a and b presents the scores from the different dependent variables analyzed as a function of the preexposure (non-preexposed or preexposed) and conditioning (0, 0.5 or 1.5 mA) treatments. Subjects from Experiment 2a (Fig. 2a) were preexposed on PD23, conditioned on PD24 and tested on PD25, while those from Experiment 2b (Fig. 2b) were preexposed on PD17, conditioned on PD18 and tested on PD19. For all subjects, the testing context was different from the one employed at conditioning.

**2.1.4.1. Experiment 2a. Horizontal exploration:** The ANOVA revealed a significant main effect of conditioning [ $F(2,71) = 4.08$ ;  $p < 0.05$ ]. Post hoc analyses indicated that subjects given 0.5 or 1.5 mA at conditioning spent less time engaged in horizontal exploration than those treated with 0 mA, regardless of the preexposure condition.

**Vertical exploration:** The ANOVA revealed significant main effects of preexposure and conditioning [ $F(1,71) = 10.15$ ;  $p < 0.05$  and  $F(2,71) = 10.58$ ;  $p < 0.05$ , respectively]. Subsequent analyses of these effects showed that preexposed groups spent less time engaged in vertical exploration than their non-preexposed counterparts. The footshock (0.5 or 1.5 mA) significantly inhibited vertical exploration regardless of the preexposure treatment.

**Grooming:** Grooming was also significantly suppressed by both footshock intensities, as revealed by the ANOVA [conditioning effect:  $F(2,71) = 5.40$ ;  $p < 0.05$ ], and by the corresponding post hoc analyses.

**Freezing:** The ANOVA revealed significant main effects of preexposure [ $F(1,71) = 7.18$ ;  $p < 0.05$ ] and conditioning [ $F(2,71) = 9.76$ ;  $p < 0.05$ ]. Post hoc analyses showed higher levels of freezing in preexposed subjects than in non-preexposed ones, and that conditioned groups, either with 0.5 or 1.5 mA, spent more time engaged in this behavior than controls.

**Percentage of freezing:** The results of the ANOVA were similar to those described for freezing, i.e. significant main effects of preexposure [ $F(1,71) = 6.08$ ;  $p < 0.05$ ] and conditioning [ $F(2,71) = 9.01$ ;  $p < 0.05$ ]. According to post hoc tests, preexposure to the context, as well as conditioning with 0.5 or 1.5 mA, resulted in a higher percentage of freezing in comparison with the respective controls.

**Fecal boli:** No significant effects or interactions were found in the analysis of this variable, although the conditioning factor was close to statistical significance level [ $F(2,71) = 3.06$ ;  $p = 0.05$ ]. According to the post hoc analysis, subjects given 1.5 mA defecated more than

controls, while the difference between controls and those trained with 0.5 mA was close to significance level ( $p = 0.08$ ).

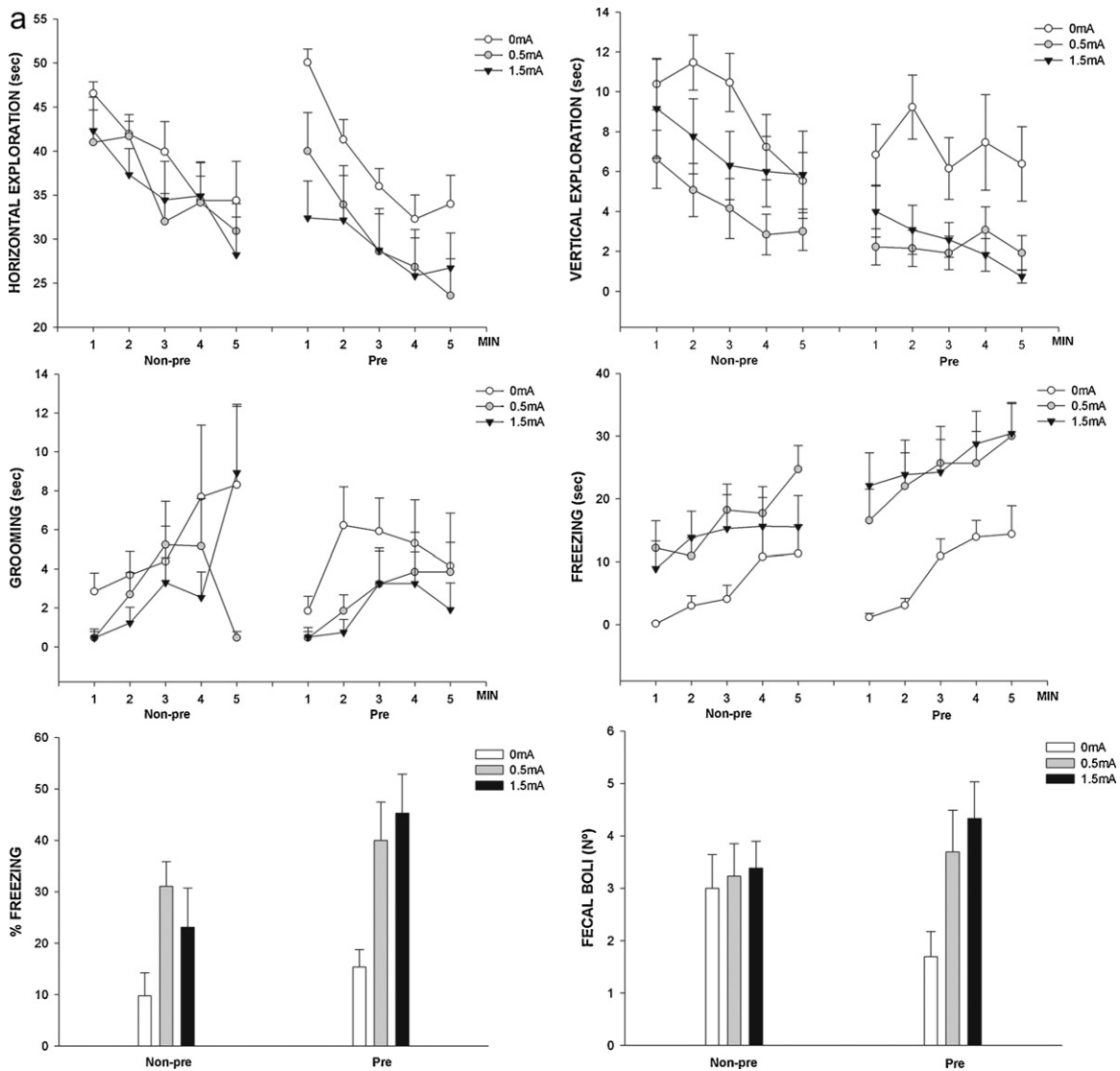
In short, these results clearly show that the footshock altered the behavior in the novel context (in comparison with controls). The footshock (0.5 or 1.5 mA) inhibited exploration (vertical and horizontal) and grooming and increased the freezing response and defecation. One important difference between these results and those described for Experiment 1 is that, in Experiment 2a no interaction was observed between preexposure and conditioning in the dependent variables measured. This important outcome will be discussed in the general discussion of the manuscript (see Table 2 for a summary of the main results).

**2.1.4.2. Experiment 2b.** The ANOVAs conducted to analyze horizontal and vertical exploration, grooming and freezing did not revealed any significant differences between the experimental conditions. The analysis of fecal boli found that conditioning exerted an effect that was close to statistical significance level [ $F(2,69) = 2.83$ ;  $p = 0.06$ ]. These results showed no evidence of the

prior conditioning treatment in any of the dependent variables analyzed (only marginally increased defecation).

**3. Experiment 3: role of the transport cage on the generalization of fear responses in weanling rats**

Weanling rats that were conditioned with an electric footshock expressed fear responses when they were evaluated in a context different from the one employed at conditioning (Experiment 2a). It has been shown that the transport cage can help rats to predict that they are being brought to the context in which they will receive the footshock [8,26]. Following this rationale, it is likely that shock-induced fear responses in the novel environment (Experiment 2a) were elicited by the transport cage. Experiment 3 was designed to assess this possibility, using a different transport cage at conditioning and at testing.



**Fig. 2.** Results obtained in weaning (a) or preweaning (b) rats in the different dependent variables [horizontal and vertical exploration (s), grooming (s), freezing (s), % of freezing and number of fecal boli] as a function of preexposure (non-preexposed or preexposed) and conditioning (0, 0.5 or 1.5 mA) treatments. Subjects were tested in a different context than the one employed at conditioning. Vertical lines illustrate the standard error of the mean.

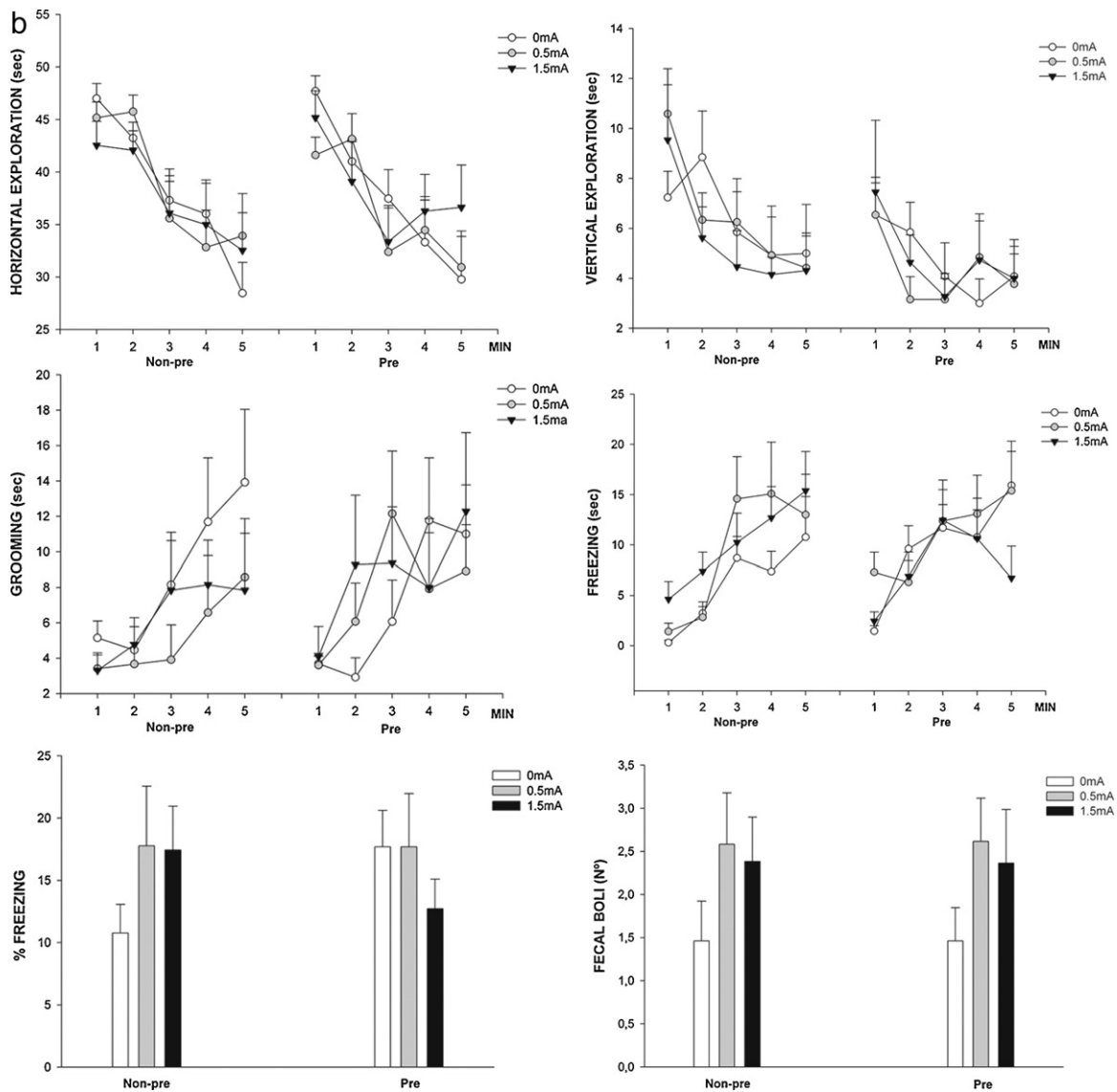


Fig. 2. (Continued).

### 3.1. Materials and methods

#### 3.1.1. Subjects

Fifty Wistar rats, representative of 17 litters, were used for Experiment 3.

#### 3.1.2. Procedures

In Experiment 3, subjects were evaluated in the alternative context employed in Experiment 2a. All the basic procedures were identical to those described for Experiment 1, with the only exception being that, at testing, we used a different transport cage from the one employed at preexposure or conditioning. The new transport cage consisted of their home cage (a cage previously filled with shavings from the subject's home-cage).

#### 3.1.3. Results

Fig. 3 shows data from the different dependent variables as a function of the preexposure (non-preexposed or preexposed) and conditioning (0, 0.5 or 1.5 mA) treatments. Subjects were preexposed on PD23, conditioned on PD24 and tested on PD25. At testing, subjects were transported in their home-cage and evaluated in the alternative environment.

**Horizontal exploration:** The ANOVA revealed a significant main effect of conditioning [ $F(2,44)=4.34$ ;  $p<0.05$ ]. Post hoc analyses indicated that subjects trained with 1.5 mA engaged in less horizontal exploration than their counterparts from the other groups, regardless of the preexposure treatment.

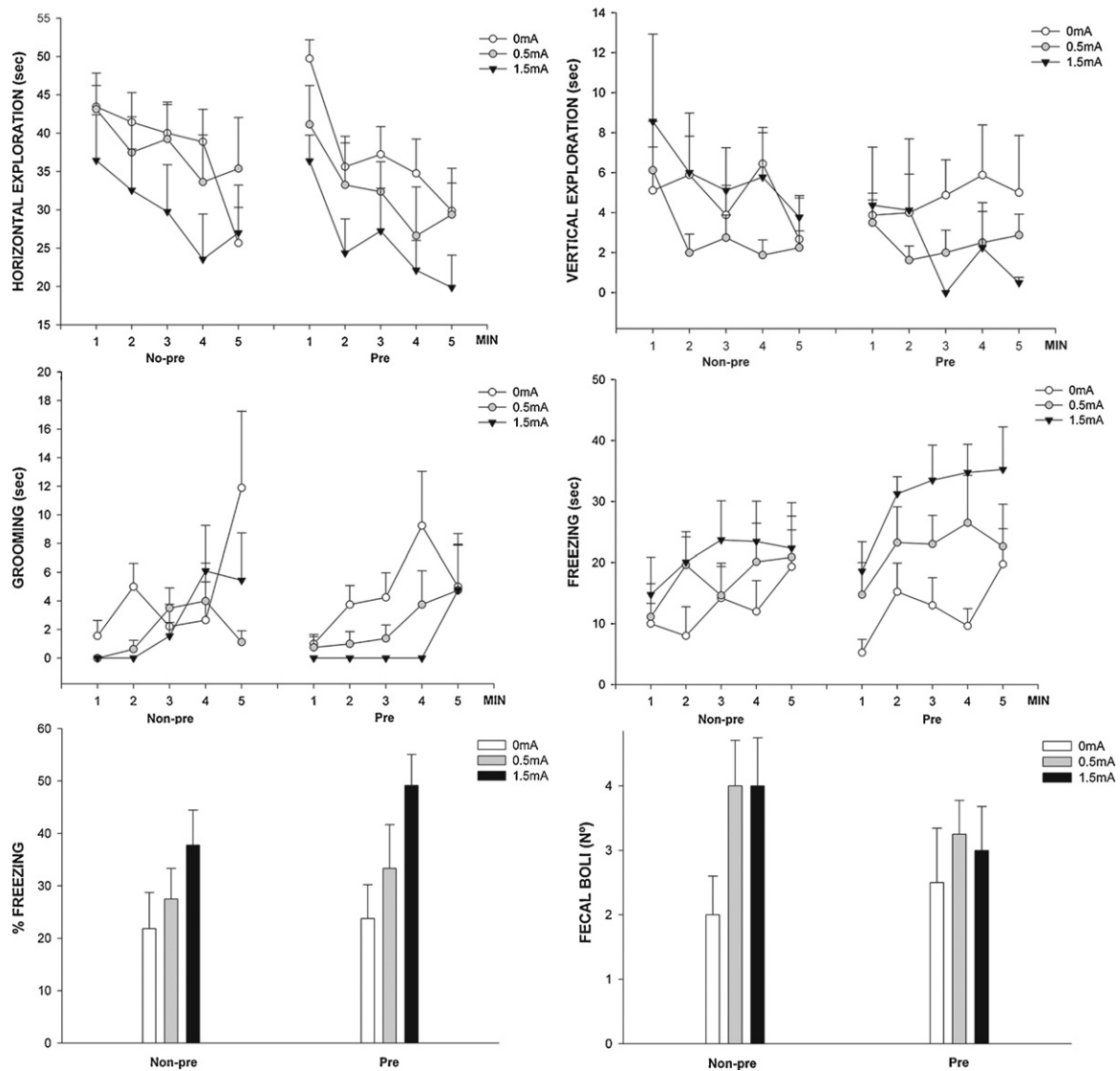
**Vertical exploration:** The ANOVA did not find any significant effect or interaction in relation to this dependent variable.

**Grooming:** The ANOVA detected a significant main effect of conditioning [ $F(2,44)=5.29$ ;  $p<0.05$ ], showing that subjects conditioned with 0.5 and 1.5 mA spent less time grooming than non-shocked controls.

**Freezing:** The ANOVA for this variable revealed a significant main effect of conditioning [ $F(2,44)=5.62$ ;  $p<0.05$ ]. Post hoc tests indicated that rats trained with 1.5 mA spent more time doing freezing behavior than their counterparts from the other conditions, regardless of the preexposure treatment.

**Percentage of freezing:** The ANOVA revealed a significant main effect of conditioning [ $F(2,44)=4.87$ ;  $p<0.05$ ]. Scores from the group trained with 1.5 mA were significantly higher than those from the other conditions.

**Fecal boli:** No significant differences were found in the analysis of this variable.



**Fig. 3.** Results obtained in weaning rats in the different dependent variables [horizontal and vertical exploration (s), grooming (s), freezing (s), % of freezing and number of fecal boli] as a function of preexposure (non-preexposed or preexposed) and conditioning (0, 0.5 or 1.5 mA) treatments. Subjects were tested in a different context than the one employed at conditioning, and moved to the testing session in their home-cage. Vertical lines illustrate the standard error of the mean.

Regardless of the preexposure condition, the more intense footshock (1.5 mA) reduced horizontal exploration and grooming, and increased freezing. The less intense shock (0.5 mA) only suppressed grooming. These results indicate that fear responses were still observed regardless subjects were transported in their home-cages. Some of the behaviors were attenuated (when compared to Experiment 2a), particularly when subjects were conditioned with 0.5 mA.

#### 4. Experiment 4: role of the transport cage on the CPFE in weaning rats

Experiment 3 showed that the transport cage may play a role in the generalization of the fear responses observed in Experiment 2a. Experiment 4 was designed to analyze the role of the transport cage in the CPFE that was observed in Experiment 1a in weaning rats. In this experiment we employed only the 1.5 mA footshock, because in Experiment 1 the preexposure effect was observed in more dependent variables with 1.5 mA than with 0.5 mA.

#### 4.1. Materials and methods

##### 4.1.1. Subjects

Thirty-three Wistar rats, representative of 17 litters were used for Experiment 4.

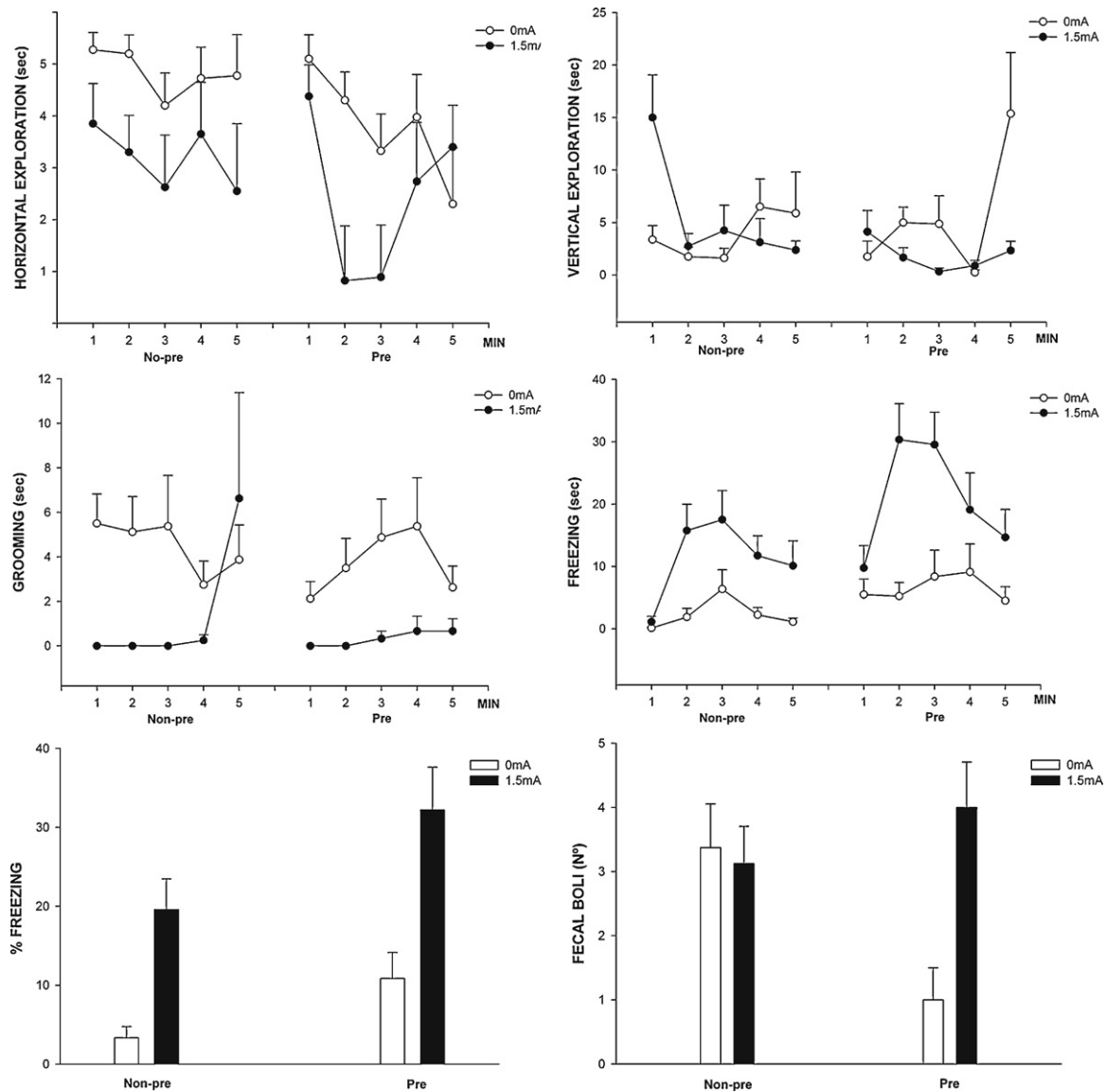
##### 4.1.2. Procedures

All the procedures were identical to those described for Experiment 1a, with the only difference being that in this case, subjects were transported at testing in their home-cages (similarly to in Experiment 3a).

##### 4.1.3. Results

**Fig. 4** shows the scores from the different dependent variables analyzed as a function of the preexposure (non-preexposed or preexposed) and conditioning (0 or 1.5 mA) treatments. Subjects from Experiment 4 were preexposed on PD23, conditioned on PD24 and tested on PD25.

**Horizontal exploration:** The ANOVA revealed a significant main effect of conditioning [ $F(1,29) = 9.24$ ;  $p < 0.05$ ]. Post hoc analyses indicated that subjects given 1.5 mA at conditioning engaged in less



**Fig. 4.** Results obtained in weaning rats in the different dependent variables [horizontal and vertical exploration (s), grooming (s), freezing (s), % of freezing and number of fecal boli] as a function of preexposure (non-preexposed or preexposed) and conditioning (0 or 1.5 mA) treatments. Subjects were tested in the training context and moved to the testing session in their home-cage. Vertical lines illustrate the standard error of the mean.

horizontal exploration than those treated with 0 mA, regardless of the preexposure condition.

**Vertical exploration:** The ANOVA for this variable revealed significant preexposure  $\times$  minute and conditioning  $\times$  minute interactions [ $F(4,116)=4.70$ ;  $p<0.05$  and  $F(4,116)=7.25$ ;  $p<0.05$ , respectively]. The following analyses showed that preexposed rats spent less time engaged in vertical exploration than their non-preexposed counterparts only during the first minute of testing [ $F(1,31)=4.38$ ;  $p<0.05$ ]. The footshock also increased vertical exploration during the first minute of testing [ $F(1,31)=5.83$ ;  $p<0.05$ ]. Although the triple interaction (preexposure  $\times$  conditioning  $\times$  minute) was not significant, Fig. 4 suggests that these interactions were driven by data from the first minute, in which non-preexposed subjects trained with 1.5 mA engaged in more wall climbing than their counterparts from the other groups (the same result as reported in Experiment 1a). This observation was corroborated by the corresponding planned comparisons [all  $F_s(1,29) \geq 10.89$ ; all  $p_s < 0.005$ ].

**Grooming:** The ANOVA revealed a significant main effect of conditioning [ $F(1,29)=11.74$ ;  $p<0.05$ ], showing that subjects given

1.5 mA groomed less than controls (regardless of the preexposure treatment).

**Freezing:** The ANOVA revealed a significant main effect of preexposure [ $F(1,29)=9.47$ ;  $p<0.05$ ] and conditioning [ $F(1,29)=27.02$ ;  $p<0.05$ ]. Post hoc analyses showed higher levels of freezing in preexposed subjects than in non-preexposed ones, and in subjects given 1.5 mA than in their controls. Planned comparisons showed that levels of freezing were higher in preexposed and non-preexposed subjects trained with the footshock than in their respective controls [ $F(1,29)=20.95$ ;  $p<0.001$ , and  $F(1,29)=7.84$ ;  $p<0.01$ , respectively]. Additionally, preexposed rats given 1.5 mA engaged in more freezing behavior than non-preexposed rats that received the same treatment [ $F(1,29)=9.33$ ;  $p<0.005$ ].

**Percentage of freezing:** The ANOVA revealed significant main effects of preexposure [ $F(1,29)=6.59$ ;  $p<0.05$ ] and conditioning [ $F(1,29)=23.02$ ;  $p<0.05$ ]. According to post hoc tests, preexposure and conditioning with 1.5 mA increased the percentage of freezing. Although the interaction did not reach statistical significance level, planned comparisons showed that only preexposed rats trained

with 1.5 mA differed from the other groups [all  $F_s(1,29) \geq 5.34$ ; all  $p_s < 0.05$ ].

**Fecal boli:** The ANOVA revealed a significant preexposure  $\times$  conditioning interaction [ $F(1,29) = 6.65$ ;  $p < 0.05$ ], showing that preexposed control rats defecated less than those in the other groups.

These results show a similar pattern to the one observed in Experiment 1a, indicating that the transport cage plays a minimal role in the expression of fear observed in pre- and non-preexposed rats in that experiment.

## 5. Discussion

The present study was designed to explore contextual conditioning in preweanling and weanling rats using the CPFE, with some variations in the design with respect to previous studies employing the same procedure in this ontogenetic period. Briefly, these modifications consisted of the inclusion of a non-shocked control group, the analysis of an exhaustive ethogram of the rat behavior, and the use of two shock intensities (0.5 and 1.5 mA). The main results obtained in this study are discussed below.

### 5.1. The footshock modified the behavior of rats in the training context in accordance with context preexposure and footshock intensity

In preweanling and weanling rats, our results showed clear evidence of fear in the training context. In weanling rats, the analysis of the percentage of freezing revealed a similar pattern to the one reported by other authors [2,9,16–18]; i.e. levels of freezing in preexposed subjects treated with 1.5 mA were higher in non-preexposed ones treated with the same intensity of footshock (Experiments 1a and 4). Non-shocked controls have not been included in previous studies analyzing the ontogeny of the CPFE. The level of freezing displayed by non-preexposed subjects (the immediate shock deficit effect) has been interpreted as a baseline level indicative of a lack of conditioning, with this group thought to control for possible sensitization or pseudo-conditioning effects. In our study, non-preexposed subjects trained with footshock (1.5 mA) spent more time freezing than non-shocked controls, indicating that the footshock induced some degree of fear in these animals. The analysis of the remaining dependent variables from the ethogram that we employed revealed important results. The footshock (0.5 or 1.5 mA) suppressed grooming and induced defecation, regardless of context preexposure. Preexposure affected vertical exploration induced by shock, which was suppressed in preexposed subjects, while in non-preexposed rats it was increased during the first testing minute. Finally, the most intense footshock (1.5 mA) suppressed horizontal exploration, regardless of the preexposure condition.

Overall, these results show clear evidence of fear in rats trained with footshock, and indicate that the way in which animals' behavior changes in response to the conditioning treatment varies in accordance with context preexposure and footshock intensity. The behaviors measured were mutually exclusive. For this reason it is obvious that the most intense footshock (1.5 mA), which increased freezing, also suppressed horizontal exploration. This could explain the inhibition of grooming in rats treated with 1.5 mA. However, the less intense footshock (0.5 mA) did not increase freezing or reduce horizontal exploration, but did inhibit grooming. Two important conclusions can be drawn from these data. Firstly, the absence of freezing does not necessarily indicate an absence of fear (or memory deficit). For example, the 0.5 mA treatment did not induce freezing, but did suppress grooming and induce defecation regardless of the preexposure treatment. Secondly, grooming inhibition

may be a more sensitive index of fear than freezing, at least in weanling rats.

Another example of how the behavior of trained rats varies in accordance with context preexposure emerges from the analysis of vertical exploration. During the first testing minute, non-preexposed rats spent more time wall climbing than those in the other groups (Experiments 1a and 4). This result was also observed in preweanling rats (Experiment 1b). However, in preexposed rats the shock suppressed vertical exploration (Experiment 1b). The increased wall climbing response displayed by non-preexposed rats during the first testing minute may indicate that these subjects were trying to escape from the testing chamber. There are some behavioral data which are consistent with this interpretation. For example, wall climbing was markedly expressed by non-preexposed conditioned subjects immediately after they were placed in the testing chamber (first testing minute). After the first minute, this behavior was no longer observed (probably because the animals learned that they could not escape from the testing environment), and subjects started to display freezing behavior. In Experiment 1a, during the first two testing minutes, freezing was significantly higher in preexposed than in non-preexposed conditioned rats (with 1.5 mA), and non-preexposed rats trained with 1.5 mA spent more time freezing than non-shocked controls only after the first testing minute (and no difference was observed in the wall climbing response in non-preexposed groups after this minute). This interpretation is also consistent with prior evidence obtained with adult rats, showing that rats trained with an immediate shock show evidence of fear conditioning in terms of freezing and defecation [21,22]. Interestingly, at the beginning of the testing session adult rats trained with the immediate shock procedure displayed freezing instead of trying to climb up the walls of the chamber [22]. One possible explanation for the ontogenetic difference could be the ontogenetic changes occurring in the expression of wall climbing. Wall climbing is elicited easily in preweanling rats by aversive stimuli, such as bitter tastes or footshock [27,28], or in response to aversive conditioned stimuli [29], but declines with age [28] and is difficult to observe in adult rats.

The analysis of preweanling rats revealed a similar pattern of results. Preexposed subjects trained with 1.5 mA engaged in more freezing behavior than those from the other conditions (the CPFE). The remaining dependent variables analyzed in preweanling rats also revealed important data. Preexposed rats trained with 1.5 mA started to groom later during the testing session and defecated more than controls. The behavior of non-preexposed subjects was also affected by the shock. The non-preexposed group treated with 1.5 mA showed increased wall climbing at the beginning of the testing session (similarly to weanling rats from the same experimental condition), and also defecated more, groomed less and spent more time immobilized than their respective control group. This result shows strong evidence of fear in preweanling rats regardless of the preexposure treatment.

The behavioral indexes that we measured (freezing, vertical exploration and grooming) has been also sensitive to detect cue or contextual fear conditioning in adult rats. The presence of a conditioned stimulus previously paired with a footshock not only increases freezing, but also inhibits vertical exploration or grooming [30,31]. Overall, this pattern of behavior (including freezing and inhibition of behavior) is interpreted as a defensive reaction of the organism to a threat [30,32]. Interestingly, the pattern of fear responses in adult rats depends on the footshock intensity. Similarly to our observations, it has been reported that fear conditioning induced by a mild shock is expressed through a reduction in vertical exploration or grooming, but not necessarily through freezing [30]. A similar conclusion is derived from our study and the one by Wohr et al. [30]: immobility should not be used as the sole behavioral



measure, especially when low footshock intensities are employed as the unconditioned stimulus.

One important question derived from Experiment 1 was whether these fear responses are indicative of conditioned fear or are sensitized responses to the training context as a consequence of the footshock experience. In other words, experience with the footshock might sensitize stress induced by the context. To answer this question we will now discuss the results obtained in Experiment 2.

### 5.2. Are shock-induced fear behaviors expressed in an alternative and unknown environment?

In Experiment 2, rats were tested in an environment different from the one employed at training. In this unfamiliar chamber, weanling rats trained with footshock showed strong evidence of fear, regardless of context preexposure and the intensity of the footshock. Conditioned weanling rats spent less time exploring the new environment (horizontally and vertically), groomed less and displayed more freezing than controls. Defecation was also increased by the previous shock treatment. In Experiment 2b, however, no evidence of fear responses was observed in preweanling rats in this new environment.

Experiment 3 explored whether fear responses found in the new environment could have been elicited by the transport cage. To test this hypothesis, rats were transported to the testing environment in their home-cage. Some of the behaviors elicited in the case of the less intense footshock were attenuated (the 0.5 mA footshock only inhibited grooming), but the 1.5 mA footshock still increased freezing and suppressed grooming and exploration. Hence, the transport cage may contribute to the expression of some (although not all) behaviors when 0.5 mA is used as the unconditioned stimulus. In the case of the most intense shock, however, the transport cage seems not to play an important role in the expression of fear behaviors either during training (Experiment 4) or in the alternative context (Experiment 3).

The results of these experiments indicate that in weanling, although not in preweanling rats, footshock alters the pattern of behavior in a new environment. It is important to understand the nature of these fear responses in the novel environment. One possibility is that they are the result of the generalization of conditioned fear mediated by possible common features of the training environment and the new environment. However, our results do not completely support this possibility. Firstly, in the new environment, the pattern of behavior altered by the shock was not affected by the preexposure treatment. However, in the training context (Experiments 1a and 4), some of the dependent variables (freezing, wall climbing and horizontal exploration) were substantially affected by context preexposure. If fear responses in the novel environment were indeed produced by the generalization of conditioned fear, a similar pattern of behavior would be expected in both contexts. Furthermore, the fact that the preexposure by conditioning interaction was only observed in the training context, and not in the novel one, also suggests at least a certain degree of context discrimination, both in preexposed and non-preexposed rats. Secondly, the temporal analysis of the behavior shows that the pattern of expression of some indexes is different in training and in the novel environment. Although the ANOVA showed that preexposed rats trained with 1.5 mA behaved similarly in both environments (increased defecation and freezing, and reduced wall climbing, horizontal exploration and grooming), the minute by minute analysis reveals a different temporal pattern of some behaviors. For example, in the training context, by the last minute the level of freezing was similar to the one observed in controls (Figs. 1a and 4), while in the novel environment, at the end of the testing session, levels of freezing expressed by preexposed rats trained with 1.5 mA were higher than those from controls (Figs. 2a and 3). This result

indicates that the freezing response observed in the training context is a conditioned response. It is uncertain why in these subjects freezing decreases in the training context and remains high in the novel environment. One possibility is that in the training context, rats learned that the footshock occurred at the beginning of the session. Since they were not shocked during the testing session, during the last minutes they increased exploration.

Our results also suggest that the fear behaviors displayed by non-preexposed rats trained with the footshock are conditioned responses, since they are specific reactions elicited exclusively by the training context. For example, during the first minute, these subjects engaged in more vertical exploration of the testing chamber than controls, and freezing was observed only after the first testing minute. However, in the novel environment, these subjects spent more time immobilized than controls even at the beginning of the testing session.

Finally, another result that makes it difficult to accept the generalization hypothesis is that shock-induced fear responses in the novel environment were observed in weanling but not in preweanling rats. Considering that infant rats open their eyes on PD15, it is less likely that they process visual aspects of the context in comparison with weanling rats [11,12]. Hence, since our context is mainly constituted by texture and visual features (no explicit odors were added), a lesser degree of generalization should be expected across environments in weanling than in preweanling subjects. However, our data showed the opposite result.

If the fear responses displayed in the novel environment cannot be completely explained by generalization across environments, alternatively, they could be sensitized fear responses. In the novel and training contexts, non-shocked control rats also defecated and displayed freezing, although the level of these responses was low (in comparison with conditioned rats). We have explicitly compared data from control (non-shocked) preweanling and weanling rats in both contexts. This analysis revealed that in the novel context, rats defecated and spent more time engaged in freezing behavior than in the training cage, regardless of the preexposure treatment (see Figs. 1 and 2). If these variables are indicative of fear, it seems that the novel environment employed was more stressful for the rats than the training cage. Prior experience with the footshock may have sensitized the fear response induced by the novel environment. In adult rats, it has been also observed that an experience with an inescapable footshock can induce freezing and defecation in a novel open-field (for example, Anderson et al. [34]). If the sensitization hypothesis is correct, our results indicate that this process occurred in weanling, but not in preweanling rats. We know of no previous studies showing ontogenetic differences (between preweanling and weanling rats) in the effect of prior experience with a footshock on open-field behavior. This possibility requires further empirical support.

### 5.3. The CPFE and contextual conditioning in preweanling rats

Several studies failed to find the CPFE in preweanling rats [2,9,16,17]. In these studies, preexposure to the context before conditioning did not increase freezing in preweanling rats (in comparison with a group that was trained in the immediate shock procedure). However, we observed that preexposed rats trained with 1.5 mA engaged in more freezing and in less horizontal exploration than controls or non-preexposed rats trained with the same footshock (Experiment 1b). We do not know the reason for the discrepancy across studies. One possibility is that in the present study, non-preexposed rats were not removed from the home-cage during the preexposure phase. In this phase they were handled and then put back in their home-cage. Some of the differences between our results and previous studies may be related to this procedural difference. However, in the study conducted by Foster and Burman

[9] using the CPFE procedure, non-preexposed rats were not placed in any environment during the preexposure phase (similarly to in our procedure), and their results are similar to those reported by other authors that preexposed subjects to a different environment [2,16,17].

There are other differences also that may explain discrepancies across studies, but they need further empirical investigation. In our study, we only employed males, while the remaining studies using the CPFE procedure at this age used both males and females. However, none of these studies reported differences across sex. There may also be strain differences in the ontogeny of contextual fear conditioning. We employed Wistar rats, while Stanton's group used Long Evans, and Foster and Burman used Sprague-Dawley.

#### 5.4. Theoretical implications derived from the present study

Some empirical results have shown that preweanling rats acquire weak contextual fear conditioning, while this kind of learning is stronger in weanling rats. To explain this ontogenetic difference, some authors alluded to an immaturity of those brain structures (or their connections) underlying the acquisition of contextual fear conditioning (dorsal hippocampus) [1–3,9]. The CPFE is a procedure that enables researchers to separate the role of the hippocampus in the acquisition of contextual fear conditioning [6,8]. During the preexposure phase, preexposed subjects can form a hippocampus-dependent contextual representation. At conditioning, this representation can be retrieved and the aversive contextual memory formation occurs in this condition, but not in non-preexposed rats. Our behavioral analysis showed evidence of conditioned fear in preweanling rats using this procedure, although not only in the preexposed condition, but in non-preexposed rats also. Hence, if the CPFE requires the formation of a configurational representation of the context, and a mature and functional dorsal hippocampus, our results suggest that 17-day-old Wistar rats can acquire this representation, and that this structure seems to be functional. Our findings also extend the previous observations made by Bevins et al. [21,22], showing evidence of conditioning after an immediate shock procedure, but in this case, during an earlier stage of development. Our study does not indicate whether rats are responding to the context or to separate elements of the environment (such as, for example, the grid floor). It is possible that non-preexposed rats, at conditioning, have enough time to distinguish this novel surface (very different from the floor of their home-cage) on which they receive the footshock. At testing, they could recognize this element and respond to the presence of the grid floor, rather than to the context. Future studies will be required to explore the nature of this conditioned response and the mechanisms underlying conditioning induced by an immediate shock training [21], which should be functional during the preweanling period.

The CPFE does not necessarily imply a lack of learning in the immediate shock condition. This effect is based theoretically on a learning deficit which is alleviated by preexposure to the context, and it is deduced from the observation of freezing behavior. In our study we have consistently found (experiments 1a, 1b and 4) higher levels of freezing in preexposed rats trained with the foot-shock (1.5 mA) than in those non-preexposed, but considering the remaining dependent variables, it is difficult to conclude that this difference necessarily implies a learning deficit. At testing, preexposed and non-preexposed rats trained with foot-shock showed similar levels of defecation and grooming inhibition, and the temporal pattern of expression of vertical exploration was different in these conditions. Alternatively these results could indicate that preexposed and non-preexposed rats were expressing fear differentially due to the different amount of information that they had about the context. Non-preexposed rats were more engaged

in exploration than preexposed subjects, a behavior that it is incompatible with the expression of freezing. However, in both, preexposed and non-preexposed rats, grooming is reduced and defecation is induced at the same level. This interpretation is also coherent with the fact that weanling rats trained with 0.5 mA did not show evidences of CPFE in terms of freezing. With this foot-shock intensity evidences of fear were similar in preexposed and non-preexposed rats in terms of defecation and suppression of grooming. With this foot-shock intensity evidences of preexposure were only observed in terms of wall climbing (non-preexposed rats exhibited this behavior in the first testing minute, while preexposed rats showed inhibition of vertical exploration during the testing session). Hence, although our results showed a clear context preexposure effect, it seems more prudent to interpret differences between preexposed and non-preexposed rats in terms of differential expression of fear than in terms of a memory deficit.

#### 5.5. Concluding remarks

Procedural variations added to the CPFE paradigm allowed us to detect evidence of contextual fear conditioning in preweanling and weanling rats, as well as evidence of conditioned fear in non-preexposed rats from both age groups. Our study also shows that selecting other behaviors than freezing as indexes of conditioning allows the use of a less intense foot-shock (than the one normally employed) to study contextual conditioning in this ontogenetic period. Furthermore, the absence of freezing does not necessarily indicate an absence of memory, and there seem to be alternative indexes that are more sensitive to conditioning effects. The present study highlights, for future ontogenetic studies, the importance of considering multiple behaviors, because different conclusions about memory can be drawn from different measures [33].

#### Acknowledgments

The authors would like to thank to Dr. Pamela Hunt and Dr. Gabriela Chotro for helpful discussion and criticism, Dr. Paula Abate for her support and suggestions. We would like to specially thank to the remaining lab members (S. Castelló, D. Revillo, G. Fernández and C. Mlewski) and to the technicians of the vivarium and B. Haymal for their assistance. This work was supported by grants from FONCyT (PICT 05-38084) to F.A.K., S.F. and G.P., FONCyT (PICT 07-2168) to M.V.P., S.F., F.A.K., C.A. and G.P., Ministerio de Ciencia y Tecnología, Gobierno de la Provincia de Córdoba (2008) to M.V.P., C.A. and G.P., Subprograma Ramón y Cajal (MEC – Spain) to C.A.

#### References

- [1] Rudy JW. Ontogeny of context-specific latent inhibition of conditioned fear: implications for configural associations theory and hippocampal formation development. *Developmental Psychobiology* 1994;27:367–79.
- [2] Schiffino FL, Murawski NJ, Rosen JB, Stanton ME. Ontogeny and neural substrates of the context preexposure facilitation effect. *Neurobiology of Learning and Memory* 2011;95:190–8.
- [3] Hunt PS, Fanselow MS, Richardson R, Mauk MD, Freeman Jr JH, Stanton ME. Synapses, circuits, and the ontogeny of learning. *Developmental Psychobiology* 2007;49:649–63.
- [4] Rudy JW, Morledge P. Ontogeny of contextual fear conditioning in rats: implications for consolidation, infantile amnesia, and hippocampal system function. *Behavioral Neuroscience* 1994;108:227–34.
- [5] Rudy JW, Huff NC, Matus-Amat P. Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2004;28:675–85.
- [6] Fanselow MS. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behavioural Brain Research* 2000;110:73–81.
- [7] Kim JJ, Rison RA, Fanselow MS. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. *Behavioral Neuroscience* 1993;107:1093–8.
- [8] Rudy JW. Context representations, context functions, and the parahippocampal-hippocampal system. *Learning and Memory* 2009;16:573–85.

- [9] Foster JA, Burman MA. Evidence for hippocampus-dependent contextual learning at postnatal day 17 in the rat. *Learning and Memory* 2010;17:259–66.
- [10] Esmoris-Arranz FJ, Mendez C, Spear NE. Contextual fear conditioning differs for infant, adolescent, and adult rats. *Behavioural Processes* 2008;78:340–50.
- [11] Brasser SM, Spear NE. Contextual conditioning in infants, but not older animals, is facilitated by CS conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory* 2004;81:46–59.
- [12] Brasser SM, Spear NE. A sensory-enhanced context facilitates learning and multiple measures of unconditioned stimulus processing in the preweanling rat. *Behavioral Neuroscience* 1998;112:126–40.
- [13] Pugh CR, Rudy JW. A developmental analysis of contextual fear conditioning. *Developmental Psychobiology* 1996;29:87–100.
- [14] Fanselow MS. Associative vs topographical accounts of the immediate shock-freezing deficit in rats: implications for the response selection rules governing species-specific defensive reactions. *Learning and Motivation* 1986;17:16–39.
- [15] Rudy JW, Wright-Hardesty K. The temporal dynamics of retention of a context memory: something is missing. *Learning and Memory* 2005;12:172–7.
- [16] Jablonski SA, Schiffrino FL, Stanton ME. Role of age, post-training consolidation, and conjunctive associations in the ontogeny of the context preexposure facilitation effect. *Developmental Psychobiology* 2011, <http://dx.doi.org/10.1002/dev.20621>.
- [17] Murawski NJ, Stanton ME. Effects of dose and period of neonatal alcohol exposure on the context preexposure facilitation effect. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 2011;35(6):1160–70.
- [18] Burman MA, Murawski NJ, Schiffrino FL, Rosen JB, Stanton ME. Factors governing single-trial contextual fear conditioning in the weanling rat. *Behavioral Neuroscience* 2009;123:1148–52.
- [19] Raineki C, Holman PJ, Debiec J, Bugg M, Beasley A, Sullivan RM. Functional emergence of the hippocampus in context fear learning in infant rats. *Hippocampus* 2010;20:1037–46.
- [20] Yap CS, Richardson R. Latent inhibition in the developing rat: an examination of context-specific effects. *Developmental Psychobiology* 2005;47:55–65.
- [21] Bevins RA, McPhee JE, Rauhut AS, Ayres JJ. Converging evidence for one-trial context fear conditioning with an immediate shock: importance of shock potency. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 1997;23:312–24.
- [22] Bevins CL, Ayres JJ. One-trial context fear conditioning as a function of the interstimulus interval. *Animal Learning and Behavior* 1995;23:400–10.
- [23] Blanchard RJ, Fukunaga KK, Blanchard DC. Environmental control of defensive reactions to footshock. *Bulletin of the Psychonomic Society* 1976;8:129–30.
- [24] Holson RR, Pearce B. Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicology and Teratology* 1992;14:221–8.
- [25] Singer JB, Hill AE, Nadeau JH, Lander ES. Mapping quantitative trait loci for anxiety in chromosome substitution strains of mice. *Genetics* 2005;169:855–62.
- [26] Rudy JW, Barrientos RM, O'Reilly RC. Hippocampal formation supports conditioning to memory of a context. *Behavioral Neuroscience* 2002;116:530–8.
- [27] Arias C, Chotro MG. Increased preference for ethanol in the infant rat after prenatal ethanol exposure, expressed on intake and taste reactivity tests. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 2005;29:337–46.
- [28] Linville DG, Spear LP. Cholinergic influences on wall climbing and its ontogenetic decline. *Psychopharmacology* 1988;95:200–7.
- [29] Arias C, Pautassi RM, Molina JC, Spear NE. A comparison between taste avoidance and conditioned disgust reactions induced by ethanol and lithium chloride in preweanling rats. *Developmental Psychobiology* 2010;52:545–57.
- [30] Wohr M, Borta A, Schwarting RK. Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: a dose–response study in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory* 2005;84:228–40.
- [31] Blanchard RJ, Blanchard DC. Crouching as an index of fear. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 1969;67:370–5.
- [32] Fanselow MS. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlovian Journal of Biological Science* 1980;15:177–82.
- [33] Spear NE, Riccio DC. In: Heights N, editor. *Memory: phenomena and principles*. MA: Allyn & Bacon; 1994.
- [34] Anderson DC, Crowell C, Koehn D, Lupo JV. Different intensities of unsignalled inescapable shock treatments as determinants of non-shock-motivated open field behavior: a resolution of disparate results. *Physiology & Behavior* 1976;17(3):391–4.