



**FCQ**  
Facultad de  
Ciencias Químicas



**INTERACCIÓN ENTRE UN EVENTO TRAUMÁTICO Y  
LAS FASES DE PROCESAMIENTO DE UNA  
MEMORIA EMOCIONAL: MODULACIÓN  
FARMACOLÓGICA**

**Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas**

**Bioquímico Marcelo Giachero**

**Universidad Nacional de Córdoba**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Departamento de Farmacología**

**IFEC - CONICET**

**Argentina**

**2013**

## **Director de tesis**

Dr. Víctor Alejandro Molina

## **Miembros de la comisión de tesis**

Dr. Gabriel Cuadra

Dr. Gabriel Morón

Dr. Gustavo Nores

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Farmacología, Instituto de Farmacología Experimental Córdoba (IFEC-CONICET) de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, de acuerdo a la reglamentación vigente para optar por el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

La realización de este trabajo contó con Becas Tipo I y Tipo II otorgadas por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), además del apoyo financiero de subsidios otorgados por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Agencia Córdoba Ciencia, Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba (MINCyT) y CONICET.

Se deja constancia de la realización de los cursos de posgrado requeridos, así como también de las actividades docentes en las asignaturas Farmacología, de la carrera de Bioquímica y Farmacología I y Farmacología II de la carrera de Farmacia, contando para ello con un cargo de Profesor Asistente (Dedicación Simple) obtenido por concurso.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	vii
INTRODUCCIÓN .....	1
Aprendizaje y memoria .....	2
Sistemas de memoria.....	3
Fases de procesamiento de la memoria.....	6
<i>Consolidación.....</i>	<i>6</i>
<i>Evocación .....</i>	<i>9</i>
<i>Reconsolidación.....</i>	<i>12</i>
<i>Consolidación vs reconsolidación .....</i>	<i>16</i>
Estrés .....	17
<i>Concepto.....</i>	<i>17</i>
<i>Respuesta de estrés .....</i>	<i>22</i>
Memoria emocional de miedo .....	25
Condicionamiento de miedo .....	26
Neuroanatomía de los circuitos de miedo.....	28
<i>La amígdala .....</i>	<i>28</i>
<i>Circuitos neuronales que subyacen el condicionamiento de miedo contextual.....</i>	<i>30</i>
Influencia del estrés sobre la memoria de miedo.....	31
<i>Efecto del estrés sobre la consolidación de la memoria de miedo .....</i>	<i>32</i>
<i>Efecto del estrés sobre la reconsolidación de la memoria de miedo.....</i>	<i>34</i>
Plasticidad estructural y memoria.....	35
Plasticidad estructural y estrés .....	39
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
RESULTADOS .....	53
Objetivo específico 1.....	54
<i>Analizar la memoria resultante de la interacción entre un evento estresante y la evocación de una memoria de miedo ya establecida.....</i>	<i>54</i>
Objetivo específico 1.1.....	55

<i>Determinar si el efecto del estrés sobre la memoria de miedo es dependiente de la re-exposición al contexto de entrenamiento.</i> .....	56
<b>Objetivo específico 1.2</b> .....	<b>57</b>
<i>Determinar si la memoria resultante se debe a una respuesta de sensibilización al estrés producto de la experiencia previa del shock eléctrico.</i> .....	57
<b>Objetivo específico 2</b> .....	<b>59</b>
<i>Determinar si la interrupción de la memoria de miedo establecida previene la facilitación del estrés al momento de la evocación.</i> .....	59
<b>Objetivo específico 3</b> .....	<b>62</b>
<i>Investigar el efecto de la infusión previa al estrés de un agente benzodiazepínico (midazolam) en la ABL sobre la memoria de miedo resultante después de la evocación.</i> .....	62
<b>Objetivo específico 4</b> .....	<b>64</b>
<i>Analizar la contribución relativa de los procesos de consolidación y reconsolidación en la generación de la memoria de miedo resultante.</i> .....	64
<b>Objetivo específico 4.1</b> .....	<b>64</b>
<i>Evaluar la participación del gen de expresión temprana Zif268 hipocampal en la memoria resultante.</i> .....	64
<b>Objetivo específico 4.2</b> .....	<b>67</b>
<i>Evaluar el efecto sobre la memoria resultante de la inhibición de la degradación proteica mediante la infusión intra-hipocampo dorsal de clasto-lactacistina-<math>\beta</math>-lactona (<math>\beta</math>-lac).</i> .....	67
<b>Objetivo específico 4.3</b> .....	<b>69</b>
<i>Evaluar la participación del BDNF hipocampal en la memoria resultante.</i> .....	69
<b>Objetivo específico 5</b> .....	<b>73</b>
<i>Evaluar la plasticidad estructural en el hipocampo dorsal potencialmente asociada a la memoria resultante de la interacción entre un evento estresante y una traza de memoria de miedo ya establecida.</i> .....	73
<b>Objetivo específico 5.1</b> .....	<b>75</b>
<i>Evaluar la influencia de la modulación de la neurotransmisión GABAérgica en la ABL sobre la plasticidad estructural en el hipocampo dorsal potencialmente asociada con la memoria de miedo resultante.</i> .....	75
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>78</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>87</b>

# RESUMEN

El presente estudio investigó la memoria de miedo resultante de la interacción entre una experiencia estresante y la evocación de una traza de memoria de miedo ya establecida. Esta combinación aumentó tanto la expresión como la retención de miedo en ratas Wistar adultas. Del mismo modo, la infusión local de un agente benzodiazepínico (midazolam) en la amígdala basolateral (ABL) antes del estrés atenuó la potenciación de la memoria de miedo, lo que sugiere la participación de una reducción inducida por el estrés de la transmisión GABAérgica en la ABL en el efecto promotor del estrés. Por otro lado, se ha sugerido que mientras el gen de expresión temprana *zif268* está involucrado en el proceso de reconsolidación, la expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en el hipocampo dorsal (HD) está altamente correlacionada con la consolidación. Por lo tanto, se evaluó la contribución relativa de estos dos procesos neurobiológicos a la memoria de miedo resultante de la interacción mencionada anteriormente. La infusión local en el HD de un oligonucleótido antisentido contra *Zif268* o de un inhibidor de la degradación de proteínas (clasto-lactacistina- $\beta$ -lactona), la cual se sugiere estar implicada en el proceso de desestabilización inducida por la evocación, no afectó a la memoria contextual resultante. En contraste, la inhibición del BDNF hipocampal atenuó la influencia promotora del estrés sobre la retención de miedo. Además, la experiencia de evocación elevó el nivel del BDNF en el HD 60 minutos después de la evocación exclusivamente en los animales estresados. Estos hallazgos sugieren la implicancia de un mecanismo sensible a BDNF hipocampal en el efecto promotor del estrés sobre la memoria de miedo después de la evocación. Por otra parte, la combinación entre el procedimiento de condicionamiento de miedo y el estrés aumentó el número de espinas dendríticas maduras en el HD. Este aumento de la densidad de las espinas dendríticas en el HD fue impedido por la infusión local del midazolam en la ABL antes del estrés. Estos resultados destacan el rol de la atenuación de la neurotransmisión GABAérgica en la ABL en la influencia del estrés sobre la memoria de miedo y la remodelación sináptica hipocampal. En conclusión, la plasticidad estructural en el HD se asocia a la facilitación de la memoria de miedo después de la combinación del condicionamiento de miedo y el evento estresante.

The present study investigates the fear memory resulting from the interaction of a stressful experience and the retrieval of an established fear memory trace. Such combination enhanced both fear expression and fear retention in adult Wistar rats. Likewise, midazolam intra-basolateral amygdala (BLA) infusion prior to stress attenuated the enhancement of fear memory thus suggesting the involvement of a stress-induced reduction of the GABAergic transmission in BLA in the stress-induced enhancing effect. It has been suggested that, unlike the immediate-early gene *zif268* which is related to the reconsolidation process, the expression of hippocampal brain derived neurotrophic factor (BDNF) is highly correlated with consolidation. We therefore evaluate the relative contribution of these two neurobiological processes to the fear memory resulting from the above mentioned interaction. Intra-dorsal hippocampus (DH) infusions of either the antisense *Zif268* or the inhibitor of the protein degradation (clasto-lactasyn- $\beta$ -lactone) suggested to be involved in retrieval-dependent destabilization process, did not affect the resulting contextual memory. In contrast, the knockdown of hippocampal BDNF mitigated the stress-induced facilitating influence on fear retention. In addition, the retrieval experience elevated BDNF level in DH at 60 min after recall exclusively in stressed animals. These findings suggest the involvement of a hippocampal BDNF sensitive mechanism in the stress-promoting influence on the fear memory following retrieval. Furthermore, the combination between the fear conditioning procedure and the stress increased the number of mature dendritic spines in DH. Intra-BLA infusion of midazolam prevented the increase of the density of dendritic spines in DH. These findings emphasize the role of the stress-induced attenuation of GABAergic neurotransmission in BLA in the promoting influence of stress on fear memory and on synaptic remodeling in the DH. In conclusion, the structural remodeling in DH accompanies the facilitated fear memory following the combination of fear conditioning and the stressful stimulation.



A: adrenalina.  
ABL: amígdala basolateral – complejo basolateral de la amígdala.  
ACTH: hormona adrenocorticotrofina.  
AMPA: “*alfa-amino-3-hidroxy-5-metil-4-isoxazole propionic acid*”.  
Arc: “*activity-regulated cytoskeletal protein*”.  
ASO BDNF: ODN antisentido contra BDNF.  
ASO Zif268: ODN antisentido contra Zif268.  
AVP: arginina-vasopresina.  
BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro.  
C/EBP $\beta$ : “*transcription factor CCAAT enhancer binding protein*”.  
CA: contexto A.  
CaMK: proteín-quinasa dependiente de calmodulina/calcio.  
CB: contexto B.  
Ce: núcleo central de la amígdala.  
CREB: “*cAMP-responsive element binding protein*”.  
CRH: hormona liberadora de corticotrofina.  
DCS: D-cicloserina.  
DEPT: desorden de estrés post-traumático.  
E: estrés.  
EC: estímulo condicionado.  
EI: estímulo incondicionado.  
ELK1: “*Ets LiKe gene1*”.  
ERK: “*extracelular signal-regulated kinase*”.  
FT: factor de transcripción.  
GABA: ácido  $\gamma$ -amino butírico.  
GC: glucocorticoides.  
GRs: receptores glucocorticoides.  
HD: hipocampo dorsal.  
HHA: eje hipotálamo-hipófiso-adrenal.  
IKK: “*I $\kappa$ B kinase*” – quinasa del inhibidor del NF- $\kappa$ B.  
ITC: región intercalada – Células intercaladas.  
MAPK: proteín-quinasa activada por mitógenos.  
MCP: memoria a corto plazo.  
MDZ: midazolam.  
MLP: memoria a largo plazo.

MRs: receptores mineralocorticoides.

MSO BDNF: ODN sinsentido contra BDNF.

MSO Zif268: ODN sinsentido contra Zif268.

NA: noradrenalina.

NE: no estrés.

NF- $\kappa$ B: "*nuclear factor-kappa B*".

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NPP: neuronas piramidales de proyección excitatorias.

ODN: oligonucleótido.

PAG: sustancia gris periacueductal.

p-ERK: fosfo-ERK.

PFA: paraformaldehído.

PKA: proteín-quinasa A.

PLP: potenciación a largo plazo.

PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo.

SAL: salina.

SNC: sistema nervioso central.

SUP: sistema ubiquitina-proteosoma.

VGCC: canal de calcio voltaje-dependiente de tipo L.

$\beta$ -lac: clasto-lactacistina- $\beta$ -lactona.

TPA: activador del plasminógeno tisular.

# **INTRODUCCIÓN**

## Aprendizaje y memoria

Los procesos de aprendizaje y memoria, junto a las fuerzas selectivas de la evolución, son muy relevantes para la supervivencia, el bienestar y la adaptación de los organismos complejos.

En el marco de la psicología cognitiva, el aprendizaje se refiere a la adquisición de información acerca del ambiente con la posterior formación de trazas de memoria en un individuo, mientras que desde el punto de vista neurobiológico, este término hace referencia a los cambios neuronales que codifican dichas trazas de memoria en el cerebro del individuo. El aprendizaje puede ocurrir intencionalmente o accidentalmente, tanto en la vida real como en el laboratorio. Además, incluso en situaciones de aprendizaje intencional, el sujeto puede adquirir información accidentalmente además del material de estudio. Esto puede introducir factores de confusión en la interpretación de la consecuencia comportamental de una situación de aprendizaje. La regla general es que el aprendizaje puede ocurrir incluso cuando no tenemos la intención que suceda (Dudai, 2002).

Generalmente, como seres humanos somos de la opinión de que las memorias dan forma a nuestro carácter y personalidad. La conceptualización adecuada del término “**memoria**” es un objetivo crucial ya que orientará a los profesionales de la ciencia de la memoria a centrarse en un nivel de análisis adecuado para la comprensión de los fenómenos biológicos que definen la memoria. La definición clásica de memoria se refiere a esta como los “*cambios duraderos en el comportamiento de un individuo como consecuencia de sus experiencias*”. Se han presentado variaciones de esta definición clásica siendo una de las más importantes aquella que destaca que la memoria a menudo se muestra como cambios latentes en el comportamiento en lugar de cambios manifiestos. En este caso se hace referencia a la memoria como “*el resultado de cambios dependientes de la experiencia no sólo en el comportamiento actual o real sino también en el potencial de comportamiento*”. Esta observación introdujo el “conocimiento”, y no el “rendimiento”, como un atributo esencial de la memoria: la memoria es “*conocimiento organizado que crece y se vuelve más organizado*” (Charniak y McDermott, 1985).

Otra variante que acercaría aún más al objetivo antes mencionado, sustituye el concepto de “conocimiento” por un término relacionado pero más apropiado para el

análisis en neurociencia: “representación interna”. En el sistema nervioso, una representación interna es, específicamente, una versión estructurada del mundo codificada en circuitos neuronales (Dudai, 1989). Estas representaciones internas varían enormemente en su complejidad, desde las más elementales hasta las más complejas en la cognición humana. Por lo tanto, la memoria es la retención de representaciones internas creadas por diferentes experiencias que podrían guiar el comportamiento (Dudai, 1989; 2002).

Desde el punto de vista de la memoria como recuerdo, Tulving y Thompson argumentan que la memoria es una actividad similar a la percepción, en el sentido de que implica la aprehensión y comprensión de estímulos actuales en función de la experiencia pasada. En consecuencia, una nueva memoria, para ser recordada de una manera significativa, debe consolidarse dentro de una memoria preexistente relacionada (Tulving y Thompson, 1973).

## **Sistemas de memoria**

Durante mucho tiempo prevaleció la idea de que la memoria abarcaba dos etapas seriales: una etapa de almacenamiento temporal denominada memoria a corto plazo (MCP) y una etapa de almacenamiento más duradera denominada memoria a largo plazo (MLP). Este sistema temporal de la memoria se basó en los hallazgos de Donald Hebb de una actividad neural transitoria seguida de un cambio más permanente en la transmisión sináptica después de un aprendizaje (Hebb, 1949) (*Ver más adelante*).

En este modelo, propuesto formalmente por Atkinson y Shiffrin (1968), la información sensorial del mundo exterior se codifica inicialmente como MCP. Esta MCP tiene la capacidad de contener una cantidad limitada de información durante un corto periodo de tiempo y puede expresarse inmediatamente después de la adquisición. Esta MCP transitoria se transforma con el tiempo en una MLP más permanente, que puede contener una cantidad aparentemente ilimitada de información durante toda la vida. El pasaje de una MCP a una MLP se convirtió en el sistema de formación de la memoria más aceptado (Figura 1).



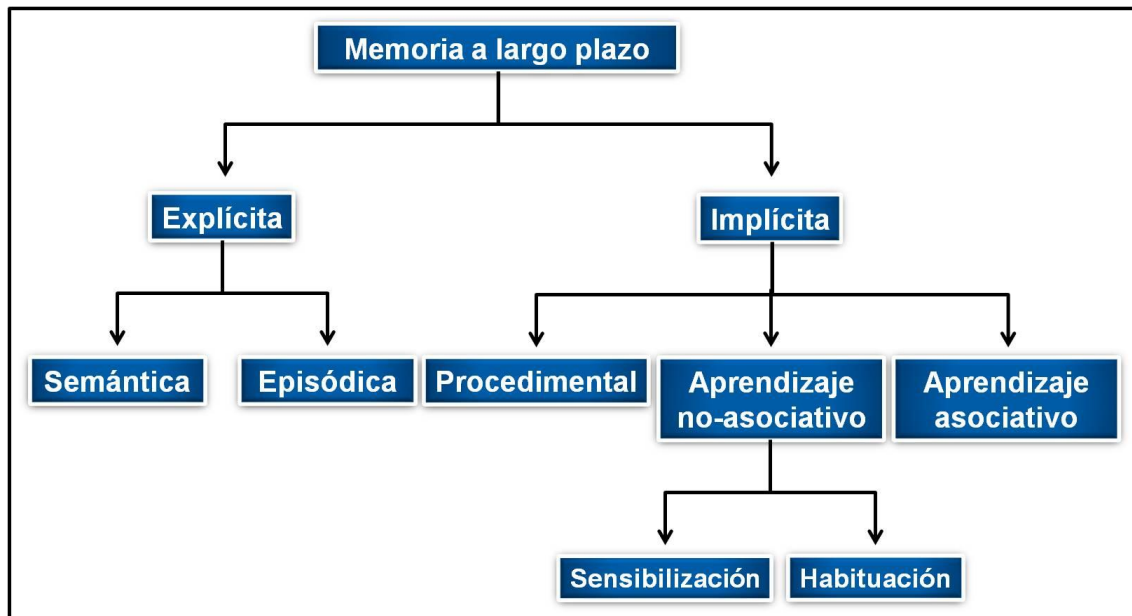
**Figura 1.** Sistema de memoria propuesto por Atkinson y Shiffrin (1968).

Históricamente, en los experimentos de aprendizaje y memoria se han utilizado diferentes paradigmas junto con tratamientos amnésicos globales. Los resultados en un paradigma fueron generalizados a otros, predominando así la noción de que la memoria era un proceso unitario, dirigido en gran parte por los mismos principios, sin importar la naturaleza del estímulo presentado o el comportamiento requerido. Sin embargo, actualmente se considera la existencia de múltiples sistemas de memoria que pueden funcionar independientemente unos de otros, cada uno controlando diferentes tipos de conocimiento y respuestas. Todos estos sistemas tienen acceso a la misma información de las situaciones de aprendizaje, pero cada uno está especializado en representar un tipo de relación entre los elementos de dicha información. Cada representación resultante determina el grado de control ejercido por cada sistema sobre el comportamiento en la presente situación (White y McDonald, 2002).

Se han establecido dos sistemas de MLP: el sistema de memoria explícita o declarativa, dependiente de una recolección consciente y el sistema de memoria implícita o no declarativa, independiente de la conciencia (Figura 2). La memoria explícita o declarativa se divide en dos componentes: la memoria episódica y la memoria semántica (Tulving, 1972). La memoria episódica, también conocida como memoria autobiográfica, almacena información correspondiente a hechos o eventos personales como por ejemplo un viaje familiar a París o el nacimiento de un hijo. La memoria semántica está relacionada con el conocimiento general del mundo, por ejemplo, a quién se conoce como el Libertador de América o cuál es la capital de Francia. La adquisición de la memoria declarativa se asocia con el sistema del lóbulo temporal medial, junto con el hipocampo y sus subestructuras (CA1-CA4, el giro dentado y el subículo), pero su almacenamiento definitivo parece radicarse en diferentes áreas de la corteza cerebral.

La memoria implícita implica un cambio en el rendimiento de una actividad motora o en reacciones autonómicas como resultado de la experiencia previa con un estímulo, pero no involucra ninguna recolección consciente por parte del individuo. La memoria implícita se clasifica en memoria procedimental, no asociativa y asociativa.

La memoria procedimental se relaciona con la realización de una habilidad motora, como conducir un automóvil, andar en bicicleta, jugar al fútbol, etc. Su expresión es en gran medida automática, inconsciente y difícil de verbalizar. Se adquiere gradualmente y se perfecciona con la práctica.



**Figura 2.** Clasificación de los diferentes sistemas de memoria a largo plazo. Adaptado de Knowlton y col., 1996.

El aprendizaje no asociativo se puede subdividir en habituación y sensibilización. La habituación se refiere a una disminución de la respuesta debido a la repetición del estímulo. La sensibilización consiste en la presentación repetida de un estímulo intenso, que conduce al aumento de la respuesta a un estímulo diferente.

El aprendizaje asociativo, también conocido como condicionamiento pavloviano, implica una asociación entre dos estímulos. Hay diferentes formas de aprendizaje asociativo. Entre ellos, se encuentra el condicionamiento de miedo que conduce a la formación de una memoria emocional de miedo (*ver condicionamiento de miedo*).

Las diferentes formas de memoria implícita dependen de diferentes áreas cerebrales. El principal lugar de almacenamiento de la memoria procedimental radica en estructuras subcorticales, como el cuerpo estriado (caudado putamen). Las memorias no asociativas parecen implicar diferentes vías sensoriales. El componente motor de una memoria asociativa depende del cerebelo mientras que el componente emocional del complejo amigdalino.

Consecuentemente, ahora se emplean procedimientos selectivos bien establecidos para estudiar sistemas cerebrales específicos y, así, tipos particulares de aprendizaje y memoria; a modo de ejemplo, el condicionamiento de miedo es frecuentemente utilizado para el estudio de la amígdala, mientras que el laberinto acuático es uno de los procedimientos seleccionados para el estudio del hipocampo (Nader y Hardt, 2009).

## **Fases de procesamiento de la memoria**

Un gran conjunto de evidencias ha demostrado que después de una experiencia inicial de aprendizaje, la nueva información recientemente adquirida se encuentra en un estado inestable, la cual puede estabilizarse por medio de un proceso definido como consolidación. Sin embargo, algunos datos indican que la evocación de la memoria por la presentación de un estímulo recordatorio (una clave o señal asociada al aprendizaje original) puede inducir una fase lábil adicional requiriendo de un proceso activo para estabilizar nuevamente dicha memoria. Este proceso ha sido definido como reconsolidación y se ha propuesto que es un componente importante del procesamiento de la memoria a largo plazo.

Actualmente, múltiples evidencias apoyan el punto de vista de que la memoria es un proceso principalmente dinámico. Elucidar la naturaleza y la evolución temporal de los cambios biológicos que acompañan a la adquisición, el almacenamiento, la evocación y la reconsolidación es clave para comprender los mecanismos involucrados en la formación de la memoria a largo plazo.

## ***Consolidación***

Una de las tradiciones más importantes en la investigación de la memoria se inició hace más de 100 años cuando Müller y Pilzecker propusieron la hipótesis de la consolidación de la memoria (Müller y Pilzecker, 1900). En estudios con humanos, encontraron que la memoria de una información recientemente aprendida fue interrumpida por el aprendizaje de otro tipo de información poco después del aprendizaje original. Este hallazgo sugirió que los procesos subyacentes a las nuevas memorias persisten inicialmente en un estado frágil y se consolidan con el tiempo.

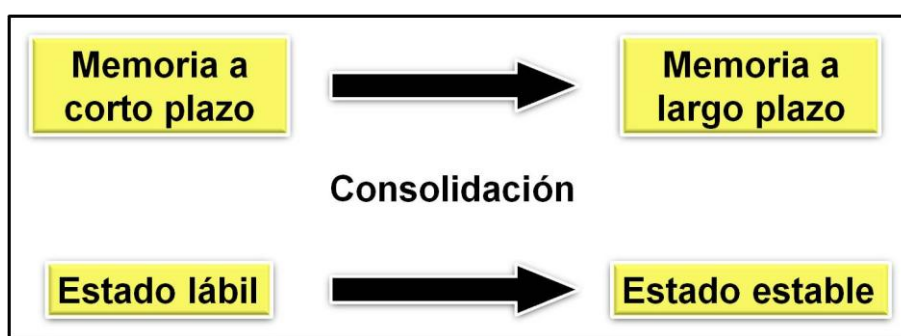
En 1882, el psicólogo francés Théodule-Armand Ribot ya había informado en su monografía *“Enfermedades de la Memoria”* que la probabilidad de amnesia por un trauma cerebral era mayor para memorias recientes que para memorias más remotas (Ribot, 1882). La aparición de la hipótesis de consolidación de Müller y Pilzecker proporcionó una explicación para dicha amnesia retrógrada.

Ignorada por casi medio siglo, la hipótesis de la consolidación se revitalizó en 1949, cuando dos publicaciones informaron que el shock electroconvulsivo inducía amnesia retrógrada en roedores (Duncan, 1949; Gerard, 1949), lo que provocó una explosión de



estudios sobre amnesia retrógrada inducida experimentalmente (Glickman, 1961; McGaugh, 1966).

Donald Hebb proporcionó una explicación fisiológica para el concepto de consolidación de Müller y Pilzecker (Hebb, 1949). Este autor propuso que la estabilización de la actividad neuronal inducida por el aprendizaje era fundamental para la formación de nuevas memorias. Años más tarde se pensó que la actividad neural transitoria post-aprendizaje correspondía a la MCP y si esta actividad no se alteraba, conducía a cambios permanentes en las sinapsis implicadas, permitiendo así la formación de una MLP (Atkinson y Shiffrin, 1968) (Figura 3).



**Figura 3.** Proceso de consolidación de la memoria.

Los hallazgos de que los inhibidores de la síntesis de proteínas no impidieron la adquisición de información pero interrumpieron la formación de una MLP (Agranoff y col., 1965) y que drogas estimulantes administradas minutos u horas después del entrenamiento la potenciaron (McGaugh y Krivanek, 1970) apoyaron la opinión de que la memoria existe en dos estados: un estado lábil, en el cual es susceptible a disrupción o potenciación y un estado estable, en el cual la traza de memoria está consolidada y consecuentemente permanece inmune a estos tratamientos.

Dos modelos de consolidación de la memoria surgieron de la fundamentación empírica establecida por estos trabajos: la consolidación sináptica o celular y la consolidación sistémica.

La consolidación sináptica o celular, un modelo derivado de la investigación en animales de laboratorio, se relaciona estrechamente a la teoría de consolidación inicial de la memoria formulada al comienzo del siglo pasado, ya que describe los mecanismos moleculares que estabilizan los cambios en la eficacia sináptica después de una experiencia de aprendizaje (Dudai, 2004; Kandel, 2001). Al igual que el modelo

de Müller y Pilzecker, la consolidación celular postula que el grado de modificación de la memoria después de la alteración de estos procesos será mayor para memorias más recientes (menor avance de estos procesos). En consecuencia, no se observará una modificación de la memoria cuando el tratamiento se aplique después de que la consolidación se haya completado. Diversas estrategias farmacológicas, genéticas y por medio de lesiones selectivas han ayudado a definir los sistemas cerebrales y los procesos moleculares involucrados en la consolidación de la memoria (Abel y Lattal, 2001). Entre los elementos moleculares estrechamente relacionados a la consolidación sináptica se pueden mencionar: receptores de glutamato, factores de transcripción [*cAMP-responsive element binding protein*] (CREB), [*transcription factor CCAAT enhancer binding protein*] (C/EBP $\beta$ ), c-fos, [*nuclear factor-kappa B*] (NF-kB), Zif268, [*brain derived neurotrophic factor*] (BDNF)], quinasas (proteín-quinasa A, PKA) y otros efectores [*activity-regulated cytoskeletal protein*] (Arc), activador del plasminógeno tisular (TPA)] (Maren y col., 1996; Melchor y Strickland, 2005; Alberini, 2009).

La consolidación sistémica, por otro lado, es una hipótesis que se refiere a un proceso de transferencia o de reorganización de la memoria más que a un proceso de estabilización, y describe un cambio tiempo-dependiente en los sistemas cerebrales que mantienen la memoria. La investigación que dio origen a este modelo comenzó con el estudio de Scoville y Milner (1957) sobre el caso de Henry Gustav Molaison, más conocido como el paciente HM, quien perdió la mayor parte del lóbulo temporal medial en una cirugía para aliviar su epilepsia intratable. La operación le provocó un profundo deterioro de la formación de nuevas memorias episódicas (amnesia anterógrada) y una pérdida de tales memorias de años anteriores (amnesia retrógrada). Su caso y otros similares, sugieren que el hipocampo inicialmente trabaja con la neocorteza para consolidar la memoria pero, con el tiempo, gradualmente su rol se torna menos crítico. En contraste, los cambios temporales en la neocorteza se vuelven exclusivamente esenciales para el almacenamiento de la información mediante el aumento de la conectividad entre diversas áreas corticales (Squire y Alvarez, 1995). Al igual que el modelo de consolidación celular, la consolidación sistémica supone una sensibilidad de la memoria a tratamientos amnésicos temporalmente graduada: menos completa es la consolidación sistémica, más memoria será afectada después del daño hipocampal.

Dadas las definiciones operativas, es importante señalar que el término “consolidado” significa que la memoria es insensible a cualquier tratamiento. Así, el

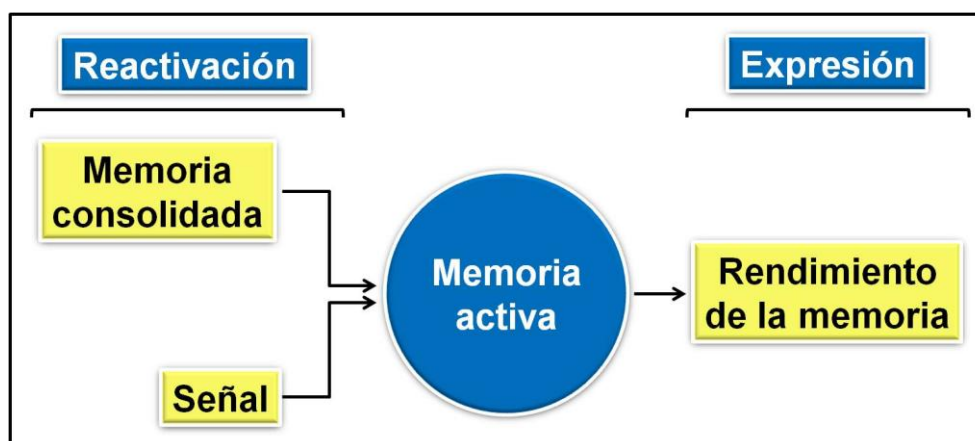
término no implica que todos los cambios moleculares y celulares inducidos por el aprendizaje se hayan completado. De hecho, los cambios nunca podrían completarse; podrían continuar en cierta medida durante toda la vida útil de una traza de memoria.

## Evocación

Para el análisis funcional de las fases de la memoria, el estudio sobre la evocación cumple un rol relevante ya que el recuerdo efectivo es la única prueba de que la memoria existe (James, 1890). La evocación es un proceso complejo mediante el cual la información previamente adquirida puede ser utilizada.

En el marco cognitivo, Endel Tulving propuso que la evocación puede subdividirse en dos procesos separados: la reactivación y la conversión. La reactivación (Tulving la llamó “*ecphory*”) se refiere al proceso por el cual la información de evocación, proporcionada por una señal, se correlaciona con la información almacenada en una traza de memoria. El producto de esta correlación posibilita la segunda etapa de la evocación, la conversión. Dicha etapa abarca la experiencia subjetiva del recordatorio y la performance correspondiente de la memoria (Tulving, 1983).

Desde el punto de vista neurobiológico, la reactivación también es considerada como la etapa inicial de la evocación y corresponde al proceso de activación de los sistemas neurales que codifican la traza de memoria. Operacionalmente, dicha etapa resulta de la re-exposición a la información adquirida durante el entrenamiento. En otras palabras, la reactivación supone el pasaje de una memoria de un estado inactivo a uno activo, lo cual puede o no manifestarse comportamentalmente (Lewis, 1979). Por lo tanto, la performance durante un test de evocación no debe ser un atributo definitorio de la formación de una memoria relevante (Figura 4).



**Figura 4.** Representación esquemática de las dos fases de la evocación de la memoria: reactivación y expresión.

El fenómeno de reactivación de la memoria inducida por una señal surgió a finales de 1960, en el marco de un desafío a la hipótesis de la consolidación (Lewis, 1969), ya que pudo inducirse amnesia retrógrada para una memoria ya establecida, cuando los animales son expuestos a señales asociadas con el episodio de entrenamiento (Misanin y col., 1968). Este procedimiento fue referido descriptivamente como “amnesia dependiente de una señal”. Luego, esta expresión fue reemplazada por un término que resalta el proceso de estabilización que presumiblemente tiene lugar después de la reactivación: “reconsolidación” (Przybylski y Sara, 1997; Sara, 2000).

Como se expondrá más adelante, los estudios de reconsolidación proponen que la experiencia de la evocación de memorias ya consolidadas puede “desestabilizar” la traza de memoria y en consecuencia inducir un estado inestable, requiriendo así un nuevo período de estabilización dependiente de síntesis proteica, llamado reconsolidación, cuya principal finalidad es mantener la traza de memoria (Tronson y Taylor, 2007; Hardt y col., 2010) y permitir su actualización o “*updating*” (Morris y col., 2006; Lee, 2010).

En consecuencia, la evocación de la memoria ha sido utilizada principalmente como una herramienta destinada a estudiar el proceso de reconsolidación. Sin embargo, es oportuno reconsiderar a la evocación como un proceso en sí mismo, es decir, no sólo como una etapa preliminar de la reconsolidación, sino como una etapa distinta del procesamiento de la memoria que tiene un rol fundamental con respecto a las memorias pre-existentes.

Dentro de este contexto es importante destacar la siguiente declaración de Yadin Dudai (2002): *“la evocación no es una mera lectura pasiva de la información, sino que también es una experiencia; por lo tanto, una vez evocada la memoria es poco probable que permanezca exactamente igual”*.

Se propone que la evocación de la memoria puede resultar en dos efectos principales: (1) la inducción de maleabilidad de la memoria y (2) el incremento en la accesibilidad de la memoria.

La maleabilidad es una condición que permite la integración de nueva información a la memoria preexistente (“*updating*”), un fenómeno ampliamente abordado por los estudios de reconsolidación (Nader y Hardt, 2009; Sara, 2010; Alberini, 2011; McKenzie y Eichenbaum, 2011). La capacidad de integrar nueva información es

transitoria y puede ser detectada poco después de la evocación, sin que necesariamente participe un proceso de reconsolidación (Tronel y col., 2005; Rudy y col., 2002; Lee, 2010).

El incremento de la accesibilidad inducido por la evocación se asocia a un fortalecimiento de la performance de retención. En algunos casos, se ha demostrado que la evocación puede revertir la amnesia retrógrada resultante de la interrupción de la consolidación de la memoria (Lewis y col., 1969; Quartermain y col., 1972; Miller y Springer, 1972; Sara, 1973; DeVietti y Hopfer, 1974), así como otros tipos de deterioro de la performance por causas naturales tales como el olvido y el envejecimiento (Gisquet-Verrier y Alexinski, 1986; Gisquet-Verrier y col., 1989). Por lo tanto, la evocación podría definirse como un mecanismo para restablecer la accesibilidad de la memoria. Por otro lado, la evocación es capaz de facilitar la retención en ausencia de cualquier perturbación sobre la consolidación (Rohrbaugh y Riccio 1970; Rohrbaugh y col., 1972). En este caso la facilitación estaría asociada a una mayor accesibilidad a la memoria en lugar de un fortalecimiento “absoluto” de la misma.

En conclusión, la evocación crea un estado transitorio durante el cual el contenido de la memoria es accesible fácilmente y puede ser modificado y/o actualizado. Como ambos aspectos se alcanzan rápidamente se infiere que son el resultado directo de la evocación de la memoria *per se*. De esto se desprende que la reconsolidación no es siempre requerida para estos procesos y resalta a la evocación como un factor importante en la dinámica de la memoria (Gisquet-Verrier y Riccio, 2012).

Si bien aquí se reconoce a la evocación como una etapa importante dentro de la dinámica de la memoria, los mecanismos moleculares subyacentes a este proceso han sido escasamente estudiados. La mayoría de las publicaciones se han centrado en los mecanismos implicados en el proceso de desestabilización inducido por la evocación con el objetivo de una mejor comprensión del rol funcional de la reconsolidación, sin considerar a la evocación de la memoria como un proceso en sí mismo, capaz de modificar memorias pre-existentes.

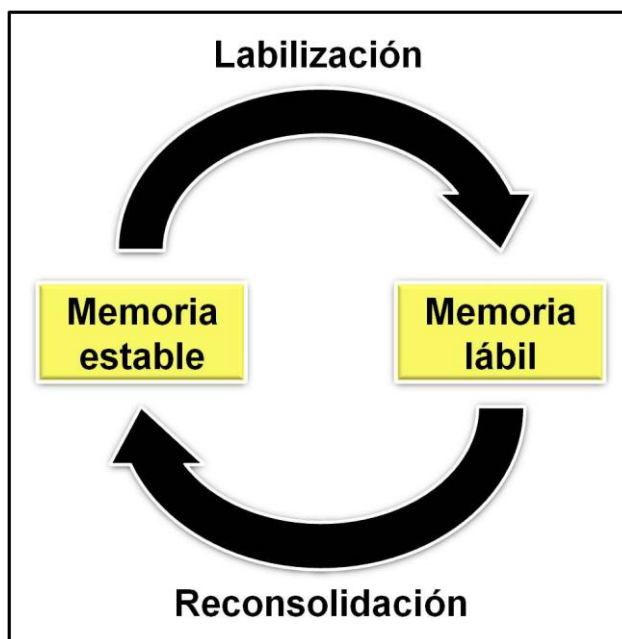
Como se mencionó anteriormente, se considera que la evocación puede desestabilizar la memoria, la cual requiere de un nuevo período de estabilización dependiente de síntesis de proteínas. Existen evidencias que apoyan la idea de que la desestabilización es, en parte, una fase dependiente de la degradación de proteínas

sinápticas en el hipocampo (Lee y col., 2008). Desde esta perspectiva se ha sugerido que la evocación señala el proceso de desestabilización necesario para la modificación de una memoria establecida a través del proceso de reconsolidación (*ver reconsolidación*).

### ***Reconsolidación***

Durante varias décadas se sostuvo que la consolidación de la memoria era un proceso único: una memoria recientemente adquirida pasa irreversiblemente con el tiempo de un estado lábil a un estado estable donde permanece inmune a los efectos de cualquier manipulación (Davis y Squire, 1984). Como se señaló anteriormente, esta teoría estándar de la consolidación fue desafiada cuando Donald Lewis reveló por primera vez la amnesia post-evocación (Lewis, 1979), fenómeno referido como “amnesia dependiente de una señal”. Lewis y sus colegas observaron que la memoria fue susceptible a los efectos amnésicos de un shock electroconvulsivo después de la presentación de una señal asociada con el aprendizaje (recordatorio). Se sugirió entonces que la memoria, tras la evocación, era lábil, como lo fue inmediatamente después de la adquisición (Misanin y col., 1968). Esta fase lábil adicional inducida por el recuerdo no recibió atención hasta 1997, cuando se observó que la evocación de una memoria espacial bien consolidada fue dependiente de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) para mantener la estabilidad (Przybylski y Sara, 1997). Aquí se introdujo el concepto de “reconsolidación” para explicar el proceso por el cual las memorias previamente consolidadas se estabilizan nuevamente después de la evocación (Sara, 2000). En años recientes esta teoría de la reconsolidación ha recibido una mayor atención teórica y una amplia confirmación experimental, demostrándose en una amplia gama de especies (incluyendo a los humanos), en diferentes tareas y regiones cerebrales y con diversos agentes amnésicos y potenciadores (Nader y col., 2000; Pedreira y col., 2002; Anokhin y col., 2002; Eisenberg y col., 2003; Sangha y col., 2003; Walker y col., 2003; Dacher y col., 2005). Por ejemplo, Nader y colaboradores (2000) demostraron que la inhibición de la síntesis de proteínas en la amígdala basolateral (ABL) después de la evocación de una memoria previamente consolidada resultó en una amnesia para la memoria evocada. No se observaron alteraciones de la memoria en ausencia de evocación.

En conclusión, las memorias no se consolidan o estabilizan sólo una vez; al ser evocadas pueden regresar a un estado inestable y necesitan ser reconsolidadas o re-estabilizadas (Figura 5).



**Figura 5.** Labilización (desestabilización) y reconsolidación (re-estabilización) de la memoria después de la evocación.

Aunque la demostración original de un proceso de reconsolidación fue replicada y extendida a otros paradigmas, algunos estudios no han conseguido alterar la memoria después de la evocación (Cammarota y col., 2004), sugiriendo que este proceso no es una propiedad universal de la memoria (Nader y Hardt, 2009). Sin embargo, los resultados negativos pueden definir las condiciones bajo las cuales las memorias no son susceptibles a una alteración permanente, indicando la existencia de factores limitantes para la ocurrencia de la reconsolidación.

Las condiciones limitantes se refieren a situaciones fisiológicas, ambientales o psicológicas que dificultan la inducción de un proceso de reconsolidación. Varias condiciones limitantes han sido propuestas, tales como la edad de la memoria (el tiempo desde el entrenamiento) (Milekic y Alberini, 2002; Frankland y col., 2006), la fuerza de la memoria (la intensidad del entrenamiento) (Suzuki, y col., 2004) y la duración de la sesión de reactivación (Bustos y col., 2009; Pedreira y Maldonado, 2003). Sin embargo, si bajo ciertas condiciones no se detectan efectos sobre la reconsolidación, no se puede concluir con seguridad que se ha encontrado una condición limitante. Actualmente no está claro si estas condiciones son verdaderas condiciones limitantes o situaciones en las que es más difícil inducir reconsolidación.

Igualmente, la importancia del fenómeno no disminuye por el hecho de que la reconsolidación no siempre ocurra. Más bien, esta característica del fenómeno permite una comprensión más profunda de la dinámica de la memoria. Está bien establecido el hecho de que la evocación de una memoria consolidada puede volverla a un estado lábil del que debe ser re-estabilizada con el fin de prevenir la pérdida de la memoria (Nader y Hardt, 2009).

En cuanto al rol funcional de la reconsolidación de la memoria se propone que este proceso tiene una función adaptativa, ya que permite que la memoria existente sea recalibrada rápidamente mediante la adición de nuevos conocimientos y el debilitamiento y/o el fortalecimiento de determinados contenidos de la traza de memoria (Sara, 2000; Dudai, 2006).

Sin embargo, como se expuso en la sección anterior, algunos suponen que la evocación puede crear un estado de plasticidad transitoria durante el cual una memoria puede ser modificada y/o actualizada sin el requerimiento de un proceso de reconsolidación (Gisquet-Verrier y Riccio, 2012).

Se ha reportado que la reconsolidación puede resultar en memorias más persistentes o fuertes, lo que sugiere un rol de la reconsolidación en el mantenimiento continuo de las memorias a largo plazo. Resultados recientes han demostrado que evocaciones repetidas de una memoria, las cuales van acompañadas de reconsolidación, dan como resultado el fortalecimiento de la memoria evitando así la disminución de la respuesta debida al olvido (Inda y col., 2011).

Otro apoyo a la conclusión de que la reconsolidación aumenta la fuerza de la memoria fue dado por Lee (2008) quien informó que un segundo ensayo de aprendizaje fortalece una memoria de miedo contextual de una forma reconsolidación dependiente.

Si bien hay evidencias de que las memorias pueden ser actualizadas después de la evocación, no está del todo claro si esa actualización sigue un proceso de consolidación o reconsolidación. Un estudio indicó que la reconsolidación se produce sólo conjuntamente con la incorporación de nueva información, es decir, que la disponibilidad de nueva información durante la evocación podría ser necesaria para que la reconsolidación ocurra (Rodríguez-Ortiz y col., 2005).



Un método para examinar el rol de la reconsolidación en la actualización de los recuerdos es el de identificar los mecanismos diferenciales de reconsolidación y consolidación (*ver Consolidación vs Reconsolidación*). Así, Lee (2010) demostró que la reconsolidación de la memoria sustenta la actualización del contenido de una memoria contextual dependiente de hipocampo.

La comprensión de los mecanismos moleculares de la reconsolidación podría proporcionar pistas cruciales sobre los aspectos dinámicos de la función mnemónica normal y de los trastornos psiquiátricos que se caracterizan por recuerdos emocionales excepcionalmente robustos y persistentes.

La evocación puede inducir un estado en el cual las sinapsis parecen requerir la síntesis de nuevas proteínas (Nader y col., 2000). Sin la síntesis normal de proteínas, la morfología sináptica y los mecanismos que median la memoria se eliminan o se vuelven disfuncionales.

Varios factores de transcripción (FT) han sido implicados en la reconsolidación de la memoria. Dicha implicancia ha sido demostrada a través de la inhibición específica o la medición de su actividad en diferentes áreas cerebrales después de la evocación. Algunos FT que han mostrado ser críticos para la reconsolidación son el CREB, NF- $\kappa$ B, “*Ets Like gene1*” (ELK1), Zif268 y C/EBP $\beta$  (Kida y col., 2002; Merlo y col., 2005; Miller y Marshall, 2005; Lee y col., 2004; Tronel y col., 2005). Los factores de transcripción son fosforilados por quinasas. La “*extracelular signal-regulated kinase*” (ERK) se requiere para la reconsolidación de recuerdos de miedo condicionado (Duvarci y col., 2005), recuerdos de reconocimiento de objetos (Kelly y col., 2003) y recuerdos formados por un condicionamiento de preferencia a un lugar (Miller y Marshall, 2005). La PKA también es necesaria para la reconsolidación de recuerdos de miedo condicionado (Koh y Bernstein, 2003).

Actualmente, se desarrolla una intensa investigación dirigida a identificar los mecanismos moleculares implicados en la inducción de una memoria consolidada a un estado lábil, fenómeno fundamental para la ocurrencia de la reconsolidación. Recientemente se identificaron a los receptores NMDA en la amígdala (Mamou y col., 2006), a la degradación de proteínas (Lee y col., 2008) y a los receptores de cannabinoides CB1 en el hipocampo (Suzuki y col., 2008) como componentes cruciales para la labilización de la memoria consolidada después de la evocación.

En relación a la participación de los receptores NMDA, recientemente se demostró una doble disociación en la necesidad de receptores NMDA que contienen GluN2B y aquellos que contienen GluN2A en la amígdala basolateral en los procesos de desestabilización y re-estabilización de una memoria de miedo condicionado, respectivamente. Por otro lado, se demostró una doble disociación en los mecanismos que subyacen a la evocación y a la desestabilización de la memoria, ya que el bloqueo de los receptores AMPA (*“alfa-amino-3-hidroxy-5-metil-4-isoxazole propionic acid”*) impidió la expresión de la memoria al mismo tiempo que permitió la desestabilización. Estos datos demuestran que mecanismos de señalización glutamatérgicos en la amígdala basolateral median diferencialmente la evocación, la desestabilización y la reconsolidación de memorias de miedo previamente consolidadas (Milton y col., 2013).

Se ha señalado que la evocación de una memoria de miedo contextual induce un cambio temporal bifásico de la expresión en membrana del receptor AMPA que contiene la subunidad GluA2 en el hipocampo dorsal. La evocación inicialmente conduce a una endocitosis dependiente de GluA2 de estos receptores y a una disminución de la fuerza sináptica. Luego de esta fase aguda inicial de depresión sináptica (1-4 h), se observó una segunda ola de tráfico de receptores AMPA (7 h). El bloqueo de la endocitosis dependiente de GluA2 inducida por la evocación, aumenta la expresión posterior de miedo. Además, este bloqueo impide la pérdida de la respuesta de miedo después de la actualización del contenido de la memoria de miedo. Se concluyó que la endocitosis de los receptores AMPA que contienen GluA2 inducida por la evocación es fundamental para la desestabilización de una memoria de miedo y para la reinterpretación del contenido de dicha memoria ante la disponibilidad de nueva información ambiental durante la reconsolidación (Rao-Ruiz y col., 2012).

### ***Consolidación vs reconsolidación***

A pesar de su nombre, la reconsolidación no es una recapitulación exacta de la consolidación. Si bien a nivel celular y molecular la consolidación y la reconsolidación presentan algunos mecanismos en común, evidencias recientes han demostrado mecanismos específicos para cada uno de estos procesos.

Una diferencia notable entre la consolidación y la reconsolidación se observó a nivel del patrón de activación de factores de transcripción. En el hipocampo dorsal, se ha señalado una doble disociación entre el Zif268, el cual se requiere selectivamente para

la reconsolidación y el BDNF, el cual es selectivamente necesario para la consolidación del condicionamiento de miedo contextual (Lee y col., 2004). Una continuación de este trabajo estableció que esta separación a nivel de la expresión génica se reflejó en vías de señalización paralelas e independientes “*upstream*” de la activación transcripcional: la vía receptor NMDA-ERK1-BDNF es funcional para la consolidación mientras que la vía receptor NMDA-quinasa del inhibidor del NF-kB (IKK)-Zif268 lo es para la reconsolidación (Lee y Hynds, 2013).

Otra disociación entre la participación de los factores de transcripción en la consolidación y la reconsolidación se ha demostrado con el C/EBP $\beta$ . En el hipocampo, el C/EBP $\beta$  se requiere para la consolidación, pero no para la reconsolidación de un aprendizaje de evitación inhibitoria. En cambio, en la amígdala, el C/EBP $\beta$  se requiere para la reconsolidación pero no la consolidación de una memoria de evitación inhibitoria. Esta discrepancia entre el hipocampo y la amígdala en la consolidación y reconsolidación indica la posibilidad de que en la reconsolidación de la evitación inhibitoria participen sistemas y patrones de activación diferentes a los de otros tipos de condicionamiento de miedo (Tronel y col., 2005).

### **Estrés**

#### **Concepto**

El término “estrés” proviene de la raíz indoeuropea “*str*”, que ha sido históricamente asociada con el ejercicio de presión. Así, el griego “*strangalizein*”, su derivado en inglés y sinónimo “*to strangle*” (estrangular) y el latín “*strigere*” (apretar), tienen sus orígenes en un pasado muy lejano.

La palabra “estrés” fue popularizada y utilizada por primera vez en la investigación fisiológica y biomédica por el científico húngaro-canadiense Hans Selye en 1936. Selye describió la aparición de un síndrome en ratas después de la exposición a diferentes agentes nocivos como el frío, la injuria quirúrgica, el shock espinal y la actividad física excesiva. Él también observó que los signos y síntomas del síndrome, los cuales incluían úlcera gástrica e hipertrofia adrenal y tímica, fueron independientes de la naturaleza del agente nocivo y probablemente representaban una respuesta común. Con el fin de caracterizar a este fenómeno él utilizó el término “estrés” para describir una amenaza potencial o real a la homeostasis, impuesta por fuerzas adversas internas o externas, denominadas “estresores”; la homeostasis se restablece por un complejo

repertorio de respuestas comportamentales y fisiológicas adaptativas del organismo, llamada “respuesta al estrés” mediada por el “sistema de estrés” (Selye, 1936).

El sinónimo moderno de homeostasis, que significa estado de equilibrio, fue acuñado por el fisiólogo estadounidense Walter Cannon en el comienzo del siglo 20. Al explicar el concepto de homeostasis, Cannon dejó en claro que lo importante era la estabilidad relativa, a pesar de las fluctuaciones ambientales, de aquellos parámetros que son fundamentales para la supervivencia celular, como la disponibilidad de nutrientes y de oxígeno, la temperatura, el pH y las concentraciones iónicas. Cannon discutió explícitamente el hecho de que otros parámetros que son relevantes para el mantenimiento del ambiente extracelular, como la presión arterial, la frecuencia cardíaca y la glucemia, a pesar de que por lo general permanecen dentro de ciertos “rangos normales” cuando el cuerpo está en reposo, tendrían que ser modificados activamente en otros momentos para satisfacer las necesidades tisulares (Cannon, 1932).

Mediante el empleo de la ley de Hooke, la cual expresa que la magnitud de deformación de un objeto es directamente proporcional a la magnitud de la fuerza externa aplicada, Cannon y Selye extrapolaron de forma creativa los conceptos de la física a la biología.

Con el número cada vez mayor de publicaciones en el campo de la investigación sobre el estrés se ha hecho evidente el uso de una definición convencional de estrés como “la respuesta del cuerpo a cualquier perturbación real o amenazante de la homeostasis”. Esta definición trae problemas considerables ya que implica que todas las amenazas a la homeostasis, por muy leves y transitorias que sean, son estresores, incluso comer el almuerzo (que dará lugar a un aumento de la glucemia y así desencadenará una respuesta homeostática). Es inapropiado el uso del término “estrés” para condiciones que van desde la más ligera estimulación desafiante a condiciones severamente aversivas.

Es por ello que varios autores han remarcado la ambigüedad y la circularidad de la definición de estrés en términos de una amenaza para la homeostasis en general (Levine y Ursin, 1991; McEwen y Wingfield, 2003; Day, 2005; Levine, 2005; Romero y col., 2009). Prácticamente todas las actividades de un organismo directa o indirectamente tienden a afectar la homeostasis. Por lo tanto, esta definición

convencional carece de sentido y necesita una consideración crítica a la luz de los conocimientos actuales.

En los últimos años se ha argumentado que el concepto de homeostasis necesita ser complementado con los conceptos de “alostasis” (literalmente “estabilidad a través del cambio”) y de “carga alostática” (en efecto, el costo de la alostasis). Uno de los supuestos beneficios de asumir estos conceptos es que proporcionan un medio para lograr una “definición más precisa de homeostasis y estrés” (McEwen y Wingfield, 2003).

La versión original del concepto de alostasis fue presentada por Sterling y Eyer (1988). Ellos aprovecharon el hecho de que ciertos parámetros fisiológicos parecen ser reajustados a nuevos rangos de acuerdo a las circunstancias, por ejemplo, la presión arterial durante la vigilia vs el sueño. Argumentaron que esto demostraba que el concepto de homeostasis era erróneo y debía ser reemplazado por un nuevo concepto, es decir que “para mantener la estabilidad, un organismo debe variar todos los parámetros de su medio interno y armonizarlos de manera adecuada a las demandas ambientales”. Sterling y Eyer aplicaron el término alostasis a este concepto.

La segunda versión del concepto de alostasis fue establecida por McEwen y Stellar (1993), la cual fue modificada posteriormente por el propio McEwen. Este último describe la alostasis como “el proceso de mantenimiento activo de la homeostasis” (McEwen y Wingfield, 2003). Es decir, McEwen usa el término alostasis para resumir los procesos que permiten alcanzar la homeostasis. McEwen describe a los conceptos de alostasis y homeostasis como complementarios. Igualmente, a lo que él se refiere como “mecanismos alostáticos” son en realidad idénticos a los “mecanismos homeostáticos” de Cannon. Por ello, para muchos la versión de McEwen del concepto de alostasis no ofrece algo que no estuviera ya evidente en el concepto original de homeostasis de Cannon. McEwen y Stellar definieron la “carga alostática” como la tensión puesta sobre el organismo por sus intentos de mantener la homeostasis contra cualquier desafío. Es decir, carga alostática se refiere al desgaste del organismo como consecuencia de su esfuerzo para mantener la estabilidad de los parámetros críticos para la supervivencia. La carga alostática excesiva podría producir enfermedad y/o acelerar el envejecimiento, algo de una importancia clínica evidente. McEwen propone que es posible clarificar el concepto de “estrés” al incluirlo dentro del concepto más amplio de alostasis. Así, en una revisión reciente, McEwen y Wingfield (2003)

escribieron que “el término estrés sería utilizado para describir eventos que amenazan al individuo y que provocan respuestas fisiológicas y comportamentales como parte de la alostasis”. Es decir, proponen que el estrés es sólo un tipo de desafío que puede activar respuestas alostáticas.

Como las “respuestas alostáticas” de McEwen son en realidad idénticas a las “respuestas homeostáticas” de Cannon, la introducción de los conceptos de alostasis y carga alostática conduce inevitablemente a un razonamiento circular hacia el concepto convencional de estrés (“respuesta del organismo a cualquier perturbación real o amenazante de la homeostasis”). En resumen, el análisis anterior lleva a la conclusión de que una definición más clara de estrés no es inherente a los conceptos de alostasis y carga alostática per se.

El punto crítico es que la definición convencional de estrés combina inadvertidamente dos tipos diferentes de respuesta que pueden ser utilizadas por el organismo para afrontar un desafío (Day, 2005).

I. Una respuesta selectiva (normalmente suficiente) que permite un ajuste apropiado para el manejo de un desafío específico menor. Por ejemplo, un aumento transitorio en el estado de alerta cuando se oye un sonido imprevisto. Esta respuesta probablemente sería suficiente para evitar o corregir cualquier perturbación de la homeostasis.

II. Una respuesta no selectiva (de emergencia) que permite una óptima redistribución de los recursos del organismo en respuesta a, o en anticipación de, un desafío mayor (estresor) que probablemente no pueda ser afrontado por una respuesta selectiva. Por ejemplo, la activación de la corteza suprarrenal, médula suprarrenal y cognitiva cuando un sonido inesperado es reconocido como el primer signo de un ataque.

En consecuencia, una adecuada reformulación de la definición de estrés de Selye podría ser: el estrés es una respuesta del organismo a cualquier desafío que supera con mucho, o se juzga como tal, a los mecanismos selectivos de la respuesta homeostática.

Por su parte, Levine y Ursin afirman que el estrés debe ser considerado un proceso de varios componentes: el estímulo (estresor), la evaluación cognitiva de este estímulo,

que valora hasta qué punto puede ser considerado como una amenaza, y la respuesta comportamental y fisiológica (respuesta de estrés) (Levine y Ursin, 1991). Ellos consideran que el principal problema con el concepto de estrés es que la mayoría de las definiciones existentes incluyen sólo algunos de estos componentes (Levine, 2005).

Actualmente, la definición de estrés se centra en dos términos: “controlabilidad” y “predecibilidad”. Estos términos fueron introducidos en la investigación del estrés por Jay M. Weiss al comienzo de los años setenta del siglo pasado. Este autor llegó a la conclusión de que no es la naturaleza física del estímulo aversivo lo que induce la patología, sino más bien el grado en que el estímulo puede ser previsto y controlado (Weiss, 1972). Dos consideraciones importantes ayudan a mejorar esta hipótesis. En primer lugar, estudios en humanos indican que la respuesta neuroendocrina a una situación competitiva depende más de factores subjetivos relacionados con la evaluación cognitiva de la situación que del propio resultado (Salvador, 2005). Los resultados sugieren que cuando los sujetos se enfrentan con una competición, evalúan de tal manera que se activa una respuesta de afrontamiento. Más importante que ganar o perder es el patrón de afrontamiento mostrado por el sujeto, lo cual determina los cambios hormonales experimentados cuando se enfrentan a la competencia y su resultado (Salvador, 2005). Con esto se concluye que el control real no es lo que cuenta, sino la percepción de control de la situación. En segundo lugar, la controlabilidad no debe ser definida como un fenómeno “todo o nada”: control total o ausencia total de control. En cambio, deben considerarse diversos grados de controlabilidad, desde el control absoluto, pasando por la amenaza del control, a la pérdida total de control. Por ejemplo, una rata macho dominante puede tener un control total en un entorno social estable, pero sólo un control parcial o experimentar amenaza del control en condiciones socialmente inestables (Koolhaas y col., 2011).

Siguiendo esta línea de razonamiento, se propone que el uso del término “estrés” debe limitarse a condiciones donde una demanda ambiental excede la capacidad reguladora natural de un organismo, en situaciones particulares que incluyen la falta de predicción (impredicibilidad) y de control (incontrolabilidad). La impredicibilidad se caracteriza por la ausencia de una respuesta anticipatoria y la pérdida de control refleja una recuperación tardía de la respuesta de estrés. Esta definición más estrecha puede evitar confusiones con reacciones fisiológicas normales que son obligatorias para sostener el comportamiento.

## ***Respuesta al estrés***

La respuesta al estrés está mediada por el sistema de estrés, situado en parte en el sistema nervioso central (SNC) y en parte en los órganos periféricos. La actividad basal y la capacidad de respuesta óptimas del sistema de estrés son esenciales para la sensación de bienestar, el desempeño exitoso de diferentes tareas y las interacciones sociales adecuadas. Por el contrario, la actividad basal y la capacidad de respuesta excesivas o inadecuadas de este sistema pueden alterar el desarrollo, el crecimiento y la composición corporal, y conducir a una serie de desórdenes somáticos y comportamentales.

En el SNC, la respuesta al estrés incluye la facilitación de vías neurales que subyacen las funciones adaptativas agudas y limitadas en el tiempo, como el alerta (“*arousal*”), la vigilancia y la atención enfocada y la inhibición de vías que controlan funciones agudas no adaptativas, como la alimentación, el crecimiento y la reproducción.

A nivel periférico, los cambios por estrés dan lugar a un aumento de la oxigenación y nutrición del cerebro, del corazón y de los músculos esqueléticos, órganos esenciales para la coordinación central de la respuesta al estrés y de la reacción inmediata de “lucha o huida”.

Los principales efectores centrales del sistema de estrés son las hormonas hipotalámicas arginina-vasopresina (AVP) y hormona liberadora de corticotrofina (CRH), los péptidos derivados de la pro-opiomelanocortina, la hormona  $\alpha$ -melanocito estimulante y la  $\beta$ -endorfina, y la noradrenalina (NA) producida en los centros A1/A2 del locus coeruleus del tallo encefálico y en el sistema nervioso autónomo central. Otras vías aminérgicas ascendentes, tales como las vías serotoninérgicas que se originan en el cerebro medio (núcleos del rafe), acompañan a la NA derivada del locus coeruleus a través de la secreción de la 5-hidroxitriptamina (serotonina). Los principales efectores periféricos son los glucocorticoides (GC), la NA y la adrenalina (A).

La secreción de GC está regulada principalmente por una población selecta de neuronas secretoras en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN). Tras la estimulación por estrés, estas neuronas secretan un cóctel de secretagogos de la hormona adrenocorticotrofina (ACTH) a la circulación portal hipofisaria, entre los cuales encontramos a la CRH y AVP. El aumento subsiguiente de la ACTH circulante estimula



la síntesis y secreción de GC en la corteza suprarrenal. La magnitud de la respuesta del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HHA) provocada por estas neuronas del PVN está limitada por mecanismos neuronales y hormonales para mantener los niveles de GC dentro de límites tolerables.

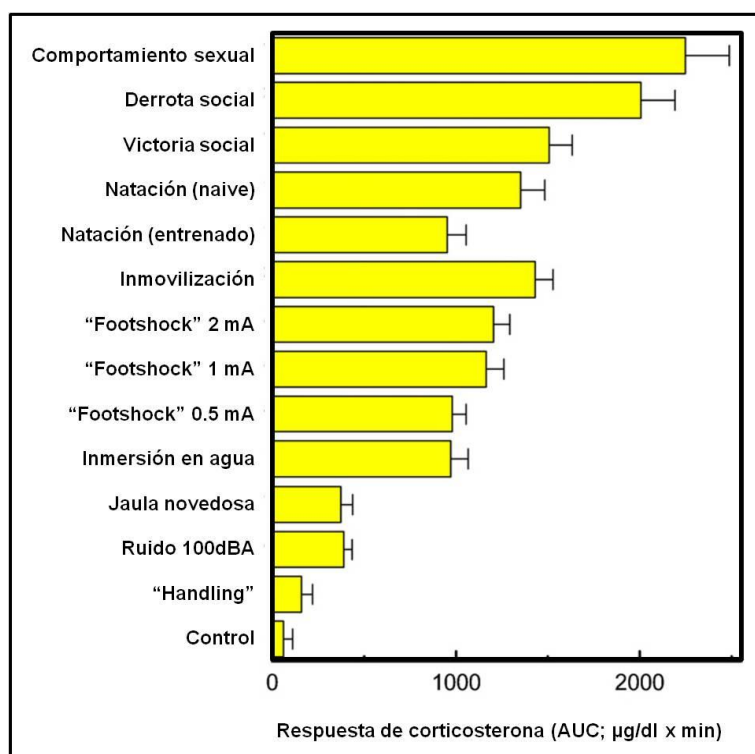
En cerebro de mamíferos, las hormonas corticosteroides actúan principalmente a través de los receptores mineralocorticoides y glucocorticoides (MRs y GRs, respectivamente). Los MRs tienen una alta afinidad por los corticosteroides, por lo que están en su mayoría ocupados incluso cuando los niveles circulantes de corticosteroides son bajos. Los GRs tienen una afinidad diez veces menor y, en consecuencia, estos receptores están parcialmente ocupados en condiciones basales, ocupación que aumenta cuando se elevan los niveles de corticosteroides - por ejemplo, después del estrés. Los dos tipos de receptores están diferencialmente distribuidos en el cerebro. La expresión de los MRs es elevada en las neuronas del hipocampo y del septum lateral y moderada en los subnúcleos de la amígdala, el PVN y el locus coeruleus. Estas regiones definen un circuito que está involucrado en el procesamiento cognitivo, emocional y neuroendocrino de eventos estresantes. Los GRs se expresan de forma ubicua en el cerebro, pero preferentemente en el hipocampo, el septum lateral y el PVN.

Poco tiempo después de un evento estresante, la liberación de monoaminas, como la NA, la dopamina y la serotonina, aumenta en poblaciones neuronales específicas. Esta liberación es desencadenada por circuitos cerebrales que están implicados en la evaluación del evento estresante o, indirectamente, por la activación del sistema nervioso simpático. La activación de los sistemas monoaminérgicos depende de muchos factores, incluyendo el sexo, el momento del día y la controlabilidad o recurrencia del estresor. Por ejemplo, la activación de las neuronas del rafe por exposición a un “shock” es sólo importante cuando la situación es incontrolable (Joels y Baram, 2009).

Cada monoamina contribuye a determinados aspectos del comportamiento de la respuesta inmediata a la situación estresante. Por ejemplo, niveles elevados de NA supuestamente causan un cambio del procesamiento enfocado de información sensorial a una exploración más general del medio ambiente, que puede ofrecer mejores soluciones para condiciones desafiantes (Aston-Jones y Cohen, 2005). La dopamina, que se libera durante el estrés moderado en la corteza prefrontal, se cree

que mejora la evaluación de riesgos y estrategias de decisión, y la serotonina es un instrumento para la reducción de la ansiedad post-estrés (Adamec y col., 2008). Por lo tanto, las monoaminas colectivamente promueven diferentes estrategias de comportamiento que posibilitan que los animales puedan enfrentar y sobrevivan a la fase inicial de un evento estresante.

Es importante destacar que si bien el eje HHA y el sistema simpático adrenal son claves en la respuesta al estrés, su activación no siempre es el resultado de una experiencia estresante. Por ejemplo, situaciones apetitivas y gratificantes como el comportamiento sexual (Bronson y Desjardins, 1982; Woodson y col., 2003; Bonilla-Jaime y col., 2006) y la victoria social provocan respuestas del eje HHA que son similares en magnitud a las respuestas que provocan situaciones muy aversivas como la derrota social. En realidad, estos sistemas tienen una función crucial en la preparación metabólica y cardiovascular del organismo para realizar un comportamiento, función que va más allá del estrés per se (Sapolsky y col., 2000). Un comportamiento metabólicamente más exigente estará acompañado por una mayor activación (Figura 6).



**Figura 6.** Respuesta de la corticosterona plasmática de ratas Wistar adultas a diferentes condiciones de test, cuantificada como el área total bajo la curva de respuesta (AUC). Cada test consistió en una serie estandarizada de muestras de referencia y una exposición de 15 minutos al estímulo seguido de una fase de recuperación de 1 hora. La condición control corresponde a "jaula de alojamiento". Las muestras de sangre se recogieron a través de la cánula de la vena yugular implantada de forma permanente. Adaptado de Koolhaas et al., 2011.

En conclusión, a pesar de que los términos respuesta al estrés y mediadores de estrés generalmente tienen connotaciones negativas, estos mecanismos evolucionaron ya que, en el corto plazo, proporcionan una ventaja adaptativa, y sus efectos dañinos sólo surgen cuando el estrés es excesivo o cuando hay una falla en los sistemas de

inactivación del estrés. Es importante revitalizar la opinión de que el “estrés” debe ser considerado como una percepción cognitiva de incontrolabilidad y/o impredecibilidad que se expresa en una respuesta fisiológica y comportamental.

### **Memoria emocional de miedo**

La evolución ha dotado a cada especie con una serie de mecanismos de defensa instintivos para ayudar a los organismos a enfrentar a diversas condiciones ambientales que amenazan la seguridad y el bienestar. El puercoespín exhibe sus espinas, los zorrinos liberan olores ofensivos y las cucarachas se escabullen entre las grietas para su seguridad. Aunque los seres humanos en las sociedades modernas no tienen que preocuparse de escapar de los predadores, la emoción de miedo y los comportamientos defensivos relacionados ayudan a mantenernos a salvo de un peligro tanto en situaciones cotidianas como peligrosas: nos agachamos para cubrirnos de un proyectil, pisamos el freno para no chocar o gritamos para pedir auxilio.

Los eventos emocionales a menudo alcanzan un estatus privilegiado en la memoria. Es bien conocido que las experiencias emocionalmente significativas generan memorias robustas y de larga duración, siendo más propensas a ser recordadas que eventos emocionalmente neutros (Roosendaal y col., 2009). Las personas recuerdan bien dónde estaban y qué estaban haciendo cuando experimentaron un terremoto o presenciaron un accidente. De manera similar, las ratas recuerdan el lugar en el que recibieron un shock eléctrico o la ubicación de una plataforma de escape en un tanque lleno de agua. Esta potenciación de la memoria no se limita a experiencias aversivas: eventos placenteros también tienden a ser bien recordados. Además, hay varios estudios que muestran que el estrés facilita la formación de la memoria (Beylin y Shors, 1998; Shors, 2001; McGaugh y Roosendaal, 2002). Estos son fenómenos altamente adaptativos, garantizando así el almacenamiento de información relevante, lo cual posibilitará detectar, anticipar y evitar estímulos potencialmente peligrosos en encuentros futuros.

El término miedo se refiere a un estado caracterizado por factores psicológicos, neurobiológicos y por un conjunto de fenómenos corporales que se producen en respuesta a una amenaza. El miedo es un estado común de la vida, casi desde el comienzo. La expresión de miedo se conserva en gran medida a través de las culturas humanas y, en cierta medida, a través de especies de mamíferos humanos y no

humanos. Existen procedimientos experimentales bien definidos para obtener y medir la respuesta de miedo, y muchos de estos pueden ser utilizados en formas más o menos similares en humanos y en modelos animales.

El miedo es uno de los elementos básicos para la activación de la respuesta al estrés que, como se expuso anteriormente, abarca una serie de cambios autonómicos y neuroendocrinos que ayudan a la supervivencia (McEwen, 2003, Sapolsky y col., 2000). Al mismo tiempo, estos cambios periféricos impactan en el cerebro, alterando la forma en que los circuitos emocionales y cognitivos procesan la información.

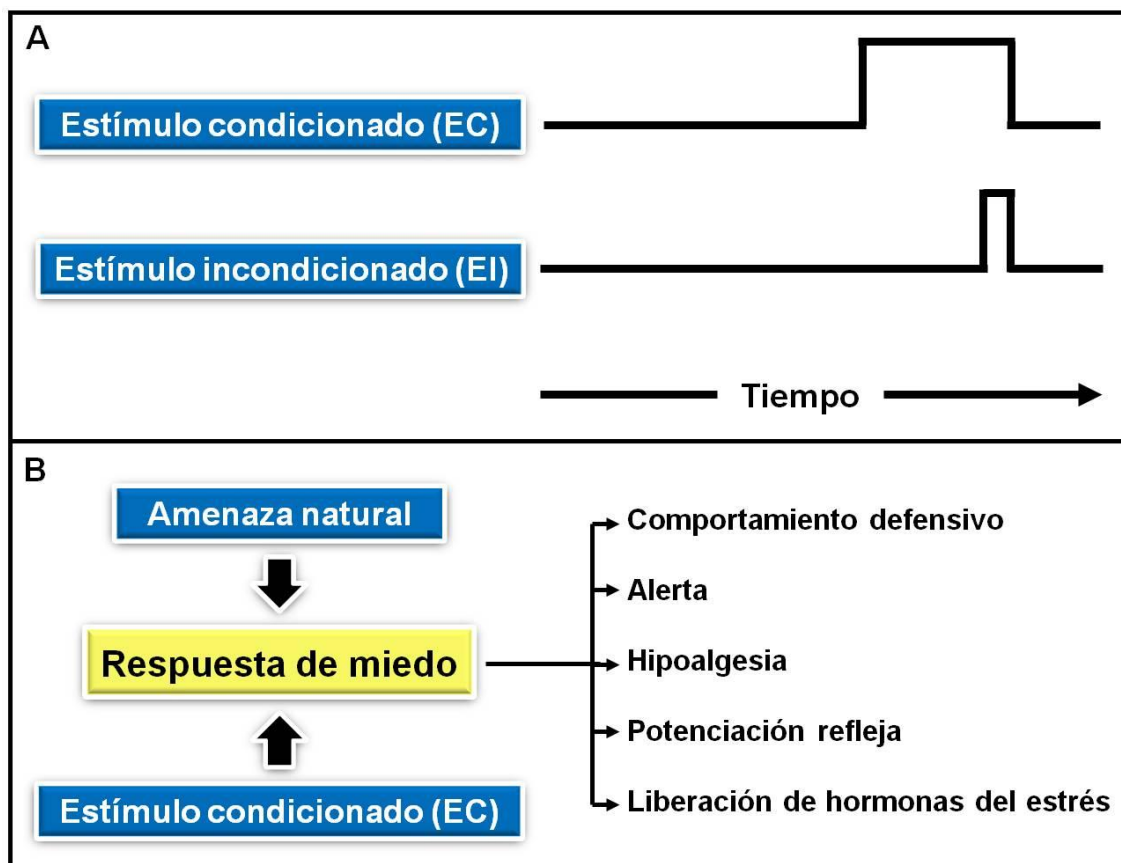
Sin embargo, la codificación eficiente de las memorias emocionales, como la memoria de miedo, puede volverse no adaptativa; el estrés severo a menudo las convierte en una fuente de trastornos afectivos como la depresión, las fobias, el trastorno de pánico y el desorden de estrés post-traumático (DEPT). Una mayor comprensión de los mecanismos involucrados en los efectos del estrés sobre los procesos cognitivos podría tener implicaciones potenciales en términos de la prevención y el tratamiento de estos trastornos (Shin y Liberzon, 2010).

Los mayores avances en la comprensión de cómo el miedo se organiza en el cerebro se han realizado por medio de estudios que utilizan el condicionamiento pavloviano de miedo.

### **Condicionamiento de miedo**

El condicionamiento de miedo pavloviano es un procedimiento conductual en el cual un estímulo emocionalmente neutro [estímulo condicionado (EC)] puede adquirir propiedades afectivas tras repetidas asociaciones temporales con un evento biológicamente significativo [estímulo incondicionado (EI)]. A medida que la asociación EC-EI se aprende, respuestas fisiológicas y de comportamiento innatas pasan a estar bajo el control del EC (Figura 7). A modo de ejemplo, si una rata se coloca en un contexto (EC) seguido de forma contingente por un shock eléctrico en las patas (EI), después de unos pocos apareamientos contexto-shock (uno es a menudo suficiente), las respuestas defensivas (respuestas que ocurren típicamente en presencia de un peligro) serán elicitadas posteriormente por la sola presentación del contexto. Ejemplos de respuestas defensivas que quedan bajo el control del EC incluyen respuestas conductuales defensivas (como el congelamiento o “*freezing*”), una respuesta autónoma (por ejemplo, la frecuencia cardíaca, la presión arterial) y una respuesta

endocrina (secreción de hormonas), así como alteraciones en la sensibilidad al dolor (analgesia) y supresión refleja (respuestas de sobresalto y parpadeo potenciadas por el miedo). Esta forma de condicionamiento está evolutivamente conservada, habiéndose reportado en moscas, gusanos, caracoles, cangrejos, peces, palomas, conejos, ratas, gatos, perros, monos y humanos (LeDoux, 2000).



**Figura 7. A.** El condicionamiento de miedo implica la presentación de un estímulo incondicionado nocivo, normalmente una descarga eléctrica en las patas, al final de la presentación de un estímulo condicionado relativamente neutral (EC), tal como una luz, un tono o un contexto. **B.** Después del condicionamiento, el EC provoca una amplia gama de respuestas comportamentales y fisiológicas que ocurren característicamente cuando un animal se encuentra con una amenaza natural (por ej., una rata que se encuentra con un gato). Adaptado de LeDoux 2000.

Es oportuno identificar las diferentes fases de la memoria en este paradigma de miedo condicionado. La adquisición es el aprendizaje inicial de la asociación entre el EC y el EI durante el entrenamiento. La evocación es el recuerdo de la asociación EC-EI a través de la sola presentación del EC durante un test de evocación. La respuesta a la presentación del EC es un índice de la memoria formada de la asociación EC-EI durante el entrenamiento. Como fue señalado anteriormente, la presentación de la señal condicionada durante el test de evocación puede inducir un proceso de reconsolidación (Figura 8).

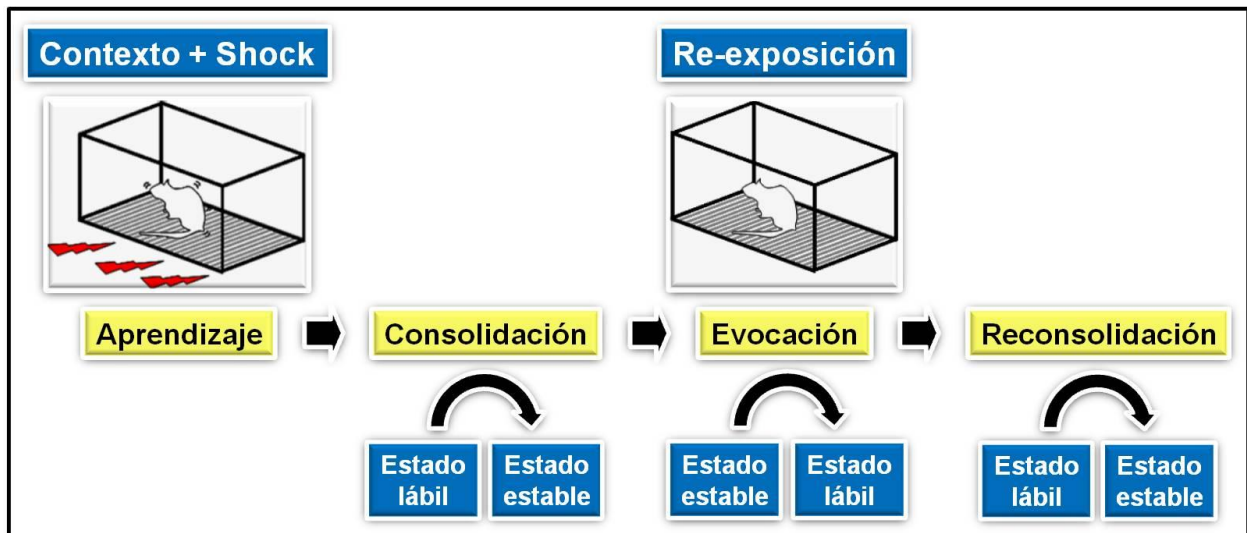


Figura 8. Fases de procesamiento de una memoria de miedo condicionada al contexto.

## Neuroanatomía de los circuitos de miedo

El condicionamiento de miedo es especialmente útil para estudiar las bases neuronales del miedo. Un eslabón clave en este circuito es la amígdala, que se encuentra entre los sistemas aferentes sensoriales y los sistemas eferentes de control de las respuestas de comportamiento, autónoma y endocrina situados en el tallo encefálico. Igualmente, otras estructuras cerebrales también contribuyen al condicionamiento de miedo.

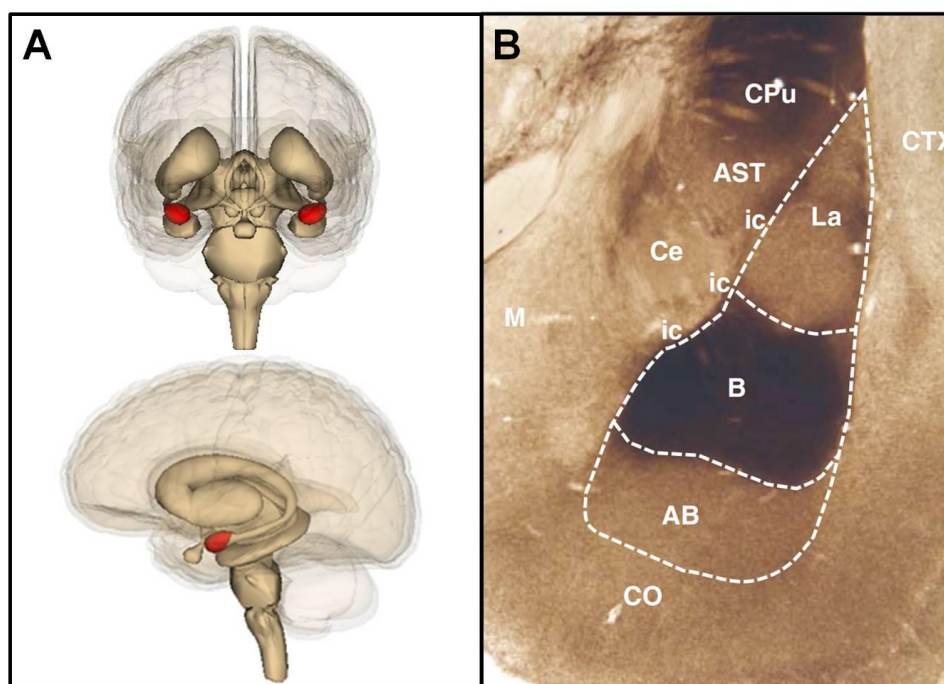
### **La amígdala**

La amígdala o complejo amigdalino es una estructura que se ubica en el lóbulo temporal medial del cerebro y está constituida por distintos núcleos. El esquema más aceptado actualmente propone que la amígdala consiste de una división evolutivamente primitiva asociada con el sistema olfatorio (la región córtico-medial) y una división evolutivamente nueva asociada con la neocorteza (la región basolateral o complejo basolateral). La región córtico-medial incluye los núcleos cortical, medial y central, mientras que el complejo basolateral incluye los núcleos lateral, basal y accesorio basal. Cada núcleo a su vez se divide en subnúcleos (LeDoux, 2009) (Figura 9).

El complejo basolateral (ABL) es el principal receptor de información de los sistemas sensoriales como el visual, auditivo, somatosensorial (incluido el dolor), olfatorio y gustativo y está implicada en el procesamiento emocional, generando una reacción emocional apropiada ante cualquier amenaza ambiental (LeDoux y Schiller, 2009). Por

lo tanto, esta región del cerebro desempeña un rol esencial en el procesamiento de las emociones (Aggleton, 2000; LeDoux, 2000). Los otros núcleos de la amígdala reciben información de otras regiones del cerebro, permitiendo que diversos tipos de información sean procesados por la amígdala.

El núcleo central (Ce) es la principal región eferente de la amígdala, al menos para las respuestas emocionales innatas y las respuestas fisiológicas asociadas. Este controla la expresión de la reacción de miedo, incluyendo las respuestas conductuales, autonómicas y endócrinas a través de proyecciones selectivas a áreas como el hipotálamo, sustancia gris periacueductal (PAG) y el núcleo dorsal del vago (LeDoux, 2009).



**Figura 9.** La amígdala. **A.** Ubicación de la amígdala en el lóbulo temporal medial (rojo). **B.** Principales áreas de la amígdala (cerebro de rata; tinción de la acetilcolinesterasa). Los mismos núcleos están presentes en los primates, incluyendo los humanos. Núcleos de la amígdala: complejo basolateral (línea de puntos; La, núcleo lateral; B, núcleo basal; AB, accesorio basal); Ce, núcleo central; itc, células intercaladas; M, núcleo medial; CO, núcleo cortical. Otras áreas: AST, área de transición amígdalo-estriatal; CPu, caudado putamen; CTX, corteza. Adaptado de LeDoux 2009.

Para que la información sensorial recibida por la amígdala lateral influya sobre el comportamiento, debe atravesar conexiones intra-amígdala. Existen escasas conexiones directas entre la ABL y el Ce. Las principales rutas de comunicación entre estos núcleos implican conexiones entre la parte medial de la amígdala lateral a otros núcleos que luego se conectan con el central. Por ejemplo, la ABL proyecta a la región intercalada (ITC), una red inhibitoria que se conecta con el Ce. Se ha sugerido que los estímulos desde el núcleo central son inhibitorios. La ABL activa las células

intercaladas y estas inhiben la actividad del núcleo central permitiendo así que se desencadene la respuesta de miedo (LeDoux, 2009).

La mayoría de las aferencias a la amígdala son excitatorias (glutamatérgicas) que hacen sinapsis con las dendritas de las neuronas piramidales de proyección excitatorias (NPP), las cuales transmiten señales a otros núcleos de la amígdala y a otras regiones cerebrales. Estas aferencias también se conectan con interneuronas GABAérgicas inhibitorias las que a su vez lo hacen con las NPP (inhibición anterógrada) y algunos axones de las NPP conectan con estas interneuronas (inhibición recurrente). Esta fuerte red inhibitoria mantiene una baja actividad celular espontánea y previene la respuesta a estímulos irrelevantes (previene el disparo de potenciales de acción). Los estímulos neutros provocan una respuesta, la cual decrece rápidamente cuando dichos estímulos se presentan de forma repetida. Esta inhibición puede revertirse cuando el estímulo neutro es presentado en asociación con un evento biológicamente relevante (LeDoux, 2009).

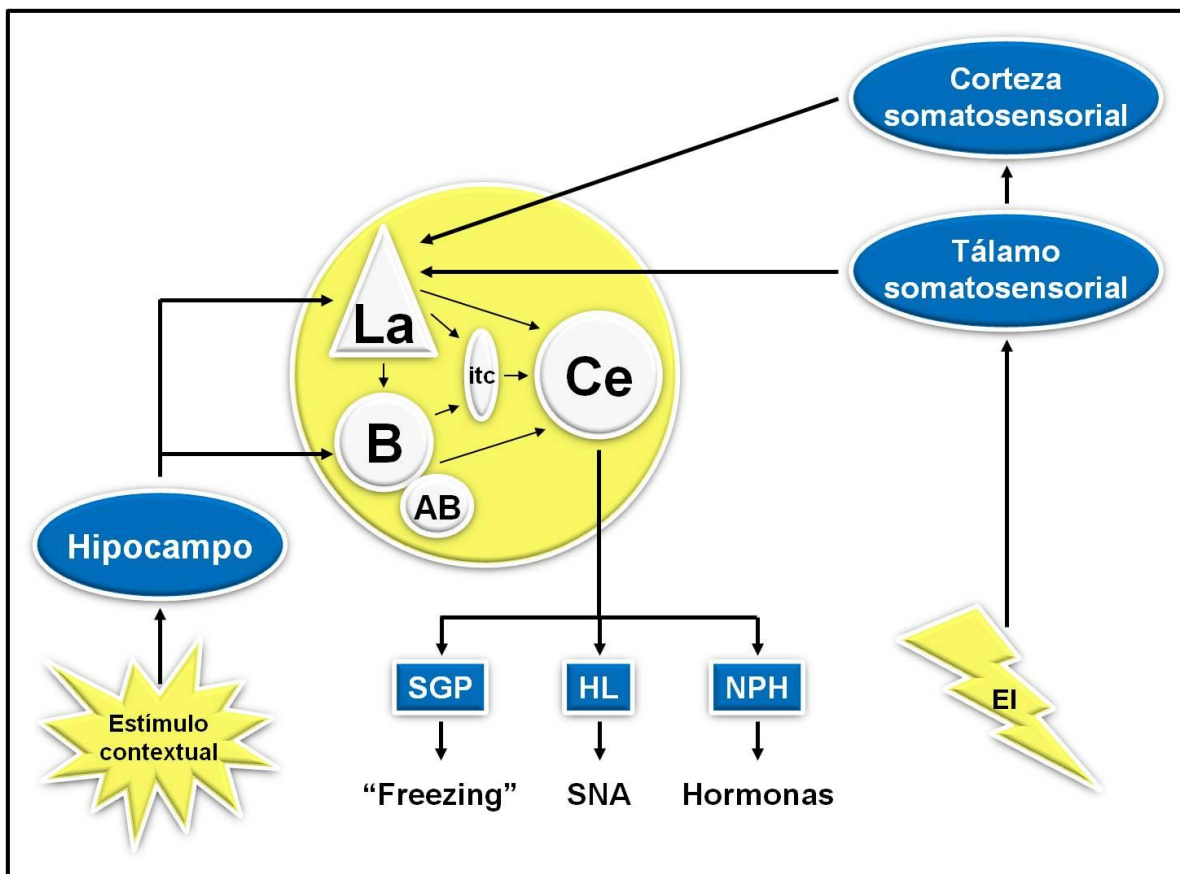
### ***Circuitos neuronales que subyacen el condicionamiento de miedo contextual***

Para que se produzca el condicionamiento, las vías de transmisión del EC y del EI deben converger en el cerebro. Se ha propuesto que la amígdala es un sitio de plasticidad durante el condicionamiento y, por lo tanto, de convergencia EC-EI.

El condicionamiento de miedo contextual implica la previa elaboración de una representación contextual por el hipocampo (Phillips y LeDoux 1992; Maren y col., 1997; Kim y Fanselow, 1992; Frankland y col., 1998) y la transmisión de esta información a la ABL (Canteras y Swanson, 1992). La llegada de la información contextual converge en la ABL con la llegada del estímulo somatosensorial (EI) desde áreas corticales y talámicas. El resultado de esta convergencia influye sobre la actividad del Ce, el cual proyecta a diferentes áreas del tallo encefálico para el control de la respuesta de miedo (LeDoux y col., 1988; Kapp y col., 1992; Davis, 1992) (Figura 10).

La reacción de miedo abarca un conjunto de respuestas conductuales, autonómicas y fisiológicas diseñadas para enfrentar al evento aversivo. En el cerebro, se activan sistemas monoaminérgicos, lo que resulta en la liberación de neurotransmisores como NA, acetilcolina, serotonina y dopamina. Estos neurotransmisores aumentan el estado de alerta y la vigilia y, en general, mejoran el procesamiento de señales externas.





**Figura 10.** Condicionamiento de miedo contextual. Este condicionamiento implica la representación contextual por el hipocampo y la comunicación entre este y el complejo basolateral de la amígdala. Luego, el estímulo condicionado contextual (EC) y el estímulo somatosensorial incondicionado (EI) convergen en el complejo basolateral [núcleo lateral (La), basal (B) y accesorio basal (AB)], el cual activa al núcleo central (Ce) a través de conexiones intra-amígdala. Las proyecciones del Ce controlan las respuestas comportamentales ("freezing"), autonómicas y endócrinas que son componentes de la reacción de miedo. Otras abreviaturas: SPG, sustancia gris periacueductal; HL, hipotálamo lateral; itc, células intercalares; NPH, núcleo paraventricular del hipotálamo; EI, estímulo incondicionado; SNA, sistema nervioso autónomo. Adaptado de LeDoux, 2000, 2009.

Se produce una activación del sistema nervioso simpático, aumentando la liberación de adrenalina y noradrenalina de la médula suprarrenal y de noradrenalina de las terminaciones nerviosas simpáticas. Estas aminas biógenas producen una serie de efectos, incluyendo aumento de la presión arterial y la frecuencia cardíaca, el desvío de la energía almacenada al trabajo muscular y la inhibición de la digestión. Se activa la respuesta al estrés con la secreción de las hormonas características.

## Influencia del estrés sobre la memoria de miedo

Un gran número de informes se han centrado en la identificación de los circuitos cerebrales y los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la influencia de experiencias amenazantes sobre la formación de memorias aversivas (LeDoux, 2000). Un aspecto importante a destacar es que el núcleo amigdalino implicado en la formación de la memoria de miedo también está implicado en la ansiedad inducida por

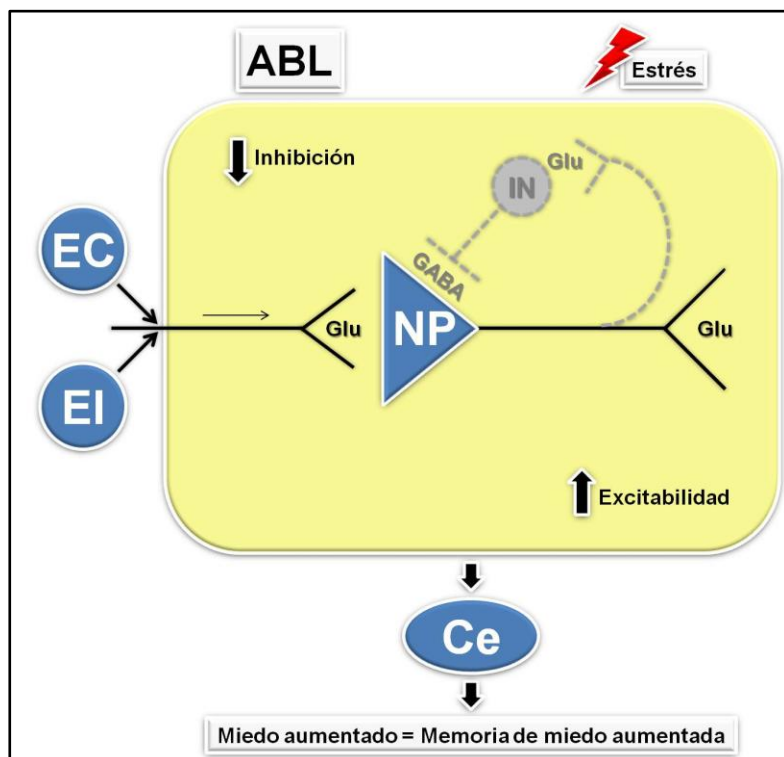
el estrés y en las reacciones de miedo, indicando que estos procesos están interrelacionados y se influyen mutuamente.

Un extenso número de evidencias han puesto de relieve que el sistema GABAérgico en el complejo amigdalino es un componente clave en la modulación de las reacciones emocionales a los estímulos estresantes. Por ejemplo, se ha demostrado que la exposición al estrés resultó en una disminución del influjo de cloruro mediado por los receptores GABA-A de esta región del cerebro (Martijena y col., 1997; Martijena y col., 2002). Otros resultados han revelado que una experiencia de inmovilización única induce una hiperexcitabilidad neuronal en la ABL, que resulta de la reducción de la inhibición GABAérgica recurrente (Isoardi y col., 2007). Este punto de vista fue apoyado además por evidencias farmacológicas, ya que la infusión del midazolam (MDZ) intra-ABL, un modulador positivo del receptor GABA-A, impidió la potenciación de las reacciones emocionales exhibidas por los animales estresados (Rodríguez Manzanares y col., 2005; Bignante y col., 2010). Por otra parte, el bloqueo de los receptores GABA-A en la ABL, pero no en el Ce, provocó una respuesta emocional similar a la inducida por el estrés (Rodríguez Manzanares y col., 2005). En general, estos hallazgos sugieren que el estrés, mediante la reducción de este control GABAérgico inhibitorio, daría lugar a una activación de las neuronas de proyección de la ABL, generando reacciones emocionales robustas, tales como el miedo y la ansiedad, las cuales han sido reportadas en animales sometidos a una variedad de estímulos estresantes (Rodríguez Manzanares y col., 2005; Calfa y col., 2006; Bignante y col., 2010).

### ***Efecto del estrés sobre la consolidación de la memoria de miedo***

La ABL tiene un rol fundamental en el efecto promotor del estrés sobre la consolidación de memorias emocionales, incluyendo la memoria de miedo (Roozendaal y col., 2009). Esta influencia del estrés sobre una memoria de miedo asociativa coincidió con una disminución de la transmisión GABAérgica en la ABL. Además, la estimulación de los receptores GABA-A con el MDZ atenuó el efecto facilitador del estrés sobre la memoria de miedo como así también la hiperexcitabilidad neuronal en la ABL. En conjunto, estos datos apoyan la visión de que la disminución de la transmisión GABAérgica en la ABL dispara la hiperexcitabilidad y una mayor plasticidad en las neuronas de proyección glutamatérgicas de la ABL (Rodríguez Manzanares y col., 2005). Tal mecanismo es relevante debido a que es ampliamente aceptado que el aumento de la señalización glutamatérgica en la ABL es esencial para la consolidación

de la memoria de miedo. En resumen, la disminución del control GABAérgico inhibitorio de la ABL provocada por la exposición al estrés podría ser un evento neurobiológico crítico que promueve una fuerte asociación entre el EC y el EI durante el condicionamiento de miedo (Figura 11). En esta línea de razonamiento, la neurotransmisión GABAérgica en la ABL, regulando la actividad glutamatérgica en esta región, modularía la codificación de la memoria de miedo de acuerdo con el estado emocional en el momento del proceso de aprendizaje de miedo.



**Figura 11.** Representación esquemática de los mecanismos implicados en la influencia del estrés sobre la formación de la memoria de miedo en el complejo basolateral (ABL). La exposición al estrés reduce el control inhibitorio de las interneuronas GABAérgicas (IN), resultando en un aumento de la excitabilidad de las neuronas de proyección (NP), lo que facilita la consolidación de la memoria del miedo tras la convergencia del estímulo condicionado (EC) y el estímulo incondicionado (EI) en las NP. La estimulación del núcleo central (Ce) por ABL activa las estructuras cerebrales implicadas en la respuesta de miedo, acompañada de la expresión y aparición de una memoria de miedo robusta y persistente. Adaptado de Martijena y Molina (2012).

Además, la neurotransmisión noradrenérgica en la ABL también participa en la influencia facilitadora del estrés y de las hormonas del estrés sobre la consolidación de una memoria aversiva (Roosendaal y col., 2009). Se ha demostrado que la activación de los receptores  $\beta$  adrenérgicos facilitó la potenciación a largo plazo (PLP), una forma artificial de plasticidad que se produce en las neuronas por estimulación eléctrica, en los aferentes corticales a las neuronas piramidales del núcleo lateral de la amígdala (Faber y col., 2005). Curiosamente, el estrés bloqueó el efecto facilitador de la noradrenalina sobre la inhibición GABAérgica en la ABL (Braga y col., 2004) y la noradrenalina suprimió la acción GABAérgica inhibitoria sobre las neuronas de la ABL, permitiendo la generación de PLP en sinapsis tálamo-amígdala (Tully y col., 2007). Por lo tanto, la activación de los mecanismos noradrenérgicos en la ABL inducida por el

estrés puede resultar, al menos en parte, de la disminución del control GABAérgico en esta área del cerebro.

A pesar de la evidencia convincente que apoya la influencia facilitadora del estrés sobre la consolidación de la memoria a nivel conductual, electrofisiológico y farmacológico en la ABL, el mecanismo molecular implicado en tal facilitación no está del todo claro. El aprendizaje de miedo induce cambios en la fosforilación de proteínas y en la expresión génica en las neuronas de la ABL, fenómenos esenciales para la consolidación de la memoria de miedo. Entre los eventos moleculares, ERK, la vía de señalización de la subfamilia de la proteín-quinasa activada por mitógenos (MAPK), desempeña un rol fundamental en los procesos de consolidación y plasticidad sináptica (Sweatt, 2004; Giovannini, 2006; Schafe y col., 2000).

Un estudio reciente utilizando un condicionamiento de miedo contextual, evaluó la señalización de ERK en la ABL después de un protocolo de entrenamiento débil en animales previamente sometidos a una experiencia estresante. Como era de esperar, el estrés incrementó la retención de miedo y activó la vía ERK en la ABL, mientras que la administración sistémica del MDZ atenuó tanto la mayor retención de miedo como el aumento de la expresión de fosfo-ERK (p-ERK) en la ABL (Maldonado y col., 2011). El hecho de que el estrés provocó un aumento de la expresión de p-ERK en la ABL después de la adquisición de miedo es consistente con la opinión de que la exposición a estímulos amenazantes facilita la consolidación de la memoria de miedo. Así, los cambios moleculares, tales como la activación de la vía de señalización de ERK provocada por el estrés que persiste al menos un día, pueden ser la base de la robusta asociación entre el EC y el EI.

### ***Efecto del estrés sobre la reconsolidación de la memoria de miedo***

El sistema GABAérgico también participa en la modulación de la reconsolidación memoria. Por ejemplo, el aumento de la transmisión GABAérgica por la administración de una benzodiacepina interfirió con la reconsolidación de una memoria de miedo (Bustos y col., 2006, 2009; Zhang y Cranney, 2008). Por lo tanto, es relevante preguntarse si el estrés previo al aprendizaje de miedo afecta la desestabilización y posterior reconsolidación de la memoria. En animales estresados, el MDZ no influyó sobre la reconsolidación de una memoria de miedo remota, incluso después de la administración de una dosis alta del MDZ (Bustos y col., 2010). En contraste, el MDZ

interrumpió la reconsolidación de memorias de cualquier edad en animales no estresados (Bustos y col., 2010). Por lo tanto, estos datos sugieren que la desestabilización de la memoria inducida por la evocación es atenuada cuando la memoria de miedo se codifica bajo intensas condiciones de estrés.

Como ya se señaló, el bloqueo de los receptores NMDA en la ABL antes de la evocación de una memoria evita su desestabilización (Mamou y col., 2006), remarcando un rol crucial de la transmisión glutamatérgica en este proceso. En animales previamente estresados, la administración de la D-cicloserina (DCS), un modulador alostérico del receptor NMDA que promueve la unión del agonista y mejora la función de dicho receptor (Rouaud y Billard, 2003), antes de la evocación facilitó la desestabilización de la memoria de miedo resistente ya que dicha memoria fue vulnerable al efecto interferente del MDZ administrado post-evocación (Bustos y col., 2010).

En conjunto, estos resultados indican que el mecanismo subyacente en la desestabilización inducida por la evocación no parece ser funcional en memorias formadas bajo estrés. Este punto de vista abre la posibilidad de que las memorias de miedo formadas bajo un estado emocional negativo, como el provocado por la exposición a un estrés intenso, podrían perder flexibilidad, promoviendo la generación de una memoria traumática.

### **Plasticidad estructural y memoria**

Es un hecho ampliamente aceptado que, durante el aprendizaje, ocurren cambios fisiológicos en la transmisión sináptica que conducen a modificaciones estructurales de la red neuronal necesarios para que la memoria persista (McGaugh, 2000).

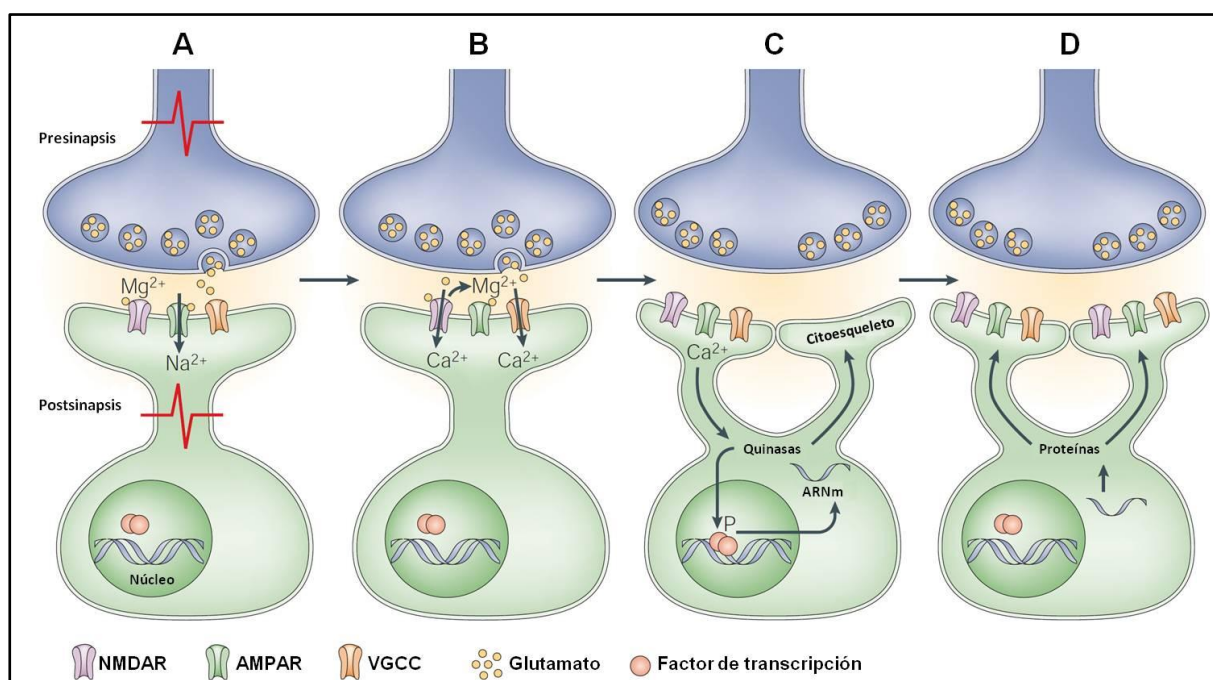
La idea de que la memoria implicaría cambios estructurales en el sistema nervioso comenzó con Eugenio Tanzi y Santiago Ramón y Cajal quienes propusieron que la activación repetida de una neurona produce cambios metabólicos que resultan en la formación de nuevas conexiones con otras neuronas, constituyendo así la base física del aprendizaje y la memoria (Tanzi, 1893; Ramón y Cajal, 1894). Una visión relacionada propuso que los cambios estructurales que ocurren durante el aprendizaje son similares a los procesos de crecimiento neural durante el desarrollo embriológico (Holt, 1931).

Estas ideas constituyeron la base sobre la cual Donald Hebb desarrolló su teoría de plasticidad sináptica asociativa o Hebbiana: cuando dos neuronas se activan de forma repetida y simultánea, se produce una conexión entre ellas lo cual conduce a modificaciones permanentes de la eficacia sináptica entre las dos células (Hebb, 1949). Se entiende por eficacia sináptica al cambio en la amplitud del potencial postsináptico en respuesta a un potencial de acción presináptico. Se propone que el evento activador de este fenómeno es la entrada de calcio en las neuronas postsinápticas a través de los receptores NMDA y los canales de calcio voltaje-dependientes de tipo L (VGCCs). Durante el potencial de membrana en reposo, el flujo de calcio a través del receptor NMDA es bloqueado por magnesio. La activación de los receptores AMPA por glutamato presináptico produce una despolarización postsináptica local que libera a los receptores NMDA de los iones magnesio, permitiendo el influjo postsináptico de calcio. Por otro lado, la propagación de los potenciales de acción abre a los VGCCs, otra fuente de calcio postsináptico. El resultado de la apertura de estos canales es el aumento del calcio intracelular y la posterior activación de vías de señalización adicionales. Por ejemplo, la activación de proteín-quinasas constitutivas, tales como las proteín-quinasas dependientes de calmodulina/calcio (CaMKs), la proteín-quinasa C y la calcineurina, resulta en un aumento de la eficacia sináptica, inicialmente por la fosforilación de distintos receptores de membrana y luego por la activación de la transcripción génica y la síntesis de proteínas. Entre las proteínas sintetizadas, se encuentran receptores AMPA los cuales se insertan en la membrana (Figura 12) (Lamprecht y LeDoux, 2004).

Es ampliamente aceptado que la expresión génica y la síntesis de proteínas resultante durante la plasticidad sináptica son claves para los cambios estructurales que subyacen a la formación de una MLP. Sin embargo, estos cambios moleculares son transitorios y, por sí solos, no son suficientes para explicar el fenómeno de la memoria (Dudai, 2002). Por lo tanto, se ha sugerido que son necesarios eventos adicionales, aunque no son del todo conocidos. (Lamprecht y LeDoux, 2004). En este contexto, se ha propuesto que la modulación de la densidad y/o morfología de las espinas dendríticas puede constituir una base estructural para la formación de una MLP (Sanders y col., 2012).

Las espinas dendríticas son protrusiones pequeñas de las dendritas, las cuales representan una plataforma estructural para la formación de nuevos contactos

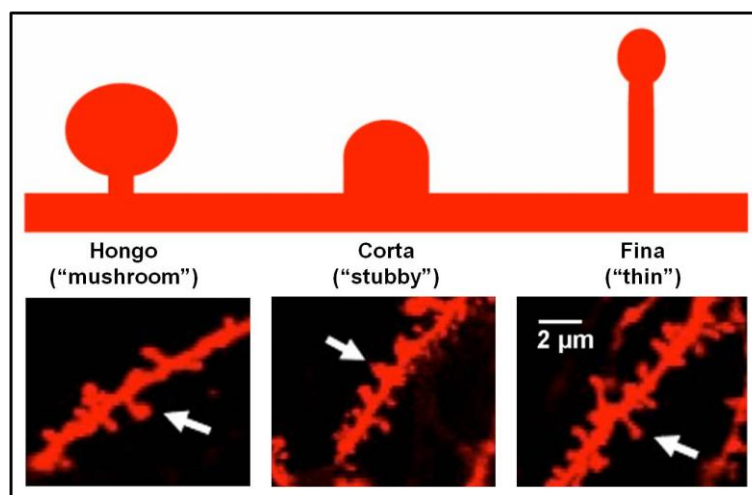
sinápticos o para el fortalecimiento de aquellos ya existentes entre las neuronas (Chapleau y Pozzo-Miller, 2007). En estas espinas terminan la mayoría de las sinapsis excitatorias del cerebro (Gray, 1959). Las espinas proveen un compartimento cerrado que permite cambios rápidos en las concentraciones de moléculas de señalización, como el calcio, y por lo tanto hacen posible respuestas eficientes a los estímulos entrantes. Trabajos de microscopia electrónica diferenciaron a las espinas en tres categorías dependiendo de las dimensiones del largo de la espina, el diámetro de su cabeza y el diámetro de su cuello: Tipo I o espinas “cortas”, Tipo II o espinas que se asemejan a “hongos” y Tipo III o espinas “finas” (Figura 13).



**Figura 12.** Mecanismos moleculares implicados en la iniciación y el mantenimiento de la plasticidad sináptica. **A.** La liberación de glutamato dependiente de actividad de las neuronas presinápticas conduce a la activación de los receptores AMPA (AMPA) y a la despolarización de la neurona postsináptica. **B.** La despolarización de la neurona postsináptica conduce a la eliminación de la inhibición del receptor NMDA (NMDAR) por Mg<sup>+2</sup> y al influjo de Ca<sup>+2</sup> a través del receptor. La despolarización también activa los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC), otra fuente de calcio postsináptico. **C.** La entrada de calcio en la sinapsis activa quinasas que, a su vez, modulan la actividad de sus sustratos. Estos sustratos contribuyen a los cambios locales en las sinapsis, tales como la alteración morfológica a través de la regulación del citoesqueleto, o inducen la transcripción de ARN en el núcleo mediante la regulación de factores de transcripción. **D.** El ARNm transcrito se traduce en proteínas que son capturadas por las sinapsis activadas y contribuyen a la estabilización de los cambios sinápticos. Adaptado de Lamprecht y LeDoux, 2004.

Un amplio número de informes han considerado a las espinas “cortas” y “hongos” como “maduras” (Tyler y Pozzo-Miller 2003; Chapleau y col., 2009; Calfa y col., 2011), ya que presentan mayor densidad de receptores AMPA, son más estables, coordinan mejor los incrementos momentáneos de Ca<sup>+2</sup> en la dendrita y el señalamiento por Ca<sup>+2</sup> entre espinas adyacentes, que las espinas “finas” (Segal y col., 2000; Yuste y col., 2000; Nimchinsky y col., 2002; Kasai y col., 2003; Harris, 1999).

El aumento en el número de espinas post-aprendizaje podría contribuir a la potenciación de la transmisión sináptica que acompaña a la formación de una MLP, ya que supone un aumento del número de conexiones neurales. De acuerdo con este punto de vista, la codificación de una nueva representación contextual resulta en un rápido aumento de la densidad de espinas específicamente en el hipocampo en múltiples paradigmas de memoria, incluyendo la memoria de miedo contextual (Leuner y col., 2003; Restivo y col., 2009; Vetere y col., 2011).



**Figura 13.** Imágenes representativas de la morfología de espinas (escala 2 µm). Adaptado de Sanders y col., 2012.

Se han identificado varios mecanismos moleculares que participan en la modulación del número y/o morfología de las espinas, como la reorganización del citoesqueleto, el aumento de la actividad AMPA, la activación de Rho GTPasas y el aumento de las moléculas de adhesión.

El aumento del calcio intracelular conduce a una rápida polimerización de la actina, lo cual induce el reordenamiento del citoesqueleto (Matus, 2000). La orientación, la cinética de ensamble y la estabilidad de los filamentos de F-actina contribuyen a la forma de las espinas. Diferentes estudios han demostrado que los cambios en la estabilidad y la motilidad de las espinas durante el desarrollo dependen de la polimerización de actina (Fischer y col., 1998; Dunaevsky y col., 1999). Siguiendo esta línea de razonamiento, la adquisición de la memoria podría inducir cambios en la polimerización de la actina resultando en una reorganización de las espinas. Consecuentemente, la formación de una MLP podría ser promovida por una reducción en la motilidad de las espinas dependiente de la actina.



El aumento de la actividad AMPA, tras la inserción de un mayor número de receptores, estabiliza la morfología de las espinas ya que suprime la retracción de las espinas dependiente de la actina (McKinney y col., 1999). Así, los receptores NMDA pueden ser importantes en la fase inicial de la formación de las espinas, seguida por una fase de estabilización mediada por los receptores AMPA, fenómeno esencial para la formación de una MLP.

Las Rho GTPasas y sus moléculas efectoras - proteínas que están involucradas en la regulación de la morfología axonal y la formación dendrítica y de espinas durante el desarrollo - tienen un rol importante en la plasticidad sináptica y en la formación de la memoria. Las Rho GTPasas RhoA (Ras homóloga miembro A), Rac (Ras relacionados C3 sustrato de toxina botulínica 1) y Cdc42 (ciclo de división celular 42) son moléculas de señalización intracelular que funcionan como un interruptor de señalización y pueden encontrarse en forma activa unidas a GTP o en forma inactiva unidas a GDP. En su forma activa, las Rho GTPasas regulan el citoesqueleto de actina y la actividad de las moléculas de adhesión, regulación que sería esencial para la estabilización de los cambios morfológicos que acompañan a los procesos de memoria (Lamprecht y LeDoux, 2004).

Las moléculas de adhesión, mayormente integrinas, cadherinas, neurexina y la superfamilia de las inmunoglobulinas, son moléculas unidas a la membrana que interaccionan con proteínas de la matriz extracelular para controlar la adhesión entre las membranas pre y postsinápticas. Estas moléculas también tienen un componente intracelular por lo que pueden iniciar las vías de señalización que acoplan la dinámica de la conectividad extracelular con eventos intracelulares que controlan la morfología. Las moléculas de adhesión podrían contribuir a los cambios morfológicos que acompañan a la formación de una MLP. Una evidencia en favor de esta interpretación proviene de un trabajo en ratas, donde la N-cadherina fue inducida en la corteza piriforme y en el hipotálamo 2 horas después del condicionamiento de miedo (Ressler y col., 2002). Así, las moléculas de adhesión tienen un rol central en la estabilización progresiva de la conectividad sináptica que conduce a la formación de una MLP.

### **Plasticidad estructural y estrés**

El hipocampo y la amígdala, además de ser componentes esenciales del circuito neural que participa en el condicionamiento de miedo contextual (LeDoux, 2000),

también están implicados en los síntomas cognitivos y afectivos de los trastornos psiquiátricos relacionados con el estrés (McEwen, 1999; Roozendaal y col., 2009).

El estrés afecta diferencialmente el aprendizaje y la memoria dependientes del hipocampo y de la amígdala. En roedores, el estrés facilita el aprendizaje aversivo dependiente de la amígdala pero altera el aprendizaje espacial dependiente del hipocampo (Shors y col., 1992; Luine y col., 1994).

Estos efectos contrastantes del estrés también se observan sobre la morfología de las neuronas del hipocampo y de la amígdala. Por ejemplo, el estrés crónico provoca atrofia dendrítica en neuronas piramidales de CA3 del hipocampo de roedores (Vyas y col., 2002) lo cual coincide con un deterioro del aprendizaje y de la memoria espacial (Sousa y col., 2000). Esta remodelación dendrítica se caracteriza por un acortamiento y desramificación reversibles, de las dendritas apicales y está mediada por mecanismos que implican altos niveles de secreción de glucocorticoides y de liberación de aminoácidos excitatorios (Magariños y McEwen, 1995). En la ABL, por el contrario, el estrés crónico estimula el crecimiento dendrítico y la espinogénesis (fortalecimiento de la base estructural de la conectividad sináptica). Esta remodelación fue paralela a un desarrollo gradual de un incremento en el comportamiento de ansiedad (Vyas y col., 2002). Por lo tanto, ciertas formas de estrés crónico, al afectar a elementos neuronales específicos de la amígdala, pueden dar lugar a manifestaciones comportamentales de emocionalidad aumentada.

La remodelación dendrítica inducida por el estrés en estas dos áreas cerebrales no sólo se diferencia en la polaridad, sino también en términos de su persistencia. Por ejemplo, la hipertrofia dendrítica por estrés crónico en las neuronas principales de la ABL dura hasta por lo menos 21 días después de la terminación del estrés. Por otro lado, la atrofia de CA3 hipocampal es reversible dentro del mismo período de recuperación post-estrés (Vyas y col., 2004).

Curiosamente, las características únicas de los cambios inducidos por el estrés en la amígdala y el hipocampo no se limitan al estrés crónico. En la ABL, el estrés agudo no afecta la densidad de espinas ni la arborización dendrítica 1 día después, pero conduce a un aumento significativo de la densidad de espinas 10 días después. Esto tiene lugar paralelamente a un aumento gradual del comportamiento de ansiedad (Mitra y col.,

2005). En el hipocampo dorsal, el estrés agudo aumenta notablemente el número de espinas 24 horas después (Shors y col., 2001).

En conjunto, estos estudios han ayudado a identificar las características de la plasticidad inducida por el estrés en la amígdala que son contrastantes con las observadas en el hipocampo.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## Hipótesis

Como se señaló anteriormente, la evocación de la memoria ejerce un rol funcional más relevante que la simple lectura pasiva de experiencias previas (Dudai, 2002; Hardt y col., 2010). En apoyo de esta línea argumental, se ha sugerido que la evocación puede desencadenar un estado de plasticidad transitoria permitiendo modificaciones dinámicas de la memoria establecida (Dudai, 2006; Lee, 2009; Sara, 2000; Nader y Hardt, 2009). Desde esta perspectiva, el recuerdo de una traza de memoria es un proceso decisivo que permite flexibilizar las propiedades que definen la memoria original.

Teniendo en cuenta la proposición de que la desestabilización inducida por la evocación y la subsecuente reconsolidación son funcionalmente adecuadas para reescribir memorias emocionales y reajustarlas a los cambios ambientales presentes (Schiller y col., 2010), *es posible que la exposición a una amenaza ambiental no relacionada a la tarea cognitiva, antes de la evocación, pueda ser incorporada a una memoria de miedo ya consolidada por medio de mecanismos de reconsolidación.*

Alternativamente, la evocación de la memoria puede ser influenciada por una experiencia estresante no relacionada sin ser actualizada en la memoria original, ya que la evocación de una memoria de miedo es una experiencia aversiva *per sé* (Dudai, 2002). De hecho, como se sabe, la exposición previa al estrés facilita la expresión de reacciones emocionales negativas a futuros encuentros con una leve estimulación aversiva no relacionada a la información original (Martijena y col., 2002; Calfa y col., 2006; Bignante y col., 2008). Por lo tanto, *los cambios debidos al estrés previo disparados por la evocación pueden corresponder a un nuevo aprendizaje codificado por mecanismos relacionados a un proceso de consolidación más que a una desestabilización de la memoria original seguida por reconsolidación.*

## Objetivo general

**De lo anteriormente expuesto, este trabajo de tesis se propone investigar los mecanismos neurobiológicos implicados en la formación de la memoria resultante de la interacción entre un evento estresante previo a la evocación y una traza de memoria de miedo ya establecida.**

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

**Objetivo específico 1.** Analizar la memoria resultante de la interacción entre un evento estresante y la evocación de una memoria de miedo ya establecida.

***Objetivo específico 1.1.*** Determinar si el efecto del estrés sobre la memoria de miedo es dependiente de la re-exposición al contexto asociado (de entrenamiento).

***Objetivo específico 1.2.*** Determinar si la memoria resultante se debe a una respuesta sensibilizada al estrés producto de la experiencia previa del shock eléctrico.

**Objetivo específico 2.** Determinar si la interrupción de una memoria de miedo establecida previene la facilitación del estrés al momento de la evocación.

**Objetivo específico 3.** Investigar el efecto de la infusión previa al estrés de un agente benzodiazepínico (midazolam) en la ABL sobre la memoria de miedo resultante después de la evocación.

**Objetivo específico 4.** Analizar la contribución relativa de los procesos de consolidación y reconsolidación en la memoria de miedo resultante.

***Objetivo específico 4.1.*** Evaluar la participación del gen de expresión temprana Zif268 hipocampal en la memoria resultante.

***Objetivo específico 4.2.*** Evaluar el efecto sobre la memoria resultante de la inhibición de la degradación proteica mediante la infusión intra-hipocampo dorsal de clasto-lactacistina- $\beta$ -lactona ( $\beta$ -lac).

***Objetivo específico 4.3.*** Evaluar la participación del BDNF hipocampal en la memoria resultante.

**Objetivo específico 5.1.** Analizar la plasticidad estructural en el hipocampo dorsal potencialmente asociada a la memoria resultante de la interacción entre un evento estresante y una traza de memoria de miedo ya establecida.

**Objetivo específico 5.2.** Evaluar la influencia de la modulación de la neurotransmisión GABAérgica en la ABL sobre la plasticidad estructural en el hipocampo dorsal potencialmente asociada con la memoria de miedo resultante de la interacción entre un evento estresante y una traza de memoria de miedo ya establecida.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales**

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar (machos adultos de 60 días de edad, con un peso entre 280 y 320 g) de una colonia establecida en el Departamento de Farmacología – Instituto de Farmacología Experimental Córdoba (IFEC), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Todos los animales fueron alojados en cajas de plexiglás (3-4 ratas por caja), las cuales fueron colocadas en una sala de tratamiento. El alimento y el agua estuvieron disponibles *ad libitum*. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luces encendidas de 07:00 a 19:00 horas) y a una temperatura de 21-23 °C. Los protocolos utilizados han sido aprobados por el Comité de Cuidado de Animales de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, que son consistentes con las normas descritas en la Guía NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. El número de animales utilizados, así como su sufrimiento, se mantuvo en el mínimo posible necesario para lograr los objetivos de este estudio.

### **Sesión de estrés**

Los animales fueron transportados en sus cajas de alojamiento a un cuarto de experimentación y colocados durante 30 minutos dentro de un inmovilizador cilíndrico plástico que impide el movimiento del animal. Estos inmovilizadores poseen aberturas para permitir la entrada de aire durante el procedimiento. Tras la finalización de esta sesión, los animales fueron colocados en sus cajas de alojamiento y posteriormente en la sala de tratamiento. No hubo otros sujetos en el cuarto de experimentación durante la exposición al estrés. Este procedimiento se seleccionó basándose en los hallazgos previos de nuestro laboratorio utilizando un protocolo de estrés similar (Rodríguez Manzanares y col., 2005; Isoardi y col., 2007; Bustos y col., 2010). Los animales fueron re-expuestos al contexto asociado un día después de la exposición al estrés. El uso de este intervalo se basó en datos anteriores de este laboratorio que demostraron que después de este intervalo, el estrés provoca un incremento de la respuesta de congelamiento, indicativo de la formación de una memoria de miedo y aumenta el comportamiento de ansiedad (Rodríguez Manzanares y col., 2005; Bignante y col., 2010). Los animales no estresados fueron trasladados al cuarto de experimentación donde permanecieron sin inmovilización durante 30 minutos y al cabo de este tiempo regresaron a la sala de tratamiento.



### **Aparato de condicionamiento**

El compartimento de condicionamiento fue designado como contexto A (CA) y colocado en una habitación aislada acústicamente y a una temperatura constante de  $21 \pm 2$  °C. Este compartimento tiene paredes de plástico de color blanco (20 × 23 × 20 cm) y una tapa transparente. El piso consiste en una grilla de 10 barras de acero inoxidable paralelas, de 4 mm de diámetro cada una y espaciadas a 1,5 cm una de otra. Esta grilla metálica se acopla a una fuente de voltaje (UgoBasile Biological Research Apparatus, Italia) que proporciona el shock eléctrico. La iluminación fue proporcionada por una bombilla de luz blanca de 2,5 W. El ruido de fondo proviene de la ventilación y la fuente de voltaje (55 dB). El compartimento no asociado, designado como contexto B (CB), es de madera (33 × 25 × 33 cm) y tiene las paredes negras, una tapa de plástico transparente y el piso de caucho negro. El diseño de este compartimento tiene por finalidad hacerlo lo más diferente posible del que se usó originalmente durante el condicionamiento y, por lo tanto, maximizar la posibilidad de obtener diferentes niveles de expresión de la memoria adquirida. Consecuentemente, las diferencias en la expresión del aprendizaje en estas circunstancias podrían atribuirse a los cambios contextuales y/o cambios con respecto a los estímulos discretos que definen el contexto. Ambos compartimentos se limpiaron con solución acuosa de etanol al 70% antes y después de cada sesión. Los experimentos se realizaron siempre entre las 14:00 y 16:00 horas con operadores que desconocen la condición experimental de cada tratamiento.

### **Procedimientos comportamentales**

#### ***Condicionamiento de miedo contextual***

En el primer día del experimento, dos grupos de ratas seleccionadas al azar se transportaron al cuarto de condicionamiento y fueron colocadas individualmente en el contexto de condicionamiento A y permanecieron allí durante un período de aclimatación de 3 minutos (período pre-shock), seguido de un solo shock eléctrico en las patas (0,3 mA, 3 s de duración) (grupo CA-EI), o bien, las ratas no recibieron el shock eléctrico (grupo CA-no EI). Los animales permanecieron en el contexto CA durante un período adicional de 50 segundos (período post-shock). Al final de este período, las ratas fueron retiradas del compartimento de condicionamiento, colocadas en sus cajas de alojamiento y transportadas a la sala de tratamiento. La administración

de un solo shock eléctrico permite obtener un bajo nivel de “freezing”, y visualizar una potencial facilitación de la memoria de miedo por el tratamiento de estrés (Maldonado y col., 2011). En los experimentos en los cuales los animales fueron implantados en la ABL o el HD, la intensidad del shock eléctrico fue de 0,5 mA con el fin de inducir niveles de “freezing” similares a los exhibidos por los animales sin implantes de cánulas, ya que la canulación crónica tiende a atenuar la expresión del “freezing” condicionado (Fanselow, 1980; Lee y col., 2006). Para el procedimiento de condicionamiento robusto (objetivo específico 4.1), los animales fueron colocados en el contexto A, permitiendo un período de aclimatación de 3 minutos (período pre-shock) seguido por tres shocks en las patas (0,5 mA, duración 3 s, intervalo intershock 30 s). Los animales permanecieron en el compartimento durante 2 minutos adicionales (período post-shock), después de lo cual fueron retirados, colocados en sus cajas de alojamiento y transportados a la sala de tratamiento (Isoardi y col., 2004; Rodríguez Manzanares y col., 2005; Bustos y col., 2006).

### ***Déficit por shock inmediato***

Es conocido que en el condicionamiento de miedo contextual, la rata exhibe un comportamiento de “freezing” cuando se administra un shock eléctrico en las patas después de un breve período de aclimatación. Sin embargo, cuando los animales no son sometidos a este período de aclimatación previo y reciben un shock eléctrico inmediato al entrar en el contexto, estos no expresan un comportamiento de “freezing” en un test de retención posterior en el mismo contexto, indicando la ausencia de aprendizaje de miedo contextual. Por lo tanto, los animales deben permanecer un período de tiempo sustancial en el contexto antes de la presentación del shock para la ocurrencia del condicionamiento de miedo contextual (Landeira-Fernández y col., 2006). Este fenómeno ha sido definido como déficit por shock inmediato. En este caso, las ratas se colocaron en el contexto de entrenamiento y recibieron un solo shock eléctrico dentro de los 10 s desde la entrada en dicho contexto. Después del shock, las ratas fueron rápidamente retiradas del contexto, colocadas en sus cajas de alojamiento y transportadas a la sala de tratamiento.

### ***Sesiones de test***

Las ratas fueron re-expuestas al CA 2 y 7 días después del entrenamiento (Test 1 y Test 2, respectivamente) sin la presentación del shock durante 3 minutos. El

comportamiento de “freezing” se evaluó durante el Test 1 como un índice de la evocación de la memoria y durante el Test 2 como un índice de la retención de la memoria. Con el fin de controlar la especificidad del contexto, otro grupo de animales fueron condicionados como se describió anteriormente (1 shock) en el CA y colocados por el mismo período de tiempo (3 minutos) en el CB para evaluar el comportamiento de “freezing”.

Una semana antes de los experimentos cada una de las ratas fue manipulada por el operador aproximadamente durante 15 segundos/día. Cada procedimiento fue grabado continuamente con el fin de medir el comportamiento de “freezing” durante el período de pre-shock y post-shock y durante los 3 minutos de las sesiones de test, ya sea en el contexto A o B. El tiempo de “freezing” en cada período se cuantificó (en segundos) con un cronómetro y se expresó como el porcentaje del tiempo total del período en cuestión (Bustos y col., 2010). El comportamiento de “freezing” o congelamiento es un índice de miedo usado comúnmente en ratas (Blanchard y Blanchard, 1969; Fanselow, 1980), y se define como la ausencia total de movimiento de la cabeza y el cuerpo, excepto los relacionados con la respiración.

### **Cirugía e infusiones intracraneales**

En condiciones asépticas, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina (55 mg/kg, i.p.; Keta-Jects) y xilazina (11 mg/kg i.p.; Xyla-Jects) y colocadas en un aparato estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, IL). Se realizó una incisión y retracción del cuero cabelludo, y la posición de la cabeza fue ajustada para colocar bregma y lambda en el mismo plano horizontal con el set de la barra de los incisores a -3,3 mm. Dos cánulas guías de acero inoxidable se bajaron estereotáxicamente en la ABL (calibre 22 g; longitud 12 mm) o en el HD (calibre 22 g; longitud 9 mm) utilizando las siguientes coordenadas respecto a bregma: ABL: anterior, -2,8 mm; lateral,  $\pm$  5,0 mm; ventral, -6,1 mm; HD: anterior, -3,8 mm; lateral,  $\pm$  2,0 mm; ventral, -2,0 mm (Paxinos y Watson, 2007). Estas coordenadas se establecieron a partir de estudios experimentales previos del laboratorio (Rodríguez Manzanares y col., 2005; Calfa y col., 2007). Las cánulas guías se fijaron mediante cemento acrílico y dos tornillos de acero inoxidable que fueron anclados al cráneo. Los animales fueron retirados del estereotáxico para recuperarse bajo una lámpara de calor y con una estrecha supervisión. Después de la cirugía, los animales recibieron una inyección subcutánea de una suspensión de penicilina/estreptomicina para reducir el riesgo de infecciones.

Los animales fueron sujetos a un período de recuperación de la cirugía de 5-7 días, antes de los procedimientos experimentales y fueron manipulados por el operador como se describió anteriormente.

Las microinfusiones “*in situ*” se realizaron utilizando inyectores de un calibre de 33 gauge que se extienden 1,5 mm más allá de las cánulas guías implantadas en la ABL o 1 mm más allá de las cánulas guías implantadas en el HD. Los inyectores se conectaron por medio de un tubo de polietileno (PE 10, Becton Dickinson, MD) a una microjeringa de 10  $\mu$ l (Hamilton, Reno, NV) montada en una bomba de microinfusión (Cole-Parmer® 74900-Series).

### Drogas y administración de drogas

El midazolam (MDZ; GobbiNovag, Buenos Aires, Argentina) se diluyó en solución salina isotónica estéril (SAL, 0,9% p/v). El inhibidor del proteosoma clasto-lactacistina- $\beta$ -lactona ( $\beta$ -lac, Sigma-Aldrich) se disolvió en DMSO/PBS al 2% y se ajustó a un pH de 7.0-7.4 con NaOH. Los oligonucleótidos (ODN; Genbiotech) se resuspendieron en PBS estéril: ODN antisentido contra BDNF (ASO BDNF), 5'-TCT TTT AAT TCC AAC GGT-3'; ODN sinsentido contra BDNF (MSO BDNF), 5'-TCT ATA CTT CTT GTT GCC-3'; ODN antisentido contra Zif268 (ASO Zif268), 5'-GGT TGT AGT CCA TGG TGG-3'; ODN sinsentido contra Zif268 (MSO Zif268), 5'-GTG GTG TTC GGT AGG TCA-3'.

El MDZ (2 mg/ml) fue administrado intraperitonealmente (i.p.) a una dosis de 2.0 mg/kg. Para la infusión intra-ABL, cada rata fue infundida bilateralmente con 0,5  $\mu$ l por lado de MDZ (1  $\mu$ g/0,5  $\mu$ l) o SAL a una velocidad de 0,5  $\mu$ l/min durante un período de 60 segundos (Rodríguez Manzanares y col., 2005). Esta dosis de MDZ fue seleccionada basándose en estudios anteriores donde se demostró que fue eficaz para atenuar los efectos inducidos por el estrés sobre la formación de una memoria de miedo (Rodríguez Manzanares y col., 2005).  $\beta$ -lac (32 ng/ $\mu$ l) fue infundido bilateralmente en el HD (1  $\mu$ l por lado, 0,5  $\mu$ l/min) (Lee 2008; Lee y col., 2008). Las dosis y la velocidad de infusión de los ODNs se basaron en estudios previos (Lee y col., 2004; Bekinschtein y col., 2007; Lee 2008). Los ODNs para Zif268 (2 nmol/ $\mu$ l) y BDNF (2 nmol/ $\mu$ l) fueron infundidos de forma bilateral en el HD 90 minutos antes del Test 1 (1,0  $\mu$ l por lado; 0,125  $\mu$ l/min) (Lee 2008). En todos los casos, después de la finalización de la infusión, los inyectores se mantuvieron en su lugar por un período adicional de 120 segundos para permitir la difusión de la droga.

### ELISA

Los animales fueron transferidos individualmente a una sala experimental donde se procedió al sacrificio. Los cerebros se extrajeron rápidamente y se colocaron en una matriz de acrílico (Stoelting CO., EE.UU.) en hielo. Se prepararon cortes coronales de cerebro de 1 mm que contenían el hipocampo, y a partir de dicho corte se disecó el HD. El tejido fue homogeneizado en 300 µl de buffer de lisis (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1% de NP40, 10% de glicerol, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo) con inhibidores de proteasa (10 µg/ml de aprotinina, 1 mg/ml de leupeptina) y el inhibidor de fosfatasa (0,5 mM ortovanadato de sodio). El homogenato se incubó en hielo durante 15 minutos y se centrifugó a 12.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. Se recolectó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas totales utilizando el DC Protein Assay (Bio-Rad). El BDNF se midió usando el kit “*BDNF ELISA Emax Immunoassay System*” (Promega) según las instrucciones del fabricante. Los niveles de BDNF se determinaron en relación con una curva estándar construida a partir de medidas proporcionadas por los estándares de proteína BDNF del kit (0-500 pg de proteína BDNF) que se analizaron simultáneamente con las muestras experimentales. Los niveles de BDNF se expresan como pg de BDNF por cada 1 mg de proteína de la muestra.

### Densidad y forma de las espinas dendríticas

Las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral (400 mg/kg i.p.) y se perfundieron transcardialmente primero con solución PB (0,1 M, pH 7,4) y luego con una solución de paraformaldehído (PFA) 4% (disuelto en PB 0,1 M, pH 7,4) para la fijación. El cerebro fue extraído y colocado en la misma solución fijadora durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente, los cerebros se seccionaron con un vibrátomo (rebanadas de 200 µm de espesor) para aislar el HD y se recogieron en PBS 0,1%. Luego se realizó la tinción celular de la región apical del área CA1 hipocampal mediante la microinyección con una pipeta de “*patch*” de gotas pequeñas (<10µm) de una solución saturada del colorante lipofílico “*dye 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocya-nine perchlorate*” (Dil, InVitrogen, Carlsbad, CA) en aceite de pescado (Pozzo-Miller y col., 1999). Las rebanadas fueron colocadas en PBS 0,1 M durante 24 horas a temperatura ambiente en la oscuridad y luego post-fijadas nuevamente en PFA 4% durante toda la noche. Posteriormente, luego de los lavados pertinentes, las rebanadas fueron montadas en portaobjetos para la toma de imágenes

de segmentos dendríticos individuales mediante el uso de un microscopio confocal de barrido láser (Olympus FV300 60X, 1,42 NA objetivo de inmersión en aceite). La cuantificación y la diversificación de las espinas se realizaron manualmente (Murphy y Segal, 1996, Calfa y col., 2011; Chapleau y col., 2009), utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.). Las espinas dendríticas se clasificaron como Tipo I o “cortas”, Tipo II u “hongos” y Tipo III o “largas”, siguiendo criterios publicados (Boda y col., 2004; Koh y col., 2002).

### **Procedimientos histológicos**

Después de los tests de comportamiento, las ratas se sacrificaron mediante una sobredosis de hidrato de cloral y sus cerebros se retiraron y se sumergieron en una solución de fijación de PFA al 4%. Las secciones frontales se cortaron en un criostato (Leica, Nussloch, Alemania). Posteriormente se verificó la colocación de las cánulas a lo largo de la ABL y el HD bajo un microscopio óptico. Los animales con una colocación de las cánulas incorrecta o con daños del tejido se excluyeron del análisis de datos.

### **Los análisis estadísticos**

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  EEM (error estándar de la media). Los datos comportamentales y bioquímicos se analizaron mediante el test t de Student o el análisis de varianza (ANOVA). Cuando el ANOVA fue significativo se siguió con un análisis a posterior (Bonferroni) para permitir la comparación específica entre grupos. Para evaluar la homogeneidad de varianza se utilizó el test de Levene. El nivel de significancia usado para todos los análisis estadísticos fue  $p < 0,05$ . Para la realización del análisis estadístico se utilizó el programa de computación STATISTICA 7.0.

# RESULTADOS

## Objetivo específico 1

***Analizar la memoria resultante de la interacción entre un evento estresante y la evocación de una memoria de miedo ya establecida.***

El presente experimento tuvo como objetivo analizar si la exposición al estrés no relacionado al paradigma de aprendizaje influye sobre la traza de la memoria de miedo al momento de la evocación. Para tal fin, los animales fueron asignados aleatoriamente a dos grupos; un grupo fue sometido a un protocolo entrenamiento de un solo shock en las patas o “*footshock*” (CA-EI) y el otro no recibió ningún “*footshock*” durante el período de la prueba (CA-no EI). Veinticuatro horas después, las ratas de ambos grupos fueron seleccionadas al azar nuevamente y expuestas a una experiencia estresante (estrés, E) o mantenidas en sus cajas de alojamiento sin manipulación (no estrés, NE). Posteriormente, el comportamiento de “*freezing*” fue medido durante el Test 1 y el Test 2 (Figura 14A). Los diferentes grupos experimentales asignados fueron los siguientes: CA-no EI/NE (n=8); CA-no EI/E (n=8); CA-EI/NE (n= 8); CA-EI/E (n=8).

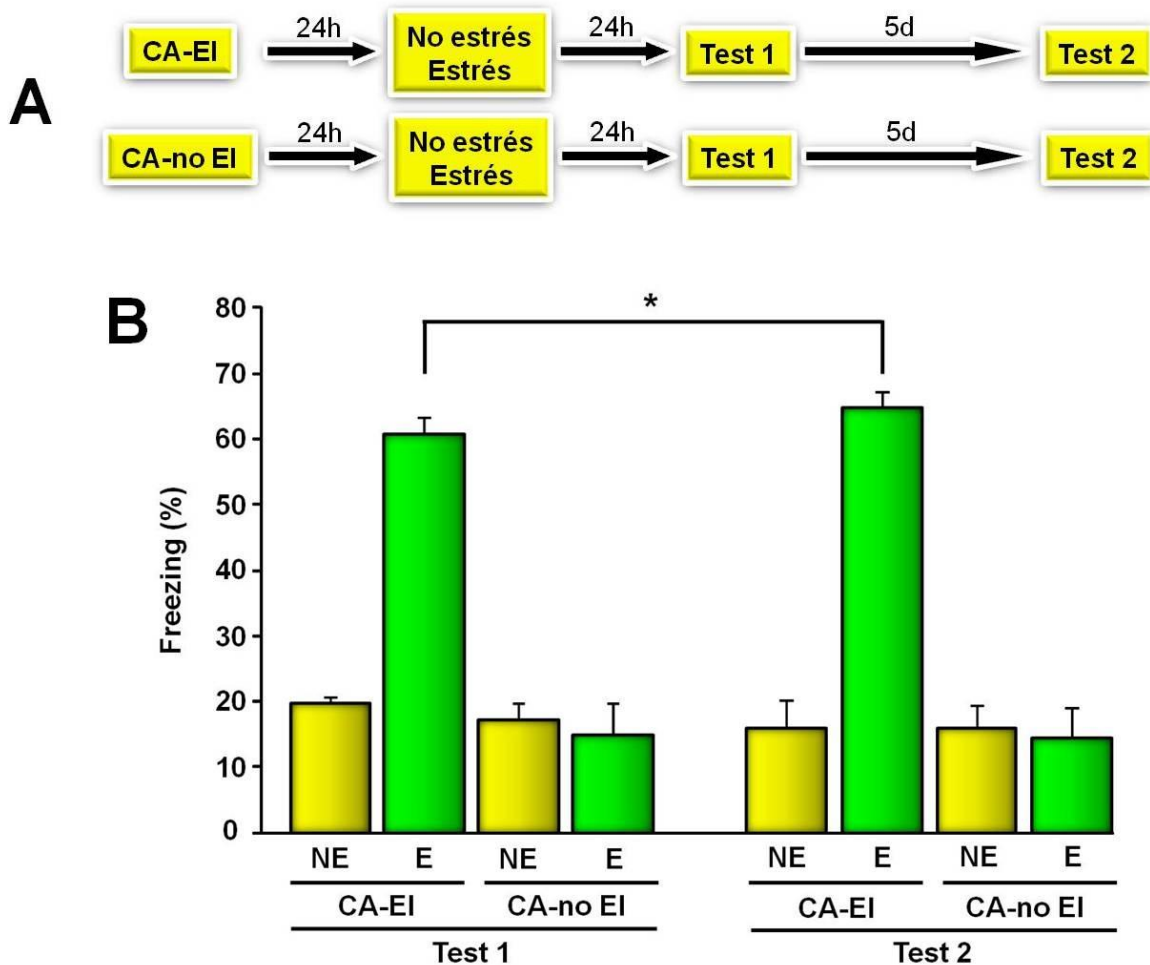
El análisis de t de Student para el tiempo de “*freezing*” durante el período de pre-shock mostró un efecto no significativo entre los grupos CA-EI vs CA-no EI ( $p=0,961$ ). La media  $\pm$  EEM del porcentaje de “*freezing*” pre-shock para cada grupo fue: CA-EI:  $10,37 \pm 1,22$ ; CA-no EI:  $10,29 \pm 1,31$ . El análisis de t de Student para el tiempo de “*freezing*” durante el período de post-shock reveló un efecto significativo entre los grupos CA-EI vs CA-no EI ( $p<0,001$ ), donde los animales que recibieron el shock mostraron un aumento significativo de la respuesta de “*freezing*” durante el período post-shock en comparación con el grupo que no recibió el shock. La media  $\pm$  EEM del porcentaje de “*freezing*” post-shock para cada grupo fue: CA-EI:  $29,31 \pm 1,73$ ; CA-no EI:  $5,64 \pm 1,85$ .

El análisis de ANOVA de dos vías con medidas repetidas indicó un efecto significativo del entrenamiento [ $F(1,26)=181,01$ ;  $p<0,05$ ], del estrés [ $F(1,26)=76,208$ ;  $p<0,05$ ], de la interacción entrenamiento x estrés [ $F(1,26)=92,572$ ;  $p<0,05$ ], de la sesión de test como medidas repetidas [ $F(1,26)=6,943$ ;  $p<0,05$ ] y de la interacción entrenamiento x sesión de test [ $F(1,26)=4,997$ ;  $p=0,034$ ] sobre la respuesta de “*freezing*” durante el Test 1 y el Test 2. Sin embargo, no hubo un efecto estadísticamente significativo de la interacción estrés x sesión de test [ $F(1,26)=0,128$ ;  $p=0,723$ ] y de la interacción entrenamiento x estrés x sesión de test [ $F(1,26)=0,073$ ;



$p=0,788$ ]. Como se muestra en la Figura 14B, los valores de “freezing” en el Test 1 y en el Test 2 fueron similares. De la información estadística relevante, el procedimiento de entrenamiento utilizado resultó en bajos niveles “freezing” en las sesiones de tests en ratas no estresadas. Es relevante indicar que las ratas estresadas testeadas en el contexto asociado exhibieron altos niveles “freezing” en comparación con los restantes grupos experimentales en ambos tests ( $p<0,05$ ).

Por lo tanto, la exposición a una experiencia estresante no relacionada al entrenamiento de aprendizaje inicial potencia tanto la expresión como la retención de miedo, indicando que la combinación del condicionamiento de miedo, el estrés y la sesión de evocación conduce a un fortalecimiento de la memoria de miedo, la cual persistió al menos 5 días después de la evocación (Test 1).



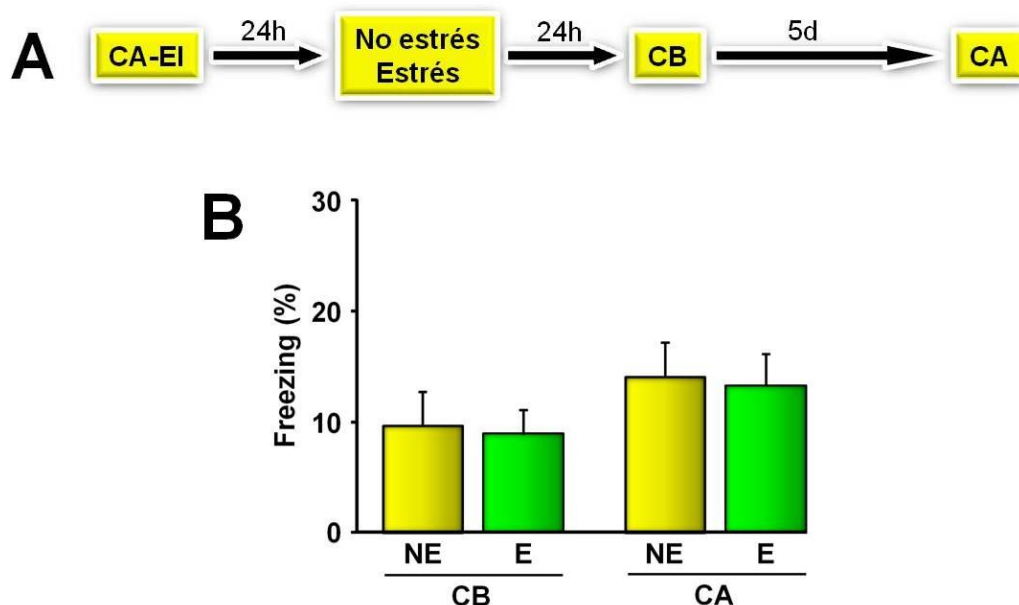
**Figura 14.** La interacción entre el estrés y la evocación de una traza consolidada potencia la memoria de miedo resultante. **A.** Representación esquemática del diseño experimental. **B.** Respuesta de “freezing” durante el Test 1 y Test 2. Los animales no estresados (NE) y los estresados (E) fueron previamente condicionados (CA-EI) o expuestos al contexto sin recibir el shock (CA-no EI). Datos expresados como la media  $\pm$  EEM del porcentaje de “freezing” durante cada test ( $n=6-8$  ratas por grupo). \*  $p<0,05$  comparado al resto de los grupos experimentales (ANOVA de muestras repetidas, test post-hoc de Bonferroni).

## Objetivo específico 1.1

**Determinar si el efecto del estrés sobre la memoria de miedo es dependiente de la re-exposición al contexto de entrenamiento.**

Para evaluar si el efecto del estrés sobre la memoria del miedo es específico para el contexto asociado, un grupo de animales fue sometido a una sesión de condicionamiento de miedo donde recibieron un solo shock (CA-EI). Un día después, los animales fueron expuestos a una experiencia estresante (estrés, E) o mantenidos en sus cajas de alojamiento sin manipulación (no estrés, NE). Veinticuatro horas más tarde, todos los animales fueron expuestos a un contexto novel no asociado (CB) y se determinó el comportamiento de “freezing”. Cinco días después, los animales fueron re-expuestos al CA y luego se evaluó su comportamiento de “freezing” (Figura 15A). Los diferentes grupos experimentales fueron los siguientes: CA-EI/NE (n=7); CA-EI/E (n=8).

El análisis de ANOVA de medidas repetidas reveló un efecto no significativo del estrés [ $F(1,13)=0,024$ ;  $p=0,878$ ], de la sesión de test como medidas repetidas [ $F(1,13)=3,917$ ;  $p=0,069$ ] y de la interacción estrés x sesión de test [ $F(1,13)=0,003$ ;  $p=0,958$ ] (Figura 15B).



**Figura 15. A.** Representación esquemática del diseño experimental. **B.** Respuesta de “freezing” de animales estresados (E) y no estresados (NE) durante la exposición al CB y al CA. Datos expresados como la media  $\pm$  EEM del porcentaje de “freezing” durante cada test (n=6-8 ratas por grupo).  $p>0,05$  en todas las interacciones (ANOVA de muestras repetidas).

Se observó una respuesta de miedo mínima cuando los animales fueron colocados en el contexto no asociado y luego en el contexto de condicionamiento, lo cual indica que el efecto facilitador inducido por el estrés es contingente con la evocación de la memoria en el contexto asociado, y no es producido por una simple generalización de la respuesta de miedo. Además, las ratas estresadas mostraron un bajo nivel de “freezing” durante la re-exposición al CA. Estos hallazgos indican que para observar la influencia del estrés, la evocación de la memoria debe ocurrir al menos un día después de la exposición al estrés.

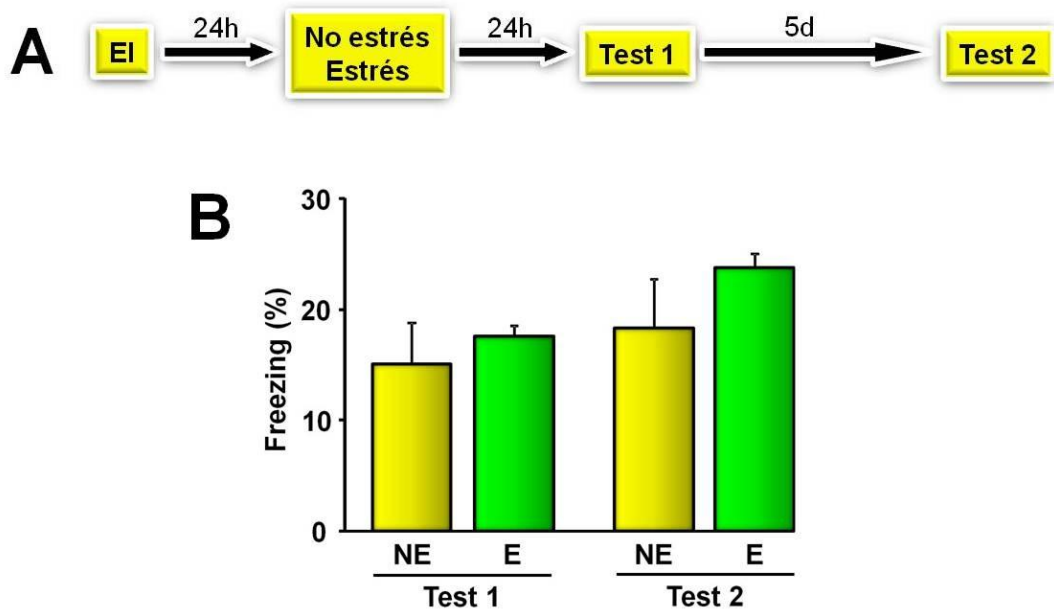
### **Objetivo específico 1.2**

***Determinar si la memoria resultante se debe a una respuesta de sensibilización al estrés producto de la experiencia previa del shock eléctrico.***

Se podría argumentar que la mayor expresión y retención de miedo en animales estresados podría ser inducida por una respuesta de sensibilización a la sesión de estrés resultante de la experiencia previa con un shock eléctrico en las patas. Para controlar esta posibilidad, las ratas fueron sometidas a un protocolo de déficit por shock inmediato (ver materiales y métodos). Un día después, los animales fueron expuestos a una experiencia estresante (estrés, E) o mantenidos en sus cajas de alojamiento sin manipulación (no estrés, NE). Posteriormente, se determinó el comportamiento de “freezing” durante el Test 1 y el Test 2 (Figura 16A). Los diferentes grupos experimentales fueron los siguientes: EI/NE (n=8); EI/E (n=8).

El análisis de ANOVA de medidas repetidas reveló un efecto significativo de la sesión de test como medidas repetidas [ $F(1,14)=11,514$ ;  $p=0,0043$ ]. Sin embargo, no hubo un efecto significativo del estrés [ $F(1,14)=1,618$ ;  $p=0,224$ ] y de la interacción estrés x sesión de test [ $F(1,14)=0,015$ ;  $p=0,903$ ] (Figura 16B).

A pesar de que se observó un efecto significativo de la sesión de test, la respuesta de “freezing” no fue diferente entre ratas estresadas y no estresadas en ninguna sesión ( $p>0,05$ ). De hecho, las ratas estresadas y no estresadas mostraron niveles de “freezing” similares en ambos test, apoyando la visión de que el elevado nivel de “freezing” observado en el experimento anterior en los animales estresados no se debió a una respuesta de sensibilización resultante de la experiencia previa no asociativa del shock. Este resultado es indicativo de que para que se concrete la interacción con el estrés durante la evocación es necesaria la formación de una memoria asociativa.



**Figura 16. A.** Representación esquemática del diseño experimental. **B.** Respuesta de “freezing” durante el Test 1 y Test 2. Los animales que fueron previamente sometidos a un protocolo de déficit por shock inmediato. Datos expresados como la media  $\pm$  EEM del porcentaje de “freezing” durante cada test (n=6-8 ratas por grupo).  $p>0,05$  en todas las interacciones (ANOVA de muestras repetidas).

## Objetivo específico 2

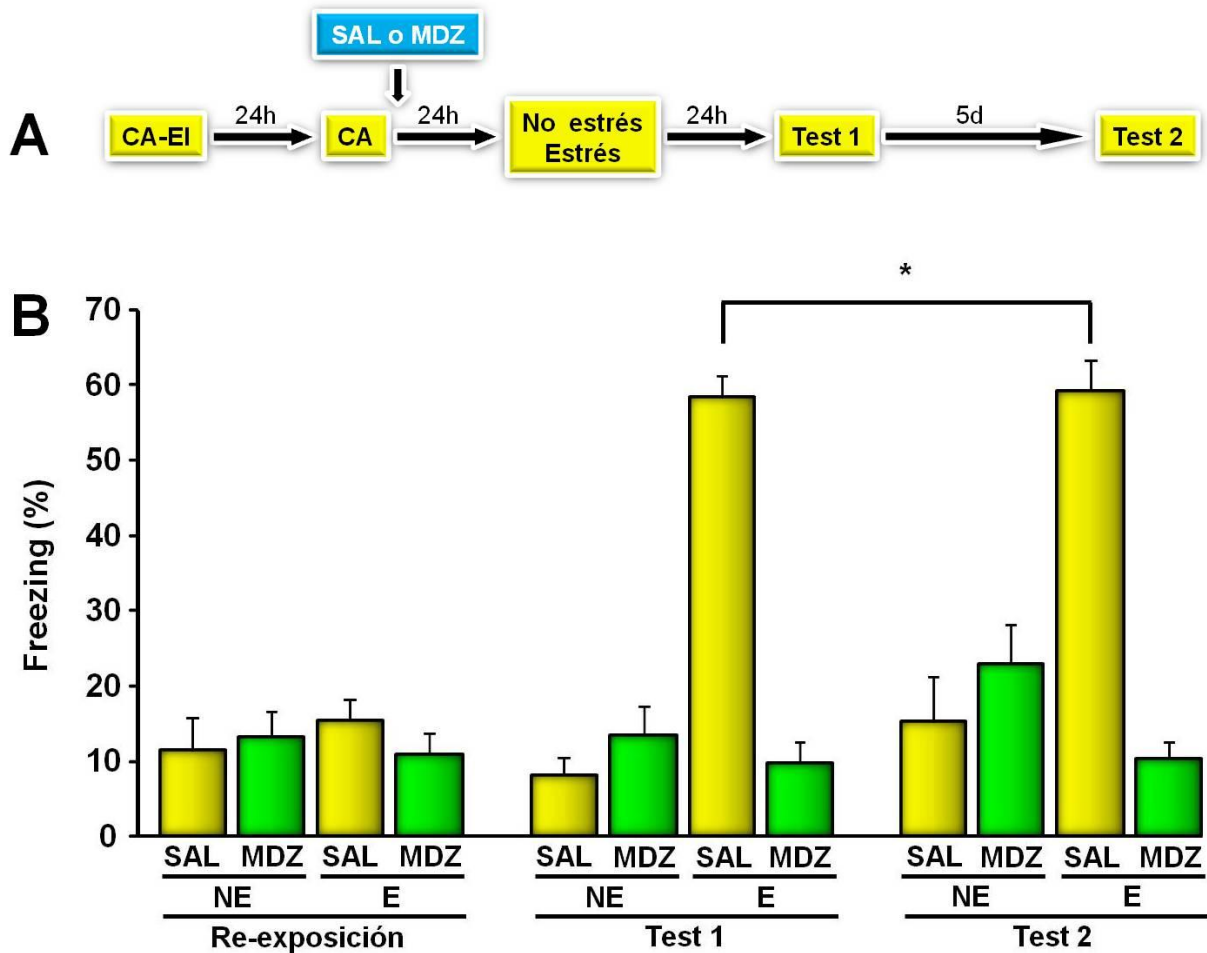
***Determinar si la interrupción de la memoria de miedo establecida previene la facilitación del estrés al momento de la evocación.***

Los resultados del objetivo específico 1 demostraron que la facilitación inducida por el estrés sobre la memoria de miedo resultó de la interacción entre una traza de memoria ya establecida, la experiencia ambiental amenazante novedosa y la evocación de la memoria original. La predicción que surge a partir de este hallazgo sugiere que si se interfiere con la memoria asociativa original se anularía el efecto del estímulo estresante sobre la memoria de miedo. La interrupción de una memoria establecida potencialmente puede lograrse interfiriendo los mecanismos de reconsolidación. Por lo tanto, la interferencia de la reconsolidación debería alterar la traza original e impediría la facilitación ejercida por el estrés al momento de la evocación.

Los animales fueron sometidos a una sesión de condicionamiento de miedo donde recibieron un solo shock (CA-EI). Un día después, fueron re-expuestos al contexto asociado e inmediatamente después administrados i.p. con salina (SAL) o midazolam (MDZ), conocido agente farmacológico que bloquea la reconsolidación de la memoria de miedo (Bustos y col., 2006). Veinticuatro horas más tarde, los animales fueron expuestos a una experiencia estresante (estrés, E) o mantenidos en sus cajas de alojamiento sin manipulación (no estrés, NE). Posteriormente, se determinó el comportamiento de “freezing” durante el Test 1 y el Test 2 (Figura 17A). Los diferentes grupos experimentales fueron los siguientes: SAL/NE (n=8); SAL/E (n=8); MDZ/NE (n=8); MDZ/E (n=8).

El análisis de ANOVA de una vía del porcentaje de “freezing” durante la sesión de reactivación indicó, como era de esperar, diferencias no significativas entre los grupos [F(3,28)=0,371; p=0,774] (Figura 17B). El ANOVA de medidas repetidas reveló un efecto significativo de la droga [F(1,28)=64,571; p<0,05], del estrés [F(1,28)=55,925; p<0,05] y de la interacción droga x estrés [F(1,28)=103,74; p<0,05] sobre el comportamiento de “freezing” durante el Test 1 y Test 2. Sin embargo, no hubo un efecto significativo de la sesión de test [F(1,28)=4,139; p=0,0515] y de las interacciones sesión de test x droga [F(1,28)=0,007; p=0,931], sesión de test x estrés [F(1,28)=1,271; p=0,269] y droga x estrés x sesión de test [F(1,28)=0,306; p=0,584].

Así, como se muestra en la (Figura 17B), los valores observados en el Test 1 y en el Test 2 fueron similares. La información estadísticamente relevante refleja un alto nivel de “freezing” en ratas estresadas administradas con SAL en comparación con los animales no-estresados o estresados tratados con MDZ. En definitiva, la interferencia de la reconsolidación de la memoria original por administración de MDZ atenúa la influencia del estrés sobre la memoria resultante luego de la evocación.



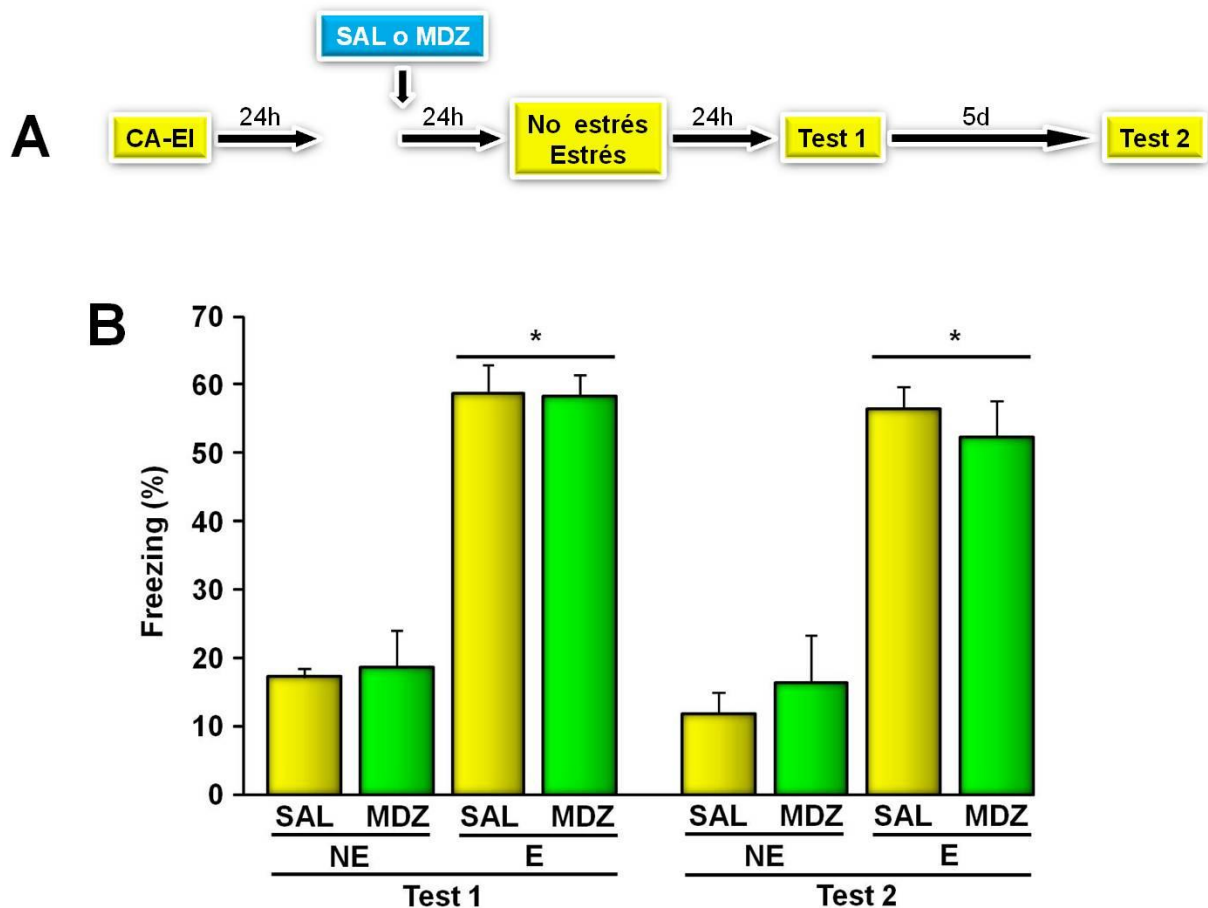
**Figura 17.** El midazolam afecta la reconsolidación de la memoria de miedo y modifica la interacción del estrés y la evocación de una traza consolidada. **A.** Representación esquemática del diseño experimental. **B.** Respuesta de “freezing” de animales no estresados (NE) y estresados (E) durante la re-exposición, Test 1 y Test 2 (re-exposición;  $p > 0.05$ , ANOVA de una vía). Los animales recibieron una dosis del MDZ (2 mg/Kg) o SAL inmediatamente después de la sesión de re-exposición. Datos expresados como la media  $\pm$  EEM del porcentaje de “freezing” durante cada test (n=8 ratas por grupo). \*  $p < 0,05$  comparado al resto de los grupos experimentales (ANOVA de muestras repetidas, test post-hoc de Bonferroni).

Con el propósito de controlar que la acción interferente del MDZ se ejerce sobre la reconsolidación, grupos de ratas fueron tratadas de manera similar excepto que no fueron sometidos el procedimiento de reactivación (Día 2) (Figura 18A).

## RESULTADOS

El ANOVA de medidas repetidas reveló un efecto significativo del estrés [ $F(1,28)=265,59$ ;  $p<0,05$ ], pero un efecto no significativo de la droga [ $F(1,28)=0,343$ ;  $p=0,563$ ] y de las interacciones estrés x droga [ $F(1,28)=2,085$ ;  $p=0,159$ ] y estrés x droga x sesión de test [ $F(1,28)=0,016$ ;  $p=0,99$ ] sobre el comportamiento de “freezing” durante el Test 1 y Test 2.

En consecuencia, el tratamiento con MDZ no tuvo ningún efecto sobre la potenciación del comportamiento de “freezing” inducida por el estrés en el Test 1 y Test 2 (Figura 18B), lo que sugiere que este efecto del MDZ es contingente a la reactivación/reconsolidación de la memoria.



**Figura 18.** A. Representación esquemática del diseño experimental. B. Respuesta de “freezing” durante el Test 1 y Test 2 de animales no estresados (NE) y estresados (E) que recibieron previamente una dosis de MDZ o SAL sin la re-exposición al contexto asociado. Datos expresados como la media  $\pm$  EEM del porcentaje de “freezing” durante cada test ( $n=8$  ratas por grupo). \*  $p<0,05$  comparado al resto de los grupos experimentales (ANOVA de muestras repetidas, test post-hoc de Bonferroni).

En resumen, y en apoyo de la predicción descrita anteriormente, estos datos indican que la alteración de la reconsolidación de la memoria por efecto de MDZ (Bustos y col., 2006), evita la memoria de miedo resultante de la interacción entre el estrés y la evocación de la traza original.

### Objetivo específico 3

***Investigar el efecto de la infusión previa al estrés de un agente benzodiazepínico (midazolam) en la ABL sobre la memoria de miedo resultante después de la evocación.***

Una serie de evidencias han demostrado que la activación de sitios GABA-A por la infusión local del MDZ en la ABL antes de un desafío amenazante previene las secuelas comportamentales de la exposición al estrés, incluyendo la facilitación de la formación de una memoria de miedo (Rodríguez Manzanares y col., 2005; Maldonado y col., 2011). El objetivo de este experimento fue explorar la posibilidad de que la facilitación ejercida por el estrés en nuestro esquema experimental sea dependiente de la neurotransmisión GABAérgica en ABL. Por lo tanto, se investigó el efecto del MDZ intra-ABL antes de la sesión de inmovilización sobre la memoria de miedo resultante después de la evocación.

Se implantaron cánulas bilateralmente en la ABL de 31 animales y, una semana más tarde, estos fueron sometidos a una sesión de condicionamiento de miedo donde recibieron un solo shock (CA-EI). Un día después, las ratas fueron administradas con salina (SAL) o MDZ intra-ABL y 10 minutos más tarde expuestas a una experiencia estresante (estrés, E) o mantenidas en sus cajas de alojamiento sin manipulación (no estrés, NE). Posteriormente, se determinó el comportamiento de “freezing” durante el Test 1 y el Test 2 (Figura 19A). Los diferentes grupos experimentales fueron los siguientes: SAL/NE (n=8); SAL/E (n=8); MDZ/NE (n= 8); MDZ/E (n=7).

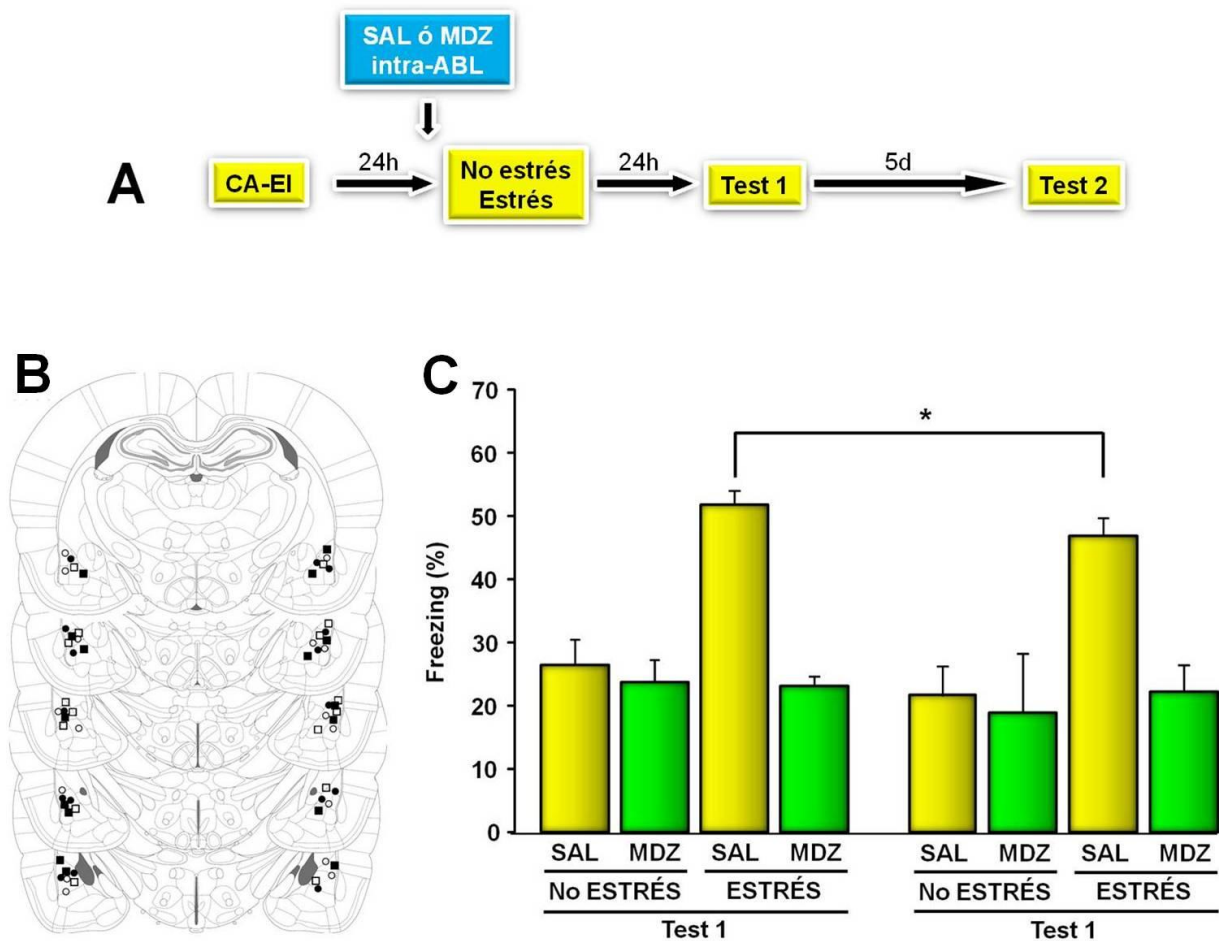
La media  $\pm$  EEM del porcentaje de “freezing” durante el período pre-shock fue  $5,19 \pm 2,49$  % y durante el período post-shock de  $25,55 \pm 5,16$  %.

El análisis de ANOVA de medidas repetidas reveló un efecto significativo de la droga (SAL o MDZ) [F(1,27)=55,657; p<0,05], del estrés [F(1,27)=72,72; p<0,05], de la sesión de test como medidas repetidas [F(1,27)=4,685; p<0.039] y de la interacción droga x estrés [F(1,27)=63,972; p<0,05] sobre el comportamiento de “freezing” durante el Test 1 y Test 2. Sin embargo, no se observó un efecto significativo de las interacciones sesión de test x droga [F(1,27)=1,577; p=0,22], sesión de test x estrés [F(1,27)=1,086; p=0,306] y droga x estrés x sesión de test [F(1,27)=0,378; p=0,543] (Figura 19C).



## RESULTADOS

Por lo tanto, la información estadística relevante indica un elevado comportamiento de “freezing” en el Test 1 y Test 2 en los animales estresados con SAL intra-ABL. Esta respuesta comportamental fue prevenida por la infusión local de MDZ en la ABL antes del estrés. Una respuesta de miedo equivalente fue observada entre los animales no estresados con administración local de MDZ y los animales no estresados infundidos con SAL.



**Figura 19.** La infusión del midazolam intra-ABL antes del estrés afecta la expresión y la retención de la memoria de miedo resultante. **A.** Representación esquemática del diseño experimental. **B.** Láminas esquemáticas de las secciones coronales que muestran la ubicación de las cánulas en la ABL (Adaptado de Paxinos y Watson, 2007); círculos negros: MDZ/E; círculos blancos: MDZ/NE; cuadrados negros: SAL/E; cuadrados blancos: SAL/NE. **C.** Respuesta de “freezing” durante el Test 1 y Test 2 de ratas que recibieron MDZ o SAL en la ABL 10 minutos antes del estrés. Datos expresados como la media  $\pm$  EEM del porcentaje de “freezing” durante cada test (n=8 ratas por grupo). \*  $p < 0,05$  comparado al resto de los grupos experimentales (ANOVA de muestras repetidas, test post-hoc de Bonferroni).

Este resultado es indicativo de que el MDZ administrado localmente en la ABL antes del evento aversivo impide la influencia del estrés sobre la memoria de miedo resultante. Además sugiere la participación de la neurotransmisión GABAérgica de ABL en el efecto del evento estresante sobre la memoria de miedo resultante luego de la evocación.

### Objetivo específico 4

***Analizar la contribución relativa de los procesos de consolidación y reconsolidación en la generación de la memoria de miedo resultante.***

#### Objetivo específico 4.1

***Evaluar la participación del gen de expresión temprana Zif268 hipocampal en la memoria resultante.***

Una serie de reportes han puesto en evidencia mecanismos celulares doblemente disociables para la consolidación y la reconsolidación en el hipocampo para la memoria de miedo contextual (Lee y col., 2004). Así, la expresión del gen temprano *zif268* en esta región particular del cerebro después de la evocación de la memoria contextual ha sido estrechamente asociada con mecanismos de reconsolidación (Lee y col., 2004). Por lo tanto, si el fortalecimiento de la memoria inducido por el estrés involucra un proceso de reconsolidación, el bloqueo de la expresión de *zif268* en el HD debería afectar la influencia del estrés después de interactuar con la evocación de una memoria de miedo.

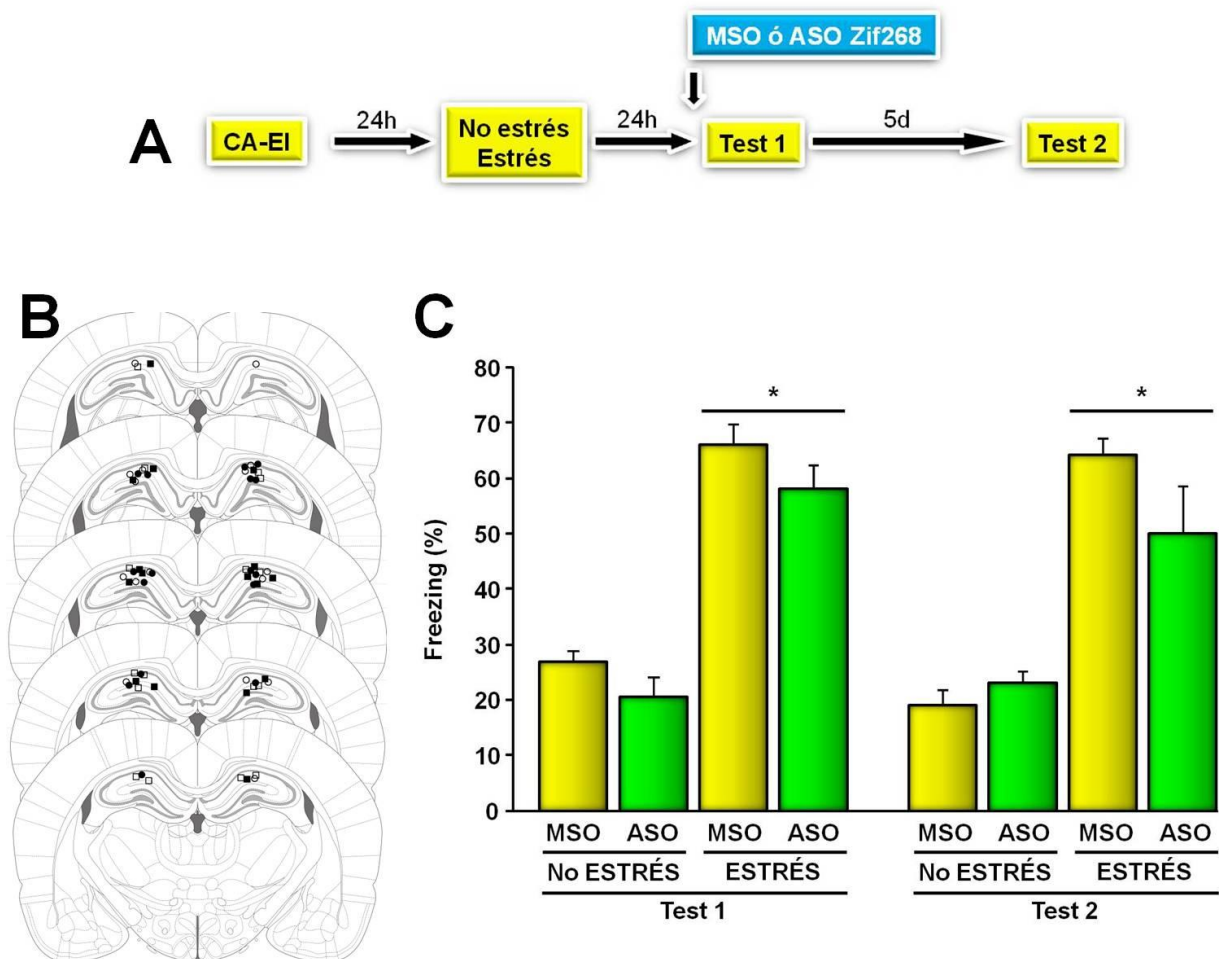
Para explorar esta posibilidad, se implantaron cánulas bilateralmente en el HD de 30 animales y, una semana más tarde, estos fueron sometidos a una sesión de condicionamiento de miedo donde recibieron un solo shock (CA-EI). Veinticuatro horas más tarde, las ratas fueron expuestas a una experiencia estresante (estrés, E) o mantenidas en sus cajas de alojamiento sin manipulación (no estrés, NE). Un día después, ambos grupos recibieron la infusión de ASO o MSO contra Zif268 en el HD 90 minutos antes de la evocación (Test 1). El comportamiento de “freezing” se determinó durante el Test 1 y el Test 2 (Figura 20A). Los diferentes grupos experimentales fueron los siguientes: NE/MSO Zif268 (n=8); E/MSO Zif268 (n=7); NE/ASO Zif268 (n= 8); E/ASO Zif268 (n=7).

La media  $\pm$  EEM del porcentaje de “freezing” durante el período pre-shock fue  $3,8 \pm 1,31$  y durante el período post-shock  $28,4 \pm 1,78$ .

El análisis de ANOVA de medidas repetidas reveló un efecto significativo del estrés [F(1,26)=146,92;  $p < 0,05$ ] y de la sesión de test como medidas repetidas [F(1,26)=6,414;  $p = 0,017$ ] sobre comportamiento de “freezing” durante el Test 1 y el Test 2. Sin embargo, no hubo un efecto significativo de la droga [F(1,26)=1,338;

$p=0,258$ ] y de las interacciones estrés x droga [ $F(1,26)=0,764$ ;  $p=0,39$ ], sesión de test x estrés [ $F(1,26)=0,967$ ;  $p=0,334$ ], sesión de test x droga [ $F(1,26)=1,937$ ;  $p=0,176$ ] y estrés x droga x sesión de test [ $F(1,26)=3,297$ ;  $p=0,081$ ].

Como se muestra en la Figura 20C, los animales estresados infundidos con ASO o MSO contra Zif268 en el HD mostraron una elevada respuesta de “freezing” en ambas sesiones de test en comparación con los animales no estresados ( $p<0,05$ ). Por lo tanto, el bloqueo de Zif268 no afectó el fortalecimiento de la memoria inducido por el estrés.



**Figura 20.** Influencia del ODN antisentido contra Zif268 en el HD sobre la memoria de miedo resultante después del estrés y la evocación. **A.** Representación esquemática del diseño experimental. **B.** Láminas esquemáticas de las secciones coronales que muestran la ubicación de las cánulas en el HD (Adaptado de Paxinos y Watson, 2007); círculos negros: NE/Zif268 MSO; círculos blancos: E/Zif268 ASO; cuadrados negros: NE/Zif268 MSO; cuadrados blancos: E/Zif268 MSO. **C.** Respuesta de “freezing” durante el Test 1 y Test 2 de animales con administración de Zif268 ASO o MSO en el HD antes del Test 1. Datos expresados como la media  $\pm$  EEM del porcentaje de “freezing” durante cada test ( $n=8$  ratas por grupo). \*  $p<0,05$  comparado al resto de los grupos experimentales (ANOVA de muestras repetidas, test post-hoc de Bonferroni).

Es importante notar que el bloqueo del Zif268 no afecta la performance comportamental de los animales no estresados. Esto podría deberse a que el efecto se enmascara por el bajo nivel de “freezing” exhibido por los animales no estresados durante la evocación.

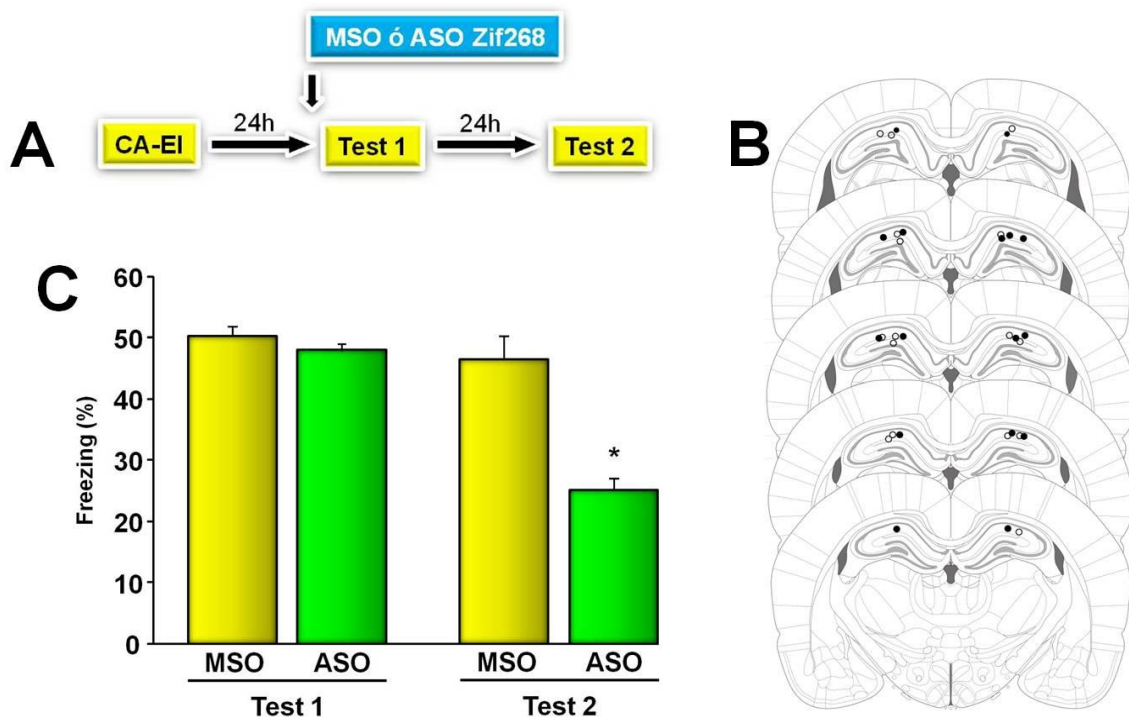
## RESULTADOS

Por lo tanto, se procedió a examinar el efecto del ASO contra Zif268 en ratas no estresadas que fueron sometidas previamente a un entrenamiento de miedo donde recibieron 3 shocks en lugar de uno (Figura 21A). Este entrenamiento más robusto resulta en una memoria similar, determinada por el nivel de “freezing”, a la obtenida cuando se condiciona con 1 shock y luego se estresan los animales. Veinticuatro horas después, los animales fueron re-expuestos al contexto asociado (Test 1) con una infusión previa (90 min) en el HD de ASO o MSO contra Zif268. Un día después se realizó el Test 2.

La media  $\pm$  EEM del porcentaje de “freezing” durante el período pre-shock fue  $23,15 \pm 8,68$  y durante el período post-shock  $88 \pm 9,87$ .

El ANOVA de medidas repetidas reveló un efecto significativo de la droga (MSO vs ASO) [ $F(1,14)=23,562$ ;  $p=0,00026$ ], de la sesión de test ( $F(1,14)=34,645$ ;  $p<0,05$ ) y de la interacción droga x sesión de test ( $F(1,14)=17,824$ ;  $p=0,00085$ ) sobre comportamiento de “freezing” durante el Test 1 y el Test 2.

Todas las ratas infundidas con ASO o MSO exhibieron considerables niveles de “freezing” durante el Test 1. Esta elevada respuesta de miedo fue atenuada durante el Test 2 en las ratas infundidos con ASO contra Zif268 intra-HD ( $p<0,05$ ) (Figura 21C).



**Figura 21.** A. Representación esquemática del diseño experimental. B. Láminas esquemáticas de las secciones coronales que muestran la ubicación de las cánulas en el HD (Adaptado de Paxinos y Watson, 2007); círculos negros: Zif268 MSO; círculos blancos: Zif268 ASO. C. Respuesta de “freezing” durante ambos tests de ratas no estresadas con administración de Zif268 ASO o MSO en el HD. Los animales fueron previamente sometidos a un condicionamiento de miedo clásico, 3 shocks en lugar de uno solo (n=8 ratas por grupo). \*  $p<0,05$  comparado al resto de los grupos experimentales (ANOVA de muestras repetidas, test post-hoc de Bonferroni).

Este resultado es consistente con hallazgos previos, ya que el bloqueo del Zif268 hipocampal alteró la retención de la memoria probablemente por afectar el proceso de reconsolidación en ratas no estresadas, como ha sido sugerido en reportes anteriores (Lee y col., 2004).

### **Objetivo específico 4.2**

***Evaluar el efecto sobre la memoria resultante de la inhibición de la degradación proteica mediante la infusión intra-hipocampo dorsal de clasto-lactacistina- $\beta$ -lactona ( $\beta$ -lac).***

Resultados previos demostraron que el fortalecimiento de una memoria de miedo contextual por un aprendizaje adicional requiere de un proceso de desestabilización de la traza de memoria inducido por la evocación (Lee 2008). Dicho proceso es dependiente de la degradación de proteínas sinápticas en el hipocampo (Lee y col., 2008). Por lo tanto, si esta desestabilización es necesaria para el fortalecimiento de la memoria inducido por el estrés después de la evocación, el bloqueo de la degradación proteica por la infusión del  $\beta$ -lac en el HD debería impedir dicho fortalecimiento en animales estresados.

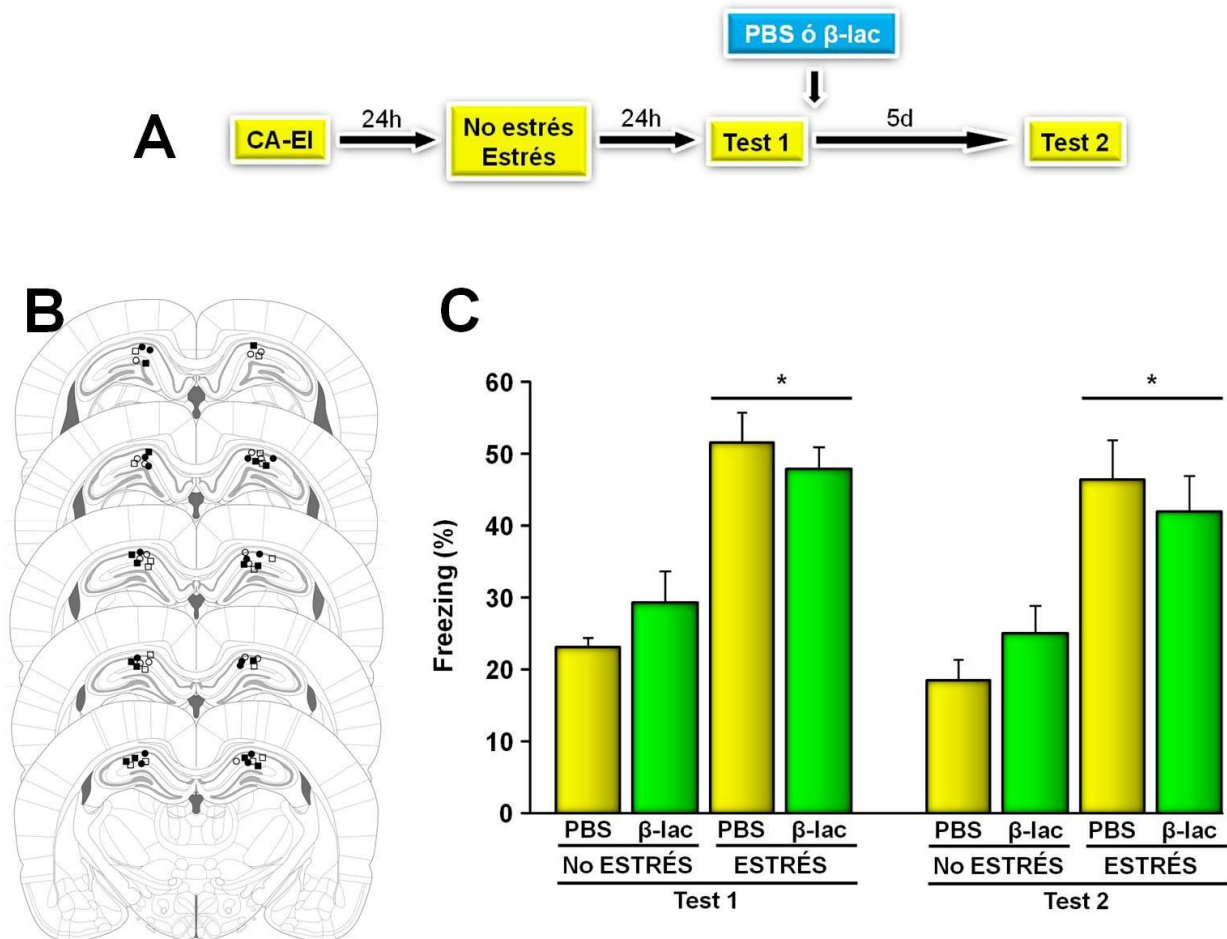
Para investigar esta posibilidad, se implantaron cánulas bilateralmente en el HD de 28 animales y, una semana más tarde, estos fueron sometidos a una sesión de condicionamiento de miedo donde recibieron un solo shock (CA-EI). Veinticuatro horas después, las ratas fueron expuestas a una experiencia estresante (estrés, E) o mantenidas en sus cajas de alojamiento sin manipulación (no estrés, NE). Veinticuatro horas después, se realizó el Test 1 e inmediatamente después se inyectó vehículo (PBS) o  $\beta$ -lac intra-HD. Cinco días más tarde se realizó el Test 2 (Figura 22A). Los diferentes grupos experimentales fueron los siguientes: NE/PBS (n=7); E/PBS (n=7); NE/ $\beta$ -lac (n= 7); E/ $\beta$ -lac (n=7).

La media  $\pm$  EEM del porcentaje de “freezing” durante el periodo pre-shock fue  $2,43 \pm 2,14$  y durante el periodo post-shock  $25,25 \pm 6,4$ .

El ANOVA de medidas repetidas reveló un efecto significativo del estrés ( $F(1,24)=78,926$ ;  $p<0,05$ ) y de la sesión de test como medidas repetidas ( $F(1,24)=4,729$ ;  $p=0,04$ ) sobre comportamiento de “freezing” durante el Test 1 y el Test 2. Sin embargo, no hubo un efecto significativo de la droga ( $F(1,24)=0,003$ ;  $p=0,959$ ), y

de las interacciones droga x estrés ( $F(1,24)=1,564$ ;  $p=0,223$ ), sesión de test x estrés ( $F(1,24)=0,134$ ;  $p=0,717$ ), sesión de test x droga ( $F(1,24)=0,069$ ;  $p=0,794$ ) y droga x estrés x sesión de test ( $F(1,24)=0,041$ ;  $p=0,841$ ).

Este análisis muestra que las ratas estresadas con infusiones de vehículo o  $\beta$ -lac en el HD exhibieron un mayor nivel de “freezing” durante el Test 1 y el Test 2 en comparación con las ratas no estresadas infundidas con vehículo o  $\beta$ -lac (Figura 22C).



**Figura 22.** Efecto de la infusión de  $\beta$ -lac en el HD sobre la memoria de miedo resultante después del estrés y la evocación. **A.** Representación esquemática del diseño experimental. **B.** Láminas esquemáticas de las secciones coronales que muestran la ubicación de las cánulas en el HD (Adaptado de Paxinos y Watson, 2007); círculos negros: NE/ $\beta$ -lac; círculos blancos: E/ $\beta$ -lac; cuadrados negros: NE/PBS; cuadrados blancos: E/PBS. **C.** Respuesta de “freezing” durante ambos Tests de animales con administración de  $\beta$ -lac o PBS en el HD inmediatamente después del Test 1. Datos expresados como la media  $\pm$  EEM del porcentaje de “freezing” durante cada test ( $n=8$  ratas por grupo). \*  $p<0,05$  comparado al resto de los grupos experimentales (ANOVA de muestras repetidas, test post-hoc de Bonferroni).

Estos hallazgos señalan que la inhibición del proceso de desestabilización inducido por la evocación no previene la influencia del estrés sobre la memoria de miedo. Por lo tanto, no es necesaria la desestabilización para que el estrés provoque su efecto facilitador sobre la memoria de miedo al momento de la evocación.

### Objetivo específico 4.3

#### ***Evaluar la participación del BDNF hipocampal en la memoria resultante.***

Dentro de lo reportado por Lee y colaboradores (2004) en relación a los mecanismos doblemente dissociables para la consolidación y la reconsolidación, se ha demostrado que la expresión del BDNF en el HD está altamente correlacionada con la consolidación pero no con la reconsolidación de la memoria (Lee y col., 2004).

Con el fin de explorar la potencial participación del BDNF en la facilitación de la memoria de miedo inducida por el estrés después de la evocación, 32 ratas fueron canuladas en el HD y, una semana después, fueron sometidas a una sesión de condicionamiento de miedo donde recibieron un solo shock (CA-EI). Veinticuatro horas más tarde, las ratas fueron expuestas a una experiencia estresante (estrés, E) o mantenidas en sus cajas de alojamiento sin manipulación (no estrés, NE). Un día después, ambos grupos recibieron la infusión de ASO o MSO contra BDNF en el HD 90 minutos antes de la evocación (Test 1). El comportamiento de “freezing” se determinó durante el Test 1 y el Test 2 (Figura 23A). Los diferentes grupos experimentales fueron los siguientes: NE/MSO BDNF (n=8); E/MSO BDNF (n=8); NE/ASO BDNF (n= 8); E/ASO BDNF (n=8).

La media  $\pm$  EEM del porcentaje de “freezing” durante el período pre-shock fue  $3,06 \pm 0,98$  y durante el período post-shock  $25,28 \pm 2,13$ .

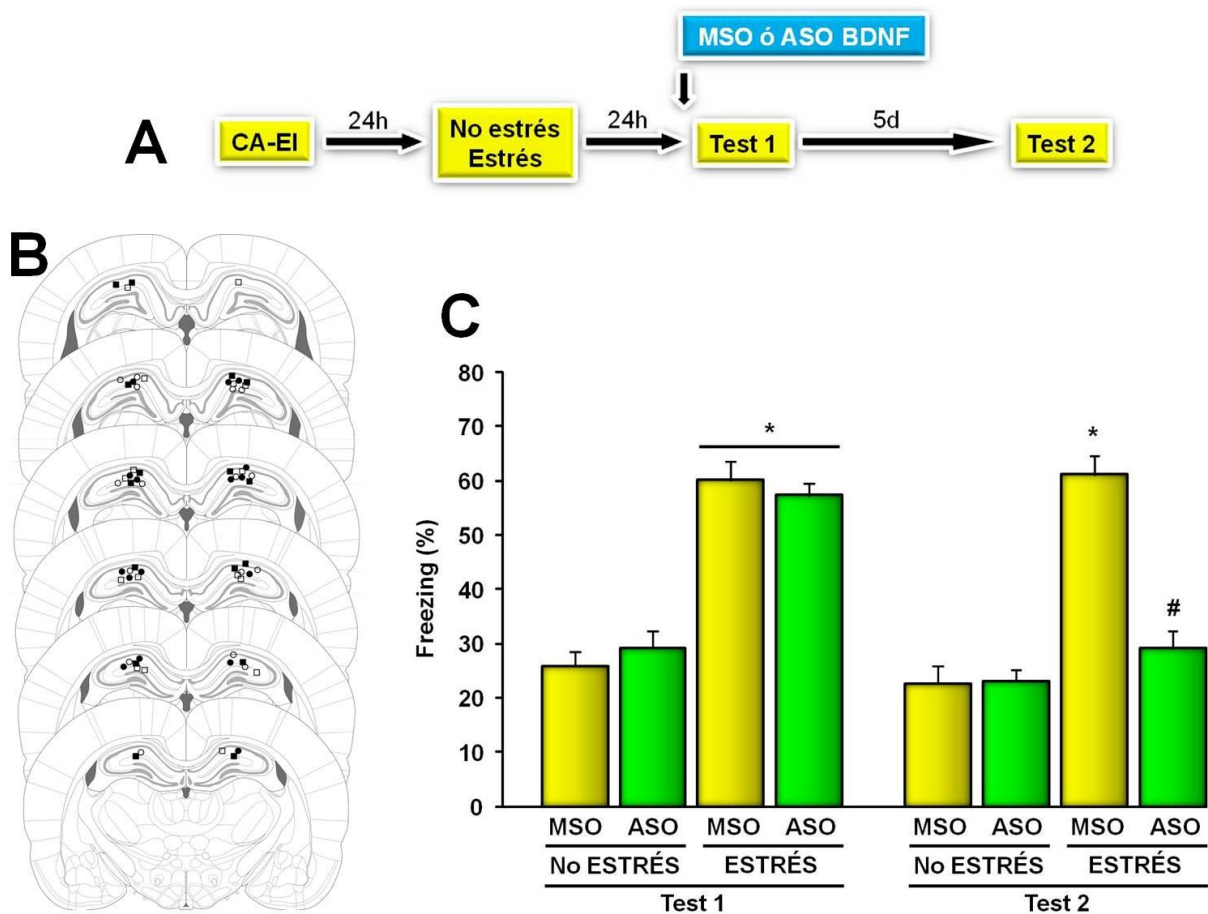
El análisis de ANOVA de medidas repetidas indicó un efecto significativo del estrés ( $F(1,28)=100,83$ ;  $p<0,05$ ), de la droga ( $F(1,28)=8,577$ ;  $p=0,007$ ) y de las interacciones estrés x droga ( $F(1,28)=13,306$ ;  $p=0,001$ ), sesión de test como medidas repetidas ( $F(1,28)=41,445$ ;  $p<0,05$ ), sesión de test x estrés ( $F(1,28)=9,817$ ;  $p=0,004$ ), sesión de test x droga ( $F(1,28)=31,697$ ;  $p<0,05$ ) y estrés x droga x sesión de test ( $F(1,28)=21,859$ ;  $p<0,05$ ) sobre comportamiento de “freezing” durante el Test 1 y el Test 2.

El test de Bonferroni indicó que los animales infundidos con MSO o ASO contra BDNF en el HD exhibieron un elevado nivel de “freezing” en el Test 1 en comparación con los animales no estresados administrados con ASO o MSO contra BDNF ( $p<0,05$ ). Más aun, los animales estresados infundidos con MSO contra BDNF en el HD exhibieron un elevado nivel de “freezing” en el Test 2 en comparación con los que

recibieron ASO contra BDNF y con los animales no estresados administrados con ASO o MSO contra BDNF ( $p < 0,05$ ) (Figura 23C).

Así, la infusión de ASO contra BDNF revierte el efecto facilitador del estrés sobre la memoria de miedo resultante. Por lo tanto, estos resultados sugieren un rol del BDNF hipocampal en la formación de la memoria de miedo resultante después de la interacción con la evocación de la memoria.

Dado que la disminución del BDNF en el HD impidió la potenciación de la respuesta de miedo en los animales estresados, cabe preguntarse si la evocación después del estrés promueve cambios selectivos en los niveles de BDNF en el HD. Para lograr este objetivo, se evaluó el curso temporal de los niveles de BDNF en el HD después de la evocación.



**Figura 23.** La infusión del antisentido contra BDNF en el HD afecta el efecto promotor del estrés sobre la memoria de miedo después de la evocación. **A.** Representación esquemática del diseño experimental. **B.** Láminas esquemáticas de las secciones coronales que muestran la ubicación de las cánulas en el HD (Adaptado de Paxinos y Watson, 2007); círculos negros: NE/BDNF ASO; círculos blancos: E/BDNF ASO; cuadrados negros: NE/BDNF MSO; cuadrados blancos: E/BDNF ASO. **C.** Respuesta de “freezing” durante ambos Tests de animales con administración de BDNF ASO o MSO en el HD antes del Test 1. Datos expresados como la media  $\pm$  EEM del porcentaje de “freezing” durante cada test ( $n=8$  ratas por grupo). \*  $p < 0,05$  comparado al resto de los grupos experimentales (ANOVA de muestras repetidas, test post-hoc de Bonferroni).



Las ratas fueron sometidas a una sesión de condicionamiento de miedo donde recibieron un solo shock (CA-EI). Veinticuatro horas más tarde, las ratas fueron expuestas a una experiencia estresante (estrés, E) o mantenidas en sus cajas de alojamiento sin manipulación (no estrés, NE). Un día después, todos los animales fueron re-expuestos al contexto asociado (CA) y sacrificados a los 0, 30, 60 y 120 minutos (Figura 24A).

La media  $\pm$  EEM del porcentaje de “freezing” durante el período pre-shock fue  $5,12 \pm 0,82$  y durante el período post-shock  $27,85 \pm 2,41$ .

El análisis de ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del estrés y del tiempo [ $F(7,32)=12,656$ ;  $p<0,05$ ] sobre los niveles de BDNF en los diferentes puntos temporales. El test de Bonferroni reveló un elevado nivel de BDNF en el HD de los animales estresados solamente a los 60 minutos después de la evocación ( $p<0,05$ ) (Figura 24B).

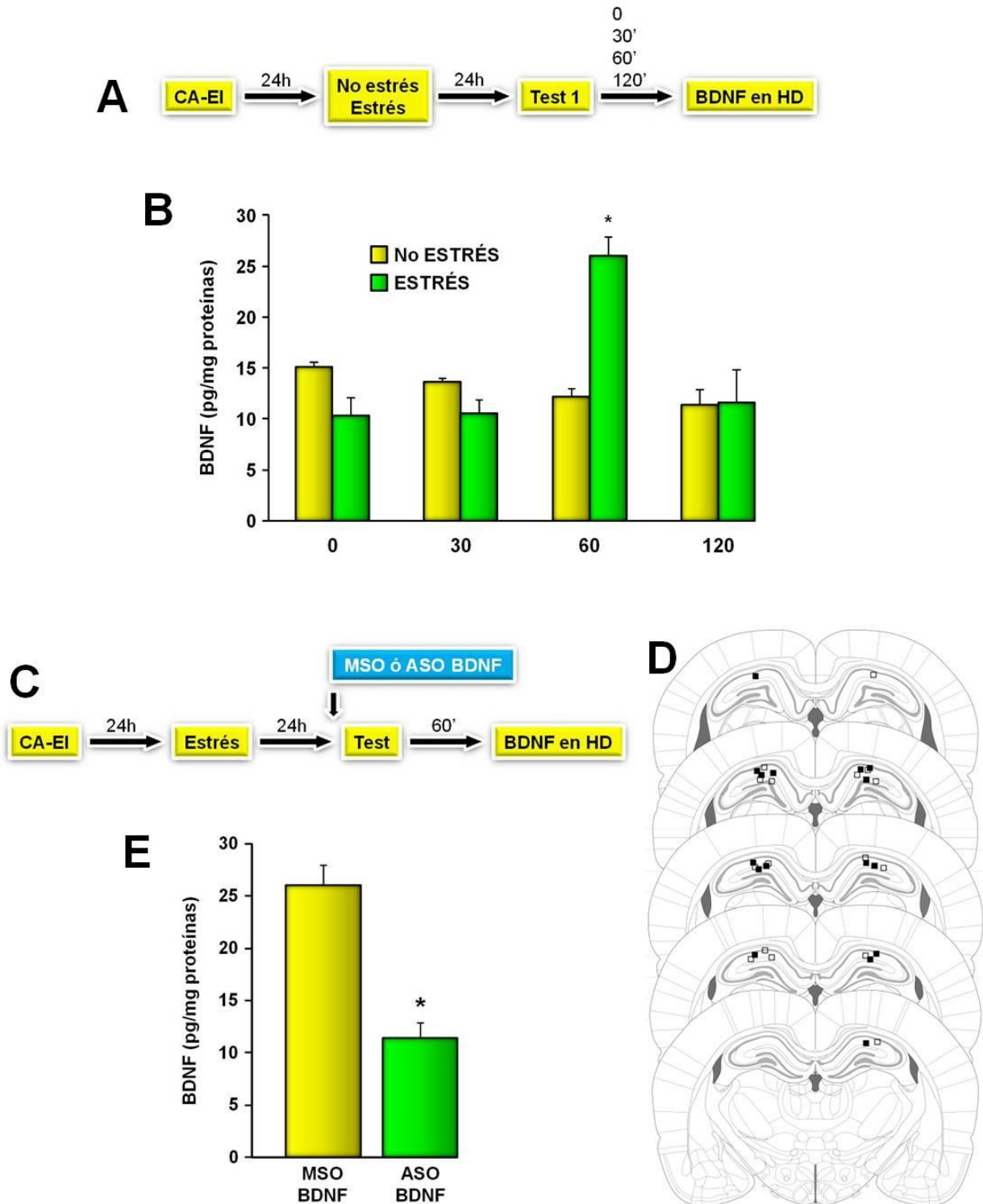
Este resultado es consistente con el argumento de que la influencia del estrés sobre la memoria de miedo contextual está relacionada a un aumento de la expresión de BDNF hipocampal.

Para confirmar que los efectos comportamentales inducidos por el ASO contra BDNF se correlacionan con los niveles de BDNF, los animales fueron entrenados y 24 horas más tarde estresados. Un día después recibieron una infusión local en el HD de ASO o MSO contra BDNF 90 minutos antes del Test 1. Todos los animales fueron sacrificados 60 minutos después de la evocación y se midieron los niveles de BDNF (Figura 24C).

La media  $\pm$  EEM del porcentaje de “freezing” durante el período pre-shock fue  $5,35 \pm 0,96$  y durante el período post-shock  $25,84 \pm 1,82$ .

La infusión de ASO contra BDNF en el HD atenuó significativamente el incremento de los niveles de BDNF hipocampal 60 minutos después de la evocación ( $p<0,05$ , test t de Student) (Figura 24E).

Por lo tanto, estos resultados apoyan el rol del BDNF hipocampal en el fortalecimiento de la memoria inducido por el estrés.



**Figura 24.** Niveles de BDNF en el HD después del estrés y la evocación. **A.** Representación esquemática del diseño experimental. **B.** Niveles de BDNF (media  $\pm$  EEM) en los diferentes puntos temporales después de la evocación de la memoria en animales estresados y no estresados. \*  $p < 0,05$  comparado al resto de los grupos experimentales (ANOVA de una vía, test post-hoc de Bonferroni). **C.** Representación esquemática del diseño experimental. **D.** Láminas esquemáticas de las secciones coronales que muestran la ubicación de las cánulas en el HD (Adaptado de Paxinos y Watson, 2007); cuadrados negros: BDNF MSO; cuadrados blancos: BDNF ASO. **E.** Niveles de BDNF (media  $\pm$  EEM) a los 60 minutos después de la evocación en animales estresados previamente administrados en el HD con BDNF ASO o MSO ( $n=5$  ratas por grupo; \* $p < 0,05$  test t de Student).

### Objetivo específico 5.1

***Evaluar la plasticidad estructural en el hipocampo dorsal potencialmente asociada a la memoria resultante de la interacción entre un evento estresante y una traza de memoria de miedo ya establecida.***

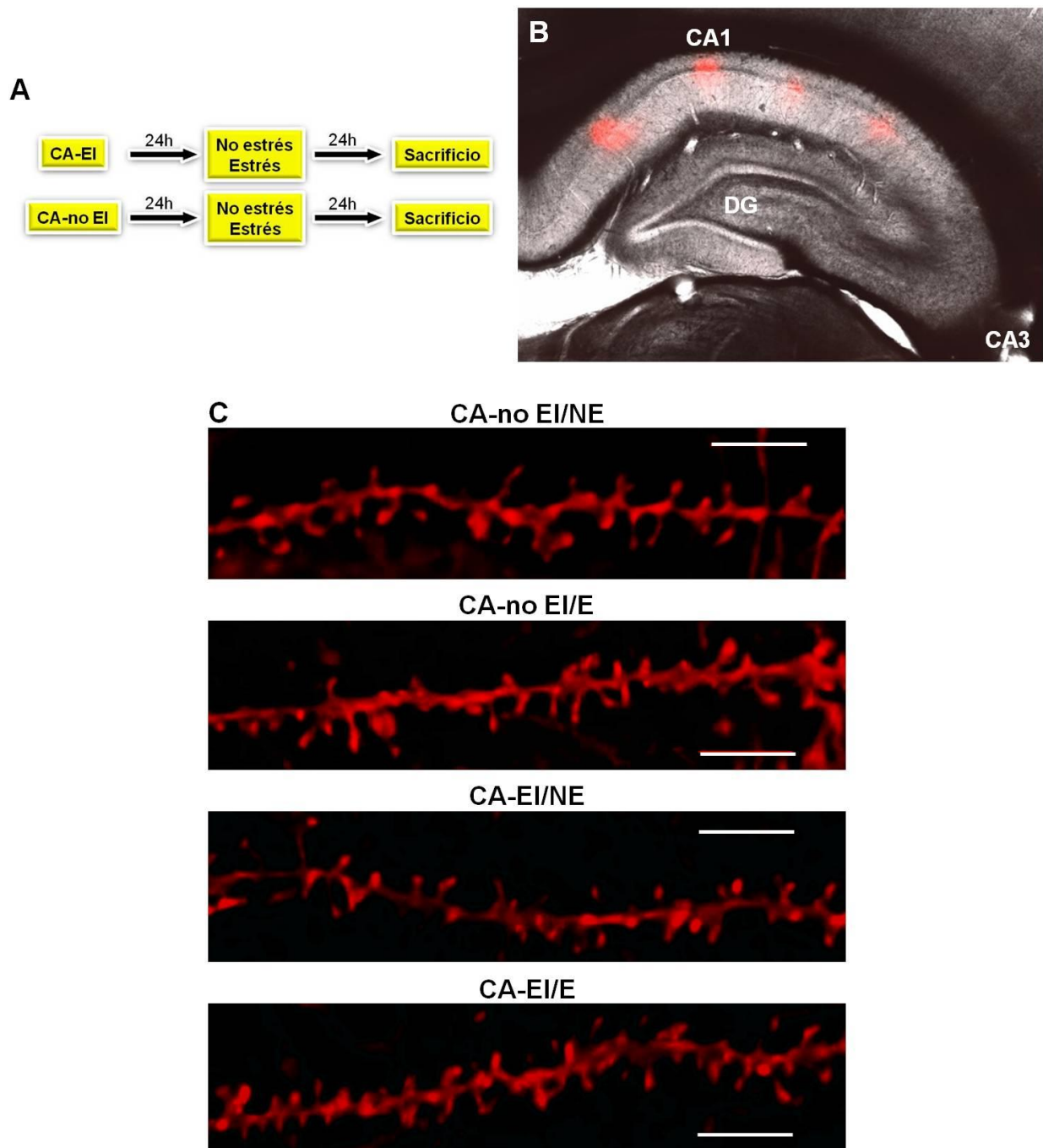
El presente experimento se realizó con el fin de evaluar si la combinación de una traza de memoria de miedo ya establecida con el estrés puede generar cambios estructurales como soporte de la memoria de miedo resultante. Para tal fin, los animales fueron asignados aleatoriamente a dos grupos: uno fue sometido a un protocolo entrenamiento con un solo “footshock” (CA-EI) y el otro no recibió ningún “footshock” durante la duración de la prueba (CA-no EI). Veinticuatro horas después, las ratas de ambos grupos fueron seleccionadas al azar nuevamente y expuestas a una experiencia estresante (estrés, E) o mantenidas en sus cajas de alojamiento sin manipulación (no estrés, NE). Los diferentes grupos experimentales fueron los siguientes: CA-no EI/NE (n=3); CA-no EI/E (n=3); CA-EI/NE (n=3); CA-EI/E (n=3). Los animales se sacrificaron un día después del estrés sin la sesión de evocación para el análisis de espinas dendríticas (Figura 25A).

La medición de espinas se realizó en un total de 125 segmentos dendríticos (CA-no EI/NE: 28 segmentos; CA-no EI/E: 32 segmentos; CA-EI/NE: 33 segmentos; CA-EI/E: 32 segmentos). La Figura 25C muestra ejemplos representativos de los segmentos dendríticos del estrato radiatum del área CA1 hipocampal, particularmente en las dendritas apicales secundarias y terciarias.

El análisis de ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo del entrenamiento [F(1,121)=17,308; p=0,00001], del estrés [F(1,121)=16,407; p=0,00001] y de la interacción entrenamiento x estrés [F(1,121)=7,02; p=0,009] sobre la densidad de espinas dendríticas total. El test de Bonferroni demostró que los animales que experimentaron el evento estresante y fueron previamente entrenados presentaron un mayor número de espinas dendríticas totales en comparación con el resto de los grupos (p<0,05) (Figura 26A).

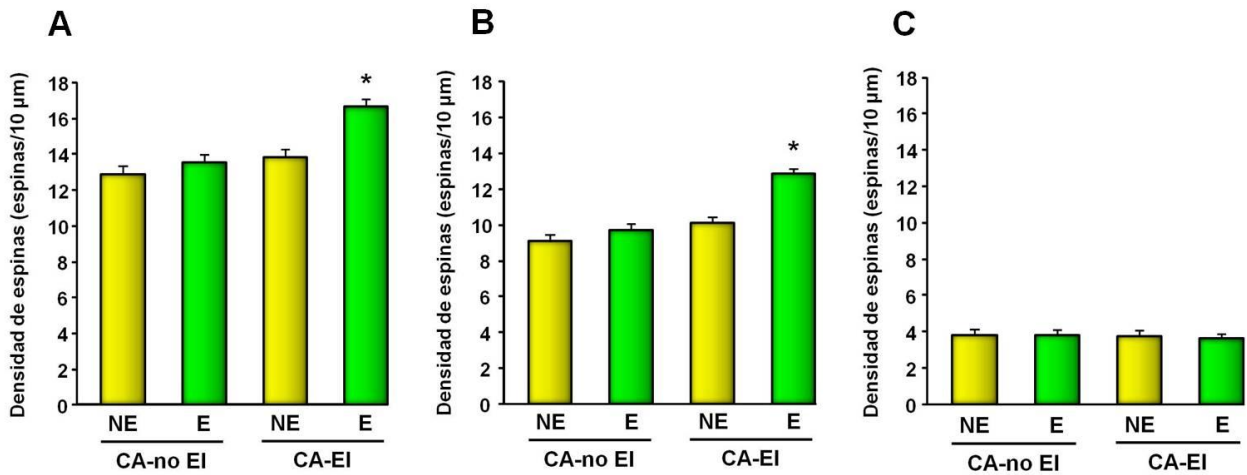
El ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo del entrenamiento [F(1,121)=22.422, p=0.00001], del estrés [F(1,121)=21.903, p=0.00001] y de la interacción entrenamiento x estrés [F(1,121)=9.7517, p=0.0022] sobre el número de espinas “maduras”. El test de Bonferroni demostró que el grupo CA-EI/E presentó un

mayor número de espinas “maduras” en comparación con resto de los grupos ( $p < 0,05$ ) (Figura 26B).



**Figura 25.** A. Representación esquemática del diseño experimental. B. Imagen de fluorescencia de una región de CA1 representativa adquirida con el fin de demostrar la localización de la tinción con Dil. C. Ejemplos representativos de segmentos dendríticos apicales de neuronas piramidales de CA1 las cuales fueron seleccionadas para el análisis cuantitativo de las espinas dendríticas de animales CA-no EI/NE ( $n=3$ ); CA-no EI/E ( $n=3$ ); CA-EI/NE ( $n=3$ ); CA-EI/E ( $n=3$ ) (Escala 3  $\mu$ m).

Un ANOVA de dos vías reveló un efecto no significativo del entrenamiento [ $F(1,121)=0,111$ ;  $p=0,739$ ], del estrés [ $F(1,121)=0,179$ ;  $p=0,673$ ] y de la interacción entrenamiento x estrés [ $F(1,121)=0,131$ ;  $p=0,718$ ] sobre el número de espinas dendríticas “finas” o inmaduras (Figura 26C).



**Figura 26.** La combinación entre el procedimiento de condicionamiento y el estrés generó cambios estructurales en el HD. **A.** Densidad de espinas dendríticas totales (espinas por 10 µm de segmento dendrítico). **B.** Densidad de espinas dendríticas maduras (espinas por 10 µm de segmento dendrítico). **C.** Densidad de espinas dendríticas largas (espinas por 10 µm de segmento dendrítico). Todos los datos están expresados como la media ± EEM. \*  $p < 0,05$  comparado al resto de los grupos experimentales (ANOVA de muestras repetidas, test post-hoc de Bonferroni).

Estos resultados sugieren que como resultado de la combinación del estrés con una memoria de miedo contextual ya establecida se generan un mayor número de espinas dendríticas “maduras” hipocampales.

## Objetivo específico 5.2

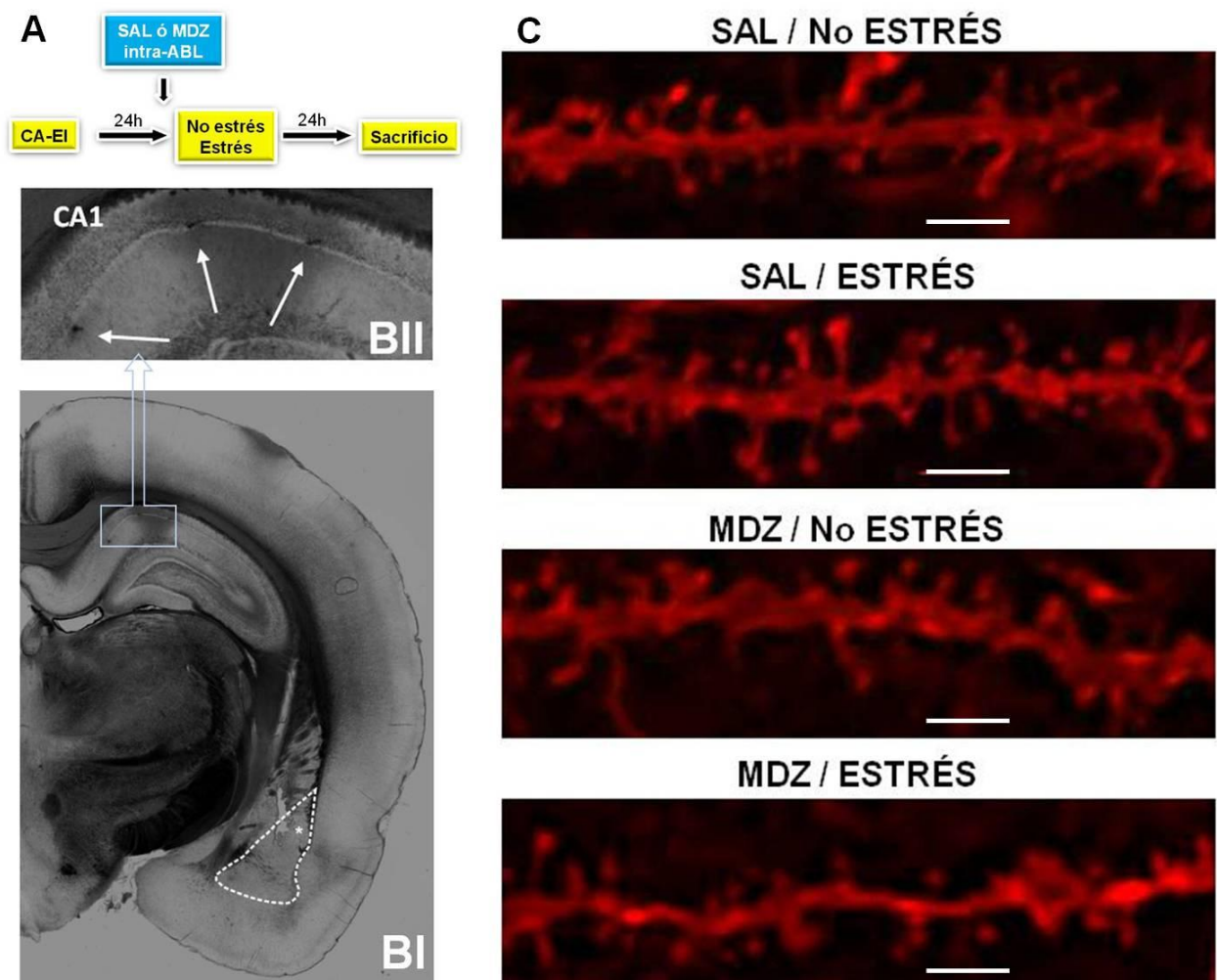
***Evaluar la influencia de la modulación de la neurotransmisión GABAérgica en la ABL sobre la plasticidad estructural en el hipocampo dorsal potencialmente asociada con la memoria de miedo resultante.***

Como se expuso anteriormente, la ABL es un componente clave en el circuito neural que procesa estímulos amenazantes (LeDoux, 2000) y la activación de los sitios de GABA-A específicamente en la ABL antes del estrés atenúa la potenciación de la memoria de miedo (Rodríguez Manzanares y col., 2005). Por lo tanto, en el presente experimento se analizó la influencia de la infusión del MDZ intra-ABL antes del estrés sobre la remodelación dendrítica hipocampal generada por la combinación de una memoria de miedo con el estrés.

Se implantaron cánulas bilateralmente en la ABL de 13 animales y, una semana más tarde, estos fueron sometidos a una sesión de condicionamiento de miedo donde recibieron un solo shock (CA-EI). Un día después, las ratas fueron administradas con salina (SAL) o midazolam (MDZ) intra-ABL y 10 minutos más tarde expuestas a una experiencia estresante (estrés, E) o mantenidas en sus cajas de alojamiento sin

manipulación (no estrés, NE). Las ratas se distribuyeron en cuatro grupos: SAL/NE (n=3); SAL/E (n=3); MDZ/NE (n=3); MDZ/E (n=4). Para el análisis de espinas dendríticas los animales se sacrificaron un día después del estrés sin evocación (Figura 27A).

La cuenta de espinas se realizó en un total de 124 segmentos dendríticos (SAL/NE: 31 segmentos; SAL/E: 28 segmentos; MDZ/NE: 29 segmentos; MDZ/E: 36 segmentos). La Figura 27C muestra ejemplos representativos de los segmentos dendríticos del estrato radiatum del área CA1 hipocámpal, particularmente en las dendritas apicales secundarias y terciarias.



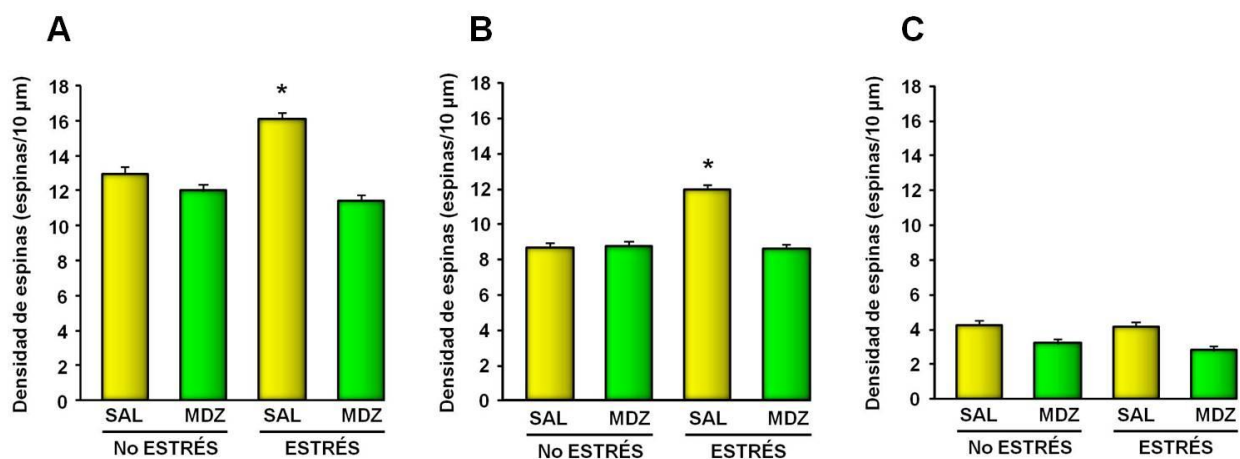
**Figura 27.** A. Representación esquemática del diseño experimental. B. I) Imagen de una sección coronal representativa que muestra la ubicación de la cánula en la ABL (Antero-Posterior: -3.12mm de Bregma; Paxinos y Watson, 2007). (\*) Indica el sitio de inyección de SAL o MDZ en la ABL; II) Imagen de fluorescencia de una región de CA1 representativa, donde la flecha indica el sitio de inyección del Dil. C. Ejemplos representativos de segmentos dendríticos apicales de neuronas piramidales de CA1 las cuales fueron seleccionadas para el análisis cuantitativo de las espinas dendríticas de animales SAL/E (n=3); SAL/NE (n=3); MDZ/E (n=4); MDZ/NE (n=3) (Escala 2  $\mu$ m).

El análisis de ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo del tratamiento ( $F(1,120)=57,382$ ;  $p=0,00001$ ), del estrés ( $F(1,120)=12,322$ ;  $p=0,0006$ ) y de la interacción tratamiento x estrés ( $F(1,120)=25,047$ ;  $p=0,00001$ ) sobre el número total de

espinas dendríticas de las neuronas piramidales de CA1. El test de Bonferroni indicó que el grupo SAL/E presentó un mayor número de espinas en comparación al resto de los grupos ( $p < 0,05$ ). Así, el MDZ infundido localmente en ABL previo al estrés atenuó el aumento del número total de espinas en el HD ( $p > 0,05$ ) (Figura 28A).

En relación a la morfología de las espinas, el ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo de la droga ( $F(1,120)=25,101$ ;  $p < 0,01$ ), del estrés ( $F(1,120)=23,130$ ;  $p < 0,01$ ) y de la interacción droga x estrés ( $F(1,120)=27,607$ ;  $p < 0,01$ ) sobre el número de espinas “maduras”. El test de Bonferroni mostró un mayor número de espinas “maduras” en el grupo SAL/E en comparación con el resto de los grupos experimentales ( $p < 0,05$ ). La administración de MDZ intra-ABL previo al estrés atenuó el aumento del número de espinas “maduras” ya que los valores del grupo MDZ/E fueron similares a aquellos exhibidos por los grupos SAL/NE y MDZ/NE ( $p < 0,05$ ) (Figura 28B).

El ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo de la droga ( $F(1,120)=22,270$ ;  $p = 0,0001$ ) y un efecto no significativo del estrés ( $F(1,120)=1,083$ ;  $p = 0,3001$ ) y de la interacción droga x estrés ( $F(1,120)=0,3545$ ;  $p = 0,553$ ) sobre el número de espinas “largas” (Figura 28C).



**Figura 28.** La infusión de MDZ intra-ABL antes del estrés atenuó el efecto promotor de la inmovilización sobre la remodelación estructural en el HD. **A.** Densidad de espinas dendríticas totales (espinas por 10  $\mu\text{m}$  de segmento dendrítico). **B.** Densidad de espinas dendríticas maduras (espinas por 10  $\mu\text{m}$  de segmento dendrítico). **C.** Densidad de espinas dendríticas largas (espinas por 10  $\mu\text{m}$  de segmento dendrítico). Todos los datos están expresados como la media  $\pm$  EEM. \*  $p < 0,05$  comparado al resto de los grupos experimentales (ANOVA de muestras repetidas, test post-hoc de Bonferroni).

Estos resultados sugieren que el MDZ intra-ABL previo al estrés previno el incremento de la densidad de espinas “maduras” en HD generado por la combinación del estrés con una traza de memoria de miedo contextual ya establecida.

# DISCUSIÓN



El presente estudio demostró que la interacción de una experiencia estresante con la evocación de una memoria establecida resultó en una memoria de miedo contextual robusta. Este fenómeno fue persistente ya que se evidenció en un test de retención realizado seis días después del estrés. Es importante destacar que el estrés no aumentó la respuesta de “freezing” en las ratas que no recibieron el aprendizaje asociativo (CA-noEI), lo que indica que la influencia del estrés depende de manera crítica de la asociación previa contexto-shock. Además, se puede descartar una generalización inespecífica del miedo ya que no se detectó un efecto cuando los animales estresados fueron expuestos a un entorno diferente (CB) no asociado a la presentación del shock. Esto confirma que la exposición al contexto asociado es un requisito clave para que el estrés ejerza su efecto promotor. Por otra parte, una respuesta sensibilizada a la inmovilización debido a la experiencia previa con un shock es poco probable ya que ningún efecto del estrés fue evidente cuando los animales fueron sometidos previamente a un protocolo de déficit por shock inmediato (ver métodos), un procedimiento que es incapaz de inducir un aprendizaje asociativo de miedo contextual (Landeira-Fernández y col., 2006). También se observó que la disrupción previa de la reconsolidación de la memoria por el MDZ alteró la potenciación inducida por el estrés de la memoria de miedo. Esto demuestra que la existencia de una traza asociativa es un factor crítico para la formación de una memoria de miedo robusta y persistente después de la interacción del estrés con la experiencia de evocación.

Reportes anteriores han demostrado que tanto la exposición al estrés como la administración de hormonas relacionadas al estrés próximas al test de retención, afectaron la evocación de la memoria (déficit de evocación). Tal efecto no se observó cuando el test se realizó a intervalos más prolongados lo que sugiere que dicho efecto es dependiente del tiempo y se correlaciona con niveles elevados de corticosterona plasmática al momento de la evocación (de Quervain y col., 1998; Roozendaal, 2002; de Quervain y col., 2003; Cai y col., 2006; Atsak y col., 2012). En el presente protocolo, el test de retención se realizó un día después de la inmovilización, lo cual sugiere que la secreción de hormonas relacionadas con el estrés no participa en el efecto facilitador resultante de la interacción del estrés con la evocación. Sin embargo, es importante señalar que esta sugerencia no excluye un rol inicial de estas hormonas poco después de la exposición al estrés en nuestro paradigma experimental.

Como se indicó anteriormente, se ha sugerido la existencia de mecanismos disociables entre la consolidación y reconsolidación de una memoria de miedo contextual (Lee y col., 2004; Alberini 2005; Tronson y Taylor 2007). Mientras que la reconsolidación parece requerir la expresión de Zif268 hipocampal, el proceso de consolidación parece ser dependiente del BDNF hipocampal (Lee y col., 2004). Además, Lee (2008), utilizando un procedimiento diferente al usado en el presente estudio, demostró que la presentación de un shock durante la evocación de una memoria de miedo contextual aumentó los niveles de “freezing” en un test de retención posterior. Esta modificación de la fuerza de la memoria como resultado del aprendizaje adicional fue mediada por un mecanismo de reconsolidación dependiente de la expresión Zif268 hipocampal, pero no de BDNF (Lee 2008). Por otra parte, la degradación de proteínas por el sistema ubiquitina/proteosoma (SUP) parece ser crítica para la desestabilización después de la evocación de una memoria de miedo (Lee y col., 2008). Más aun, la infusión hipocampal de un inhibidor del proteosoma inmediatamente después de la evocación previene el disparo de la reconsolidación de la memoria y la actualización de nueva información en una memoria de miedo ya consolidada (Lee 2008). Los hallazgos obtenidos en el presente trabajo demostraron que la infusión local de un ASO contra Zif268 o de  $\beta$ -lac no afectaron la memoria contextual resultante después de la interacción del estrés y de la experiencia de evocación. Por lo tanto, si la degradación de proteínas y la expresión de Zif268 inducidas por la evocación son procesos esenciales para la ocurrencia de reconsolidación (Lee y col., 2004; Lee y col., 2008; Rudy, 2008), la participación de un mecanismo de este tipo en el fortalecimiento de la memoria inducido por el estrés observado en este estudio parece poco probable.

Algunos autores han reportado un aumento de la expresión del ARNm de *zif268* en la amígdala lateral después del condicionamiento de miedo contextual (Malkani y Rosen, 2000) pero no después de un test de retención (Rosen y col., 1998). Por el contrario, otros informaron un incremento selectivo de la expresión del *zif268* en la amígdala lateral después de un test de retención, pero no de la adquisición, de una memoria de miedo contextual (Hall y col., 2000; Hall y col., 2001). La razón de estas controversias no ha sido aun dilucidada, sin embargo, se ha sugerido que el uso de paradigmas de condicionamiento de miedo contextual para estudiar el rol del Zif268 en los procesos de memoria puede ser parcialmente responsable de estas discrepancias (Davis y col., 2003). Durante este condicionamiento, el animal no sólo aprende la

asociación contexto-shock, sino también el contexto novedoso en sí (Fanselow, 1980; Rudy y col., 2004). La amígdala ha demostrado ser un modulador crítico de la formación de memorias contextuales, pero sólo cuando el contexto es novedoso (Huff y col., 2005). En consecuencia, cualquier estudio sobre la regulación génica en la amígdala después del aprendizaje de miedo contextual debe distinguir entre la expresión génica relacionada con el aprendizaje de miedo contextual y la relacionada con el aprendizaje del contexto y/o la novedad por sí sola (Hall y col., 2000; Ploski y col., 2010). Recientemente, Maddox y colaboradores (2011), estudiaron estas cuestiones mediante el estudio de la regulación del *Zif268* en la amígdala lateral luego de un condicionamiento de miedo auditivo en ratas. Se demostró que la expresión del *zif268* en la amígdala lateral se requiere tanto para la consolidación de una nueva asociación como para la reconsolidación post-evocación de una memoria de miedo (Maddox y col., 2011). Por otra parte, datos experimentales convincentes apoyan un rol del *Zif268* hipocampal durante la fase de reconsolidación de una memoria de miedo contextual pero no en la consolidación de una nueva asociación entre el shock y el contexto (Lee y col., 2004; Lee 2008). Por lo tanto, parece adecuado especular que el *Zif268* de la amígdala o del hipocampo podrían tener un rol diferencial en la estabilización de una nueva asociación o en la re-estabilización post-evocación de una traza ya establecida.

De manera similar, se ha informado que la degradación de proteínas dependiente del sistema ubiquitina/proteosoma en la amígdala es crítica para la consolidación y la reconsolidación de memorias de miedo condicionadas a un contexto o a un tono (Jarome y col., 2011). Esto sugiere que la degradación proteica después de la adquisición o evocación es necesaria para el almacenamiento o mantenimiento de una memoria de miedo en la amígdala. Sin embargo, se ha sugerido que la degradación proteica mediada por el SUP puede regular la síntesis proteica en el hipocampo durante la reconsolidación, pero no durante la consolidación, de una memoria de miedo contextual (Lee y col., 2008). Este hallazgo está en conflicto con un trabajo que demostró que la degradación proteica en hipocampo está críticamente implicada en la consolidación de la memoria utilizando un paradigma de evitación inhibitoria (Lopez-Salon y col., 2001), procedimiento en el que un animal tiene que aprender a inhibir una respuesta de origen natural (por ejemplo, pasar de una zona de luz a un área oscura) con el fin de evitar un evento aversivo (tal como un shock). En relación a esta controversia, es importante señalar que los circuitos implicados y los mecanismos

descriptos en el procesamiento de una tarea de evitación inhibitoria son diferentes de los circuitos y los mecanismos implicados en el condicionamiento de miedo clásico (Wilensky y col., 2000).

Una posible explicación de la ausencia de un proceso de actualización mediado por un mecanismo de reconsolidación en el HD de ratas estresadas observado en el presente estudio sugiere que el estado emocional generado por la experiencia estresante podría afectar los mecanismos de desestabilización y reconsolidación tras la evocación de la memoria de miedo. Es importante destacar que, durante la experiencia de evocación, niveles de “freezing” similares fueron exhibidos por ratas estresadas condicionadas débilmente y por ratas no estresadas expuestas a un condicionamiento robusto. Curiosamente, el bloqueo del Zif268 hipocampal antes de la evocación en animales no estresados pero sometidos previamente a un entrenamiento fuerte disminuyó los niveles de “freezing” en un test de retención posterior. Este efecto se atribuyó al bloqueo de la reconsolidación de la memoria lo cual es consistente con trabajos anteriores (Lee y col., 2004). En cambio, en animales estresados condicionados débilmente, la inhibición del Zif268 no afectó la memoria de miedo resultante, sugiriendo que la interacción entre el estrés y la evocación de la memoria no implica un proceso de reconsolidación. Así, este efecto diferencial observado sobre la retención de miedo tras la infusión intra-HD del ASO contra Zif268 no se puede atribuir a diferencias en el grado de miedo. En consecuencia, estos resultados sugieren que es menos probable que la traza de memoria de miedo de las ratas estresadas se desestabilice y se vuelva vulnerable a la interrupción tras la evocación. En apoyo a este argumento, un trabajo anterior demostró que la labilización inducida por la evocación de una memoria de miedo contextual estuvo limitada en animales sometidos a una situación de estrés similar a la utilizada en el presente estudio (Bustos y col., 2010). Por lo tanto, si la propiedad dinámica de una traza de memoria se define a partir de las posibilidades de modificarse tras la labilización inducida por la evocación, tanto las evidencias aportadas en este trabajo como datos de reportes anteriores, ponen de manifiesto que dicha posibilidad está limitada por el estado emocional negativo, como el que ocurre bajo la influencia de estrés, del animal al momento de la evocación. Bajo esta línea argumental, la dinámica de la traza de memoria original se vería afectada en un animal sometido previamente a un evento estresante.

En contraste con la falta de efecto del ASO contra Zif268 intra-HD en ratas estresadas, el bloqueo del BDNF hipocampal previno la influencia del estrés sobre la retención de miedo. Esta evidencia, junto con la elevación del nivel de BDNF hipocampal después de la evocación en animales estresados, proporcionan un fuerte apoyo a la implicancia de un mecanismo dependiente de BDNF hipocampal en la memoria de miedo contextual resultante de la interacción entre el estrés y la evocación. Esta evidencia confirma hallazgos anteriores en cuanto a que el BDNF endógeno ejerce un rol relevante en el aprendizaje motivado por el miedo en ratas (Lee y col., 2004; Rattiner y col., 2004a, 2004b). Es importante destacar que se registraron valores de “freezing” similares durante el primer test de retención en los animales estresados tratados ya sea con el ASO o el MSO contra BDNF, lo que sugiere que la influencia del oligonucleótido antisentido no está relacionada con la disrupción de la performance de “freezing” o con una interferencia del proceso de evocación. El aumento de la expresión del BDNF hipocampal se ha asociado con la consolidación de una memoria de miedo contextual (Lee y col., 2004); los datos presentes podrían sugerir la participación de un proceso de consolidación de nueva información aversiva en la formación de la memoria que resulta de la interacción del estrés con la evocación. Sin embargo, se acepta generalmente que la consolidación es un proceso que ocurre después del aprendizaje y no después de la evocación de la memoria. Por lo tanto, el hecho de que el BDNF hipocampal es altamente expresado en nuestro paradigma no significa necesariamente que la memoria resultante después del estrés implica un proceso de consolidación. Se requiere profundizar en la investigación de este fenómeno para concluir que la interacción del estrés con la experiencia de evocación inicia un proceso de consolidación. Es importante señalar, sin embargo, que una extensa investigación apoya un rol del BDNF hipocampal en la formación de una memoria a largo plazo en varios paradigmas que dependen del hipocampo (Lee y col., 2004; Alonso y col., 2005; Lubin y col., 2008). De acuerdo con la visión de que BDNF juega un rol relevante en la formación de una memoria a largo plazo, un importante cuerpo de evidencia sostiene que esta molécula es crítica para el proceso de plasticidad neuronal subyacente al aprendizaje y la memoria (Tyler y col., 2002; Yamada y Nabeshima, 2003; Rattiner y col., 2005).

La pregunta que surge es: *¿cuál es el mecanismo potencial por cual el estrés está actuando para aumentar la expresión y la retención de miedo después de la evocación?* Está bien establecido que la ABL tiene un rol importante en el

procesamiento de información emocional, en la generación de estados afectivos negativos (LeDoux, 2000) y en la regulación de los efectos del estrés sobre la memoria (Roosendaal y col., 2009). Además, se informó que la exposición a un evento estresante, similar al utilizado en el presente estudio, disminuyó el control GABAérgico inhibitorio en la ABL resultando en una hiperexcitabilidad de las neuronas de proyección glutamatérgicas un día después del estrés (Rodríguez Manzanares y col., 2005; Isoardi y col., 2007). De hecho, esta hiperactivación inducida por el estrés de una red local en la ABL redujo el umbral de inducción de la potenciación a largo plazo (Rodríguez Manzanares y col., 2005; Sarabdjitsingh y col., 2012), un proceso de plasticidad sináptica que se caracteriza por un aumento de la eficacia de la transmisión a ese nivel y es considerado un mecanismo celular asociado a la formación de una memoria a largo plazo (Blair y col., 2001; Pape y Pare, 2010). Además, los eventos con una importante carga emocional resultan en un aumento persistente de la frecuencia de disparo espontáneo de neuronas de la ABL (Pelletier y col., 2005). Basado en estos hallazgos, se propuso que esta reducción del control GABAérgico inhibitorio en la ABL estaría implicada en la instauración de la secuela emocional negativa generada por un estresor incontrolable, lo cual conduciría a reacciones exageradas de miedo y ansiedad a estímulos aversivos subsecuentes, los cuales normalmente inducirían una mínima perturbación emocional (Martijena y col., 2002; Calfa y col., 2006; Bignante y col., 2008). En concordancia con lo anterior, se ha observado que la disminución de la neurotransmisión GABAérgica en la ABL inducida tanto por el estrés como por manipulación farmacológica potenció la formación de una memoria de miedo (Rodríguez Manzanares y col., 2005; Kim y col., 2012). Una predicción lógica de todos estos datos sugiere que el aumento de la transmisión GABAérgica por medio de la activación de los sitios GABA-A en la ABL antes del desafío ambiental impediría la formación de una memoria de miedo robusta y persistente como consecuencia de la interacción del estrés con la evocación. De acuerdo con esta predicción, nuestros resultados demostraron que la facilitación de la transmisión inhibitoria por el tratamiento con MDZ intra-ABL antes del estrés atenuó el aumento de la expresión y la retención de miedo. Como se sugirió anteriormente (Dudai, 2002), la evocación de una memoria de miedo puede ser una experiencia aversiva por sí misma. Por lo tanto, se puede especular que el estrés previo puede aumentar, al momento de la evocación, el valor aversivo de los estímulos que definen el contexto, ya que esta experiencia ocurre bajo una ABL hiperactivada por el estrés (Martijena y col., 2002; Rodríguez Manzanares y col., 2005; Isoardi y col., 2007). Esta potenciación del miedo se expresa en los mayores

índices de “freezing” durante ambas sesiones de test. Por lo tanto, bajo el estado emocional provocado por el estrés, la experiencia de evocación de una memoria débil previamente establecida se convierte en un potenciador mnemónico. En línea con este argumento, se informó recientemente que un estado emocional negativo provocado por la estimulación química de la sustancia gris periacueductal dorsolateral antes de la evocación potencia una memoria de miedo ya consolidada (Mochny y col., 2012).

La robusta representación de miedo contextual resultante de la combinación del condicionamiento con el estrés se asoció con un aumento consistente del número total de espinas dendríticas en el HD, particularmente de las espinas “maduras” funcionales. Por el contrario, ni el procedimiento de condicionamiento de miedo ni el de inmovilización *per sé* fueron capaces de provocar tal remodelación estructural en el HD. Consistente con estos hallazgos, informes anteriores mostraron que una memoria robusta se asocia a un aumento del número de espinas dendríticas en varios paradigmas de aprendizaje y memoria, incluyendo el condicionamiento de miedo (Moser y col., 1994; Leuner y col., 2003; Restivo y col., 2009). Por otra parte, el hecho que la remodelación de las espinas dendríticas está implicada en la plasticidad sináptica (Trommald y col., 1996; Maletic-Savatic y col., 1999; Bastrikova y col., 2008; Yang y col., 2008) apoya la relevancia funcional de los cambios de las espinas dendríticas en el proceso de formación de la memoria. Como se destacó anteriormente, el MDZ administrado localmente en la ABL antes del estrés impidió la influencia del estrés y la evocación sobre la memoria de miedo resultante. En apoyo a estos resultados comportamentales, la estimulación de los sitios GABA-A en la ABL impidió los cambios en la remodelación estructural en el HD ya que los animales estresados tratados previamente con MDZ presentaron un número similar de espinas totales y maduras que las ratas no estresadas. Así, se sugiere que ambos fenómenos (memoria de miedo contextual y remodelación sináptica en el HD) están relacionados. Por otra parte, y basado en los presentes resultados se puede sugerir que la influencia del estrés sobre la memoria de miedo y la remodelación sináptica en el HD está regulada por la transmisión GABAérgica en la ABL. En línea con estos resultados, el aumento de la expresión de Arc hipocampal, una proteína implicada en la transmisión y la plasticidad sináptica (Bramham y col., 2008; Bramham y col., 2010), después del condicionamiento de miedo fue atenuada por la infusión intra-ABL de un agonista GABA-A (Huff y col., 2006). Además, la infusión de muscimol en la ABL bloqueó las deficiencias inducidas por el estrés sobre la potenciación a largo plazo hipocampal y la

memoria espacial hipocampo-dependiente (Kim y col., 2005). Por lo tanto, existe una creciente evidencia de que el complejo amigdalino, particularmente ABL, juega un rol importante en la influencia del estrés sobre la función hipocampal (Kim y col., 2005; Ghosh y col., 2013). En general, todos estos resultados ponen de relieve un rol clave de la ABL en la coordinación de la plasticidad estructural en áreas “*down-stream*” implicadas en el procesamiento y almacenamiento de la memoria (McIntyre y col., 2003; McGaugh, 2004). Así, una remodelación estructural en el HD se asocia a la robusta memoria de miedo después del condicionamiento y la estimulación aversiva. Además, esta influencia del estrés está bajo la modulación de un mecanismo dependiente de la transmisión GABAérgica en la ABL.

En conjunto, los presentes resultados demostraron que la influencia potenciadora inducida por el estrés sobre la memoria de miedo resultante después de la evocación fue dependiente del BDNF hipocampal y que el estado emocional presente al momento de la evocación define de manera crítica el desarrollo final de ese trazo de memoria.

La capacidad para modificar la traza de memoria en respuesta a las frecuentes modificaciones del medio ambiente y de las claves que representen una amenaza otorga una clara ventaja evolutiva y pone de manifiesto la relevancia funcional de la propiedad dinámica de la memoria. Nuestros hallazgos sugieren que la instauración de un estado emocional negativo, como el inducido por la exposición a una situación estresante, limita y afecta dicha propiedad. En este contexto, los resultados descritos en el presente estudio pueden contribuir a la comprensión de los mecanismos implicados en la generación de una memoria traumática, un elemento distintivo de trastornos relacionados con la ansiedad, tales como el desorden de estrés postraumático, el trastorno de pánico y las fobias.



# REFERENCIAS

- Abel T, Lattal KM. 2001. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol* 11(2): 180-187. Review.
- Adamec R, Holmes A, Blundell J. 2008. Vulnerability to lasting anxiogenic effects of brief exposure to predator stimuli: sex, serotonin and other factors-relevance to PTSD. *Neurosci Biobehav Rev* 32: 1287-1292.
- Aggleton JP. 2000. *The amygdala: a functional analysis*. New York: Wiley-Liss.
- Agranoff BW, Davis RE, Brink JJ. 1965. Memory fixation in the goldfish. *Proc Natl Acad Sci* 54: 788-793.
- Alberini CM. 2005. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 28: 51-56.
- Alberini CM. 2009. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev* 89: 121-145.
- Alberini CM. 2011. The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. *Front Behav Neurosci* 5 (12): 1-10.
- Alonso M, Bekinschtein P, Cammarota M, Vianna MR, Izquierdo I, Medina JH. 2005. Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learn Mem* 12: 504-510.
- Anokhin KV, Tiunova AA, Rose SP. 2002. Reminder effects-reconsolidation or retrieval deficit? Pharmacological dissection with protein synthesis inhibitors following reminder for a passive-avoidance task in young chicks. *Eur J Neurosci* 15: 1759-1765.
- Aston-Jones G, Cohen JD. 2005. An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu Rev Neurosci* 28: 403-450.
- Atkinson R, Shiffrin R. 1968. Human memory: a proposed system and its control processes. In: Spence K, Spence J (Eds.). *The Psychology of Learning and Motivation*. New York: Academic Press, pp. 89-105.
- Atsak P, Hauer D, Campolongo P, Schelling G, McGaugh JL, Roozendaal B. 2012. Glucocorticoids interact with the hippocampal endocannabinoid system in impairing retrieval of contextual fear memory. *Proc Natl Acad Sci* 109: 3504-3509.
- Bastrikova N, Gardner GA, Reece JM, Jeromin A, Dudek SM. 2008. Synapse elimination accompanies functional plasticity in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci* 105: 3123-3127.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH. 2007. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53: 261-277.
- Beylin AV, Shors TJ. 1998. Stress enhances excitatory trace eyeblink conditioning and opposes acquisition of inhibitory conditioning. *Behav Neurosci* 112: 1327-1338.

- Bignante EA, Paglini G, Molina VA. 2010. Previous stress exposure enhances both anxiety-like behaviour and p35 levels in the basolateral amygdala complex: modulation by midazolam. *Eur Neuropsychopharmacol* 20: 388-397.
- Bignante EA, Rodriguez Manzanares PA, Mlewski EC, Bertotto ME, Bussolino DF, Paglini G, Molina VA. 2008. Involvement of septal Cdk5 in the emergence of excessive anxiety induced by stress. *Eur Neuropsychopharmacol* 18: 578-588.
- Blair HT, Schafe GE, Bauer EP, Rodrigues SM, LeDoux JE. 2001. Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn Mem* 8: 229-242.
- Blanchard RJ, Blanchard DC. 1969. Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol* 67: 370-375.
- Boda B, Alberi S, Nikonenko I, Node-Langlois R, Jourdain P, Moosmayer M, Parisi-Jourdain L, Muller D. 2004. The mental retardation protein PAK3 contributes to synapse formation and plasticity in hippocampus. *J Neurosci* 24: 10816-10825.
- Bonilla-Jaime H, Vázquez-Palacios G, Arteaga-Silva M, Retana-Márquez S. 2006. Hormonal responses to different sexually related conditions in male rats. *Horm Behav* 49: 376-382.
- Braga MF, Aroniadou-Anderjaska V, Manion ST, Hough CJ, Li H. 2004. Stress impairs alpha(1A) adrenoceptor-mediated noradrenergic facilitation of GABAergic transmission in the basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology* 29: 45-58.
- Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B, Panja D, Schubert M, Soule J, Tiron A, Wibrand K. 2010. The Arc of synaptic memory. *Exp Brain Res* 200: 125-140.
- Bramham CR, Worley PF, Moore MJ, Guzowski JF. 2008. The immediate early gene arc/arg3.1: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci* 28: 11760-11767.
- Bronson FH, Desjardins C. 1982. Endocrine responses to sexual arousal in male mice. *Endocrinology* 111: 1286-1291.
- Bustos SG, Giachero M, Maldonado H, Molina VA. 2010. Previous stress attenuates the susceptibility to Midazolam's disruptive effect on fear memory reconsolidation: influence of pre-reactivation D-cycloserine administration. *Neuropsychopharmacology* 35: 1097-1108.
- Bustos SG, Maldonado H, Molina VA. 2006. Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. *Neuroscience* 139: 831-842.
- Bustos SG, Maldonado H, Molina VA. 2009. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology* 34: 446-457.
- Cai WH, Blundell J, Han J, Greene RW, Powell CM. 2006. Postreactivation glucocorticoids impair recall of established fear memory. *J Neurosci* 26: 9560-9566.

- Calfa G, Bussolino D, Molina VA. 2007. Involvement of the lateral septum and the ventral Hippocampus in the emotional sequelae induced by social defeat: role of glucocorticoid receptors. *Behav Brain Res* 181: 23-34.
- Calfa G, Chapleau CA, Campbell S, Inoue T, Morse SJ, Lubin FD, Pozzo-Miller L. 2011. HDAC activity is required for BDNF to increase quantal neurotransmitter release and dendritic spine density in CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus* 22(7): 1493-1500.
- Calfa G, Volosin M, Molina VA. 2006. Glucocorticoid receptors in lateral septum are involved in the modulation of the emotional sequelae induced by social defeat. *Behav Brain Res* 172: 324-332.
- Cammarota M, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I. 2004. Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learn Mem* 11: 572-578.
- Cannon WB. 1932. *The Wisdom of the Body*. W.W. Norton & Company, Inc., New York.
- 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: 180-194.
- Charniak E, McDermott D. 1985. *Introduction to artificial intelligence*. Reading, MA: Addison Wesley.
- Chapleau CA, Calfa GD, Lane MC, Albertson AJ, Larimore JL, Kudo S, Armstrong DL, Percy AK, Pozzo-Miller L. 2009. Dendritic spine pathologies in hippocampal pyramidal neurons from Rett syndrome brain and after expression of Rett-associated MECP2 mutations. *Neurobiol Dis* 35: 219-233.
- Chapleau CA, Pozzo-Miller L. 2007. Activity-Dependent Structural Plasticity of Dendritic Spines. In: Sweatt JD (Ed.). *Molecular Mechanisms of Memory*, Vol 4. Oxford: Elsevier, pp. 695-720.
- Dacher M, Lagarrigue A, Gauthier M. 2005. Antennal tactile learning in the honeybee: effect of nicotinic antagonists on memory dynamics. *Neuroscience* 130: 37-50.
- Davis HP, Squire LR. 1984. Protein synthesis and memory: a review. *Psychological bulletin* 96: 518-559.
- Davis M. 1992. The Role of the Amygdala in Conditioned Fear. See Aggleton 1992, pp. 255-306.
- Davis S, Bozon B, Laroche S. 2003. How necessary is the activation of the immediate early gene zif268 in synaptic plasticity and learning? *Behav Brain Res* 142: 17-30.
- Day TA. 2005. Defining stress as a prelude to mapping its neurocircuitry: no help from allostasis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry* 29: 1195-1200.
- de Quervain DJ, Henke K, Aerni A, Treyer V, McGaugh JL, Berthold T, Nitsch RM, Buck A, Roozendaal B, Hock C. 2003. Glucocorticoid-induced impairment of declarative memory retrieval is associated with reduced blood flow in the medial temporal lobe. *Eur J Neurosci* 17: 1296-1302.

- de Quervain DJ, Roozendaal B, McGaugh JL. 1998. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394: 787-790.
- DeVietti TL, Hopfer TM. 1974. Complete amnesia induced by ECS and complete recovery of memory following reinstatement treatment. *Physiol Behav* 12: 599-603.
- Dudai Y. 1989. *The Neurobiology of Memory. Concepts, findings, trends.* Oxford University Press, Oxford.
- Dudai Y. 2002. *Memory from A to Z. Keywords, concepts and beyond.* Oxford University Press, Oxford.
- Dudai Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55: 51-86.
- Dudai Y. 2006. Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Curr Opin Neurobiol* 16: 174-178.
- Dunaevsky A, Tashiro A, Majewska A, Mason C, Yuste R. 1999. Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13438-13443.
- Duncan CP. 1949. The retroactive effect of electroconvulsive shock. *J Comp Physiol Psychol* 42: 32-44.
- Duvarci S, Nader K, LeDoux JE. 2005. Activation of extracellular signal-regulated kinase-mitogenactivated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning. *Eur J Neurosci* 21: 283-289.
- Eisenberg M, Kobil T, Berman DE, Dudai Y. 2003. Stability of retrieved memory: Inverse correlation with trace dominance. *Science* 301: 1102-1104.
- Faber ES, Delaney AJ, Sah P. 2005. SK channels regulate excitatory synaptic transmission and plasticity in the lateral amygdala. *Nat Neurosci* 8: 635-641.
- Fanselow MS. 1980. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov J Biol Sci* 15: 177-182.
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A. 1998. Rapid actinbased plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20: 847-854.
- Frankland PW, Cestari V, Filipkowski RK, McDonald RJ, Silva A. 1998. The dorsal hippocampus is essential for context discrimination, but not for contextual conditioning. *Behav Neurosci* 112: 863-874.
- Frankland PW, Ding HK, Takahashi E, Suzuki A, Kida S, Silva AJ. 2006. Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learn Mem* 13: 451-457.
- Gerard RW. 1949. Physiology and psychiatry. *Am J Psychiatry* 106: 161-173.

- Giovannini MG. 2006. The role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in memory encoding. *Rev Neurosci* 17: 619-634.
- Gisquet-Verrier P, Alexinsky T. 1986. Does contextual change determine long term forgetting? *Anim Learn Behav* 14: 349-358.
- Gisquet-Verrier P, Dekeyne A, Alexinsky T. 1989. Differential effects of several retrieval cues over time: Evidence for time-dependent reorganization of memory. *Anim Learn Behav* 17: 394-408.
- Gisquet-Verrier P, Riccio DC. 2012. Memory reactivation effects independent of reconsolidation. *Learn Mem* 19: 401-409.
- Glickman S. 1961. Perseverative neural processes and consolidation of the memory trace. *Psychol Bull* 58: 218-233.
- Ghosh S, Laxmi TR, Chattarji S. 2013. Functional connectivity from the amygdala to the hippocampus grows stronger after stress. *J Neurosci* 33: 7234-7244.
- Gray EG. 1959. Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature* 183: 1592-1593.
- Hall J, Thomas KL, Everitt BJ. 2000. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci* 3: 533-535.
- Hall J, Thomas KL, Everitt BJ. 2001. Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J Neurosci* 21: 2186-2193.
- Hardt O, Einarsson EO, Nader K. 2010. A bridge over troubled water: reconsolidation as a link between cognitive and neuroscientific memory research traditions. *Annu Rev Psychol* 61: 141-167.
- Harris KM. 1999. Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol* 9: 343-348.
- Hebb DO. 1949. *The Organization of Behavior: a Neuropsychological Theory*. Wiley, New York.
- Holt EB. 1931. *Animal Drive and the Learning Process*. Henry Holt, New York.
- Huff NC, Frank M, Wright-Hardesty K, Sprunger D, Matus-Amat P, Higgins E, Rudy JW. 2006. Amygdala regulation of immediate-early gene expression in the hippocampus induced by contextual fear conditioning. *J Neurosci* 26: 1616-1623.
- Huff NC, Wright-Hardesty KJ, Higgins EA, Matus-Amat P, Rudy JW. 2005. Context pre-exposure obscures amygdala modulation of contextual-fear conditioning. *Learn Mem* 12: 456-460.

- Inda MC, Muravieva EV, Alberini CM. 2011. Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *J Neurosci* 31: 1635-1643.
- Isoardi NA, Bertotto ME, Martijena ID, Molina VA, Carrer HF. 2007. Lack of feedback inhibition on rat basolateral amygdala following stress or withdrawal from sedative-hypnotic drugs. *Eur J Neurosci* 26: 1036-1044.
- Isoardi NA, Martijena ID, Carrer HF, Molina VA. 2004. Increased fear learning coincides with neuronal disinhibition and facilitated LTP in the basolateral amygdala following benzodiazepine withdrawal in rats. *Neuropsychopharmacology* 29: 1852-1864.
- James W. 1890. *The principles of psychology*. Holt, New York.
- Jarome TJ, Werner CT, Kwapis JL, Helmstetter FJ. 2011. Activity dependent protein degradation is critical for the formation and stability of fear memory in the amygdala. *PLoS One* 6: e24349.
- Joëls M, Baram TZ. 2009. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* 10(6): 459-466.
- Kandel ER. 2001. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294: 1030-1038.
- Kapp BS, Whalen PJ, Supple WF, Pascoe JP. 1992. Amygdaloid contributions to conditioned arousal and sensory information processing. See Aggleton 1992, pp. 229-254.
- Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H. 2003. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci* 26: 360-368.
- Kelly A, Laroche S, Davis S. 2003. Activation of mitogenactivated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci* 23: 5354-5360.
- Kida S, Josselyn SA, Pena de Ortiz S, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, Silva AJ. 2002. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci* 5: 348-355.
- Kim DH, Kim JM, Park SJ, Cai M, Liu X, Lee S, Shin CY, Ryu JH. 2012. GABA(A) receptor blockade enhances memory consolidation by increasing hippocampal BDNF levels. *Neuropsychopharmacology* 37: 422-433.
- Kim JJ, Fanselow MS. 1992. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256: 675-677.
- Kim JJ, Koo JW, Lee HJ, Han JS. 2005. Amygdalar inactivation blocks stress-induced impairments in hippocampal long-term potentiation and spatial memory. *J Neurosci* 25: 1532-1539.
- Knowlton BJ, Mangels JA, Squire LR. 1996. A neostriatal habit learning system in humans. *Science* 273 (5280): 1399-1402.

- Koh IY, Lindquist WB, Zito K, Nimchinsky EA, Svoboda K. 2002. An image analysis algorithm for dendritic spines. *Neural comput* 14: 1283-1310.
- Koh MT, Bernstein IL. 2003. Inhibition of protein kinase A activity during conditioned taste aversión retrieval: interference with extinction or reconsolidation of a memory? *Neuroreport* 14: 405-407.
- Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flügge G, Korte SM, Meerlo P, Murison R, Olivier B, Palanza P, Richter-Levin G, Sgoifo A, Steimer T, Stiedl O, van Dijk G, Wöhr M, Fuchs E. 2011. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev* 35(5): 1291-1301.
- Lamprecht R, LeDoux J. 2004. Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci* 5(1): 45-54. Review.
- 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.
- LeDoux JE. 2000. Emotion circuits in the brain. *Annual review of neuroscience* 23: 155-184.
- LeDoux J. 2009. The amygdala. *Curr Biol* 17: 868-874.
- LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ. 1988. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci* 8: 2517-29.
- LeDoux JE, Schiller D. 2009. The human amygdala. Insights from other animals. In: Whalen PJ, Phelps EA (Eds.). *The human amígdala*. New York: Guilford, pp. 43-60.
- Lee JL. 2008. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci* 11: 1264-1266.
- Lee JL. 2009. Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends Neurosci* 32: 413-420.
- Lee JL. 2010. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Front Behav Neurosci* 4: 168.
- Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL. 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304: 839-843.
- Lee JL, Hynds RE. 2013. Divergent cellular pathways of hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Hippocampus* 23(3): 233-244.
- Lee JL, Milton AL, Everitt BJ. 2006. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *J Neurosci* 26: 10051-10056.
- Lee SH, Choi JH, Lee N, Lee HR, Kim JI, Yu NK, Choi SL, Kim H, Kaang BK. 2008. Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science* 319: 1253-1256.



- Leuner B, Falduto J, Shors TJ. 2003. Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J Neurosci* 23: 659-665.
- Levine S. 2005. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology* 30: 939-946.
- Levine S, Ursin H. 1991. What is stress? In: Brown MR, Koob GF, Rivier C (Eds.). *Stress: Neurobiology and Neuroendocrinology*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 3-21.
- Lewis DJ. 1969. Sources of experimental amnesia. *Psychol Rev* 76: 461-472.
- Lewis DJ. 1979. Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol Bull* 86: 1054-1083.
- Lewis DJ, Bregman NJ, Mahan J. 1972. Cue-dependent amnesia in rats. *J Comp Physiol Psychol* 81: 243-247.
- Lopez-Salon M, Alonso M, Vianna MR, Viola H, Mello e Souza T, Izquierdo I, Pasquini JM, Medina JH. 2001. The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. *Eur J Neurosci* 14: 1820-1826.
- Lubin FD, Roth TL, Sweatt JD. 2008. Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci* 28: 10576-10586.
- Luine V, Villegas M, Martinez C, McEwen BS. 1994. Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain Res* 639: 167-170.
- Maddox SA, Monsey MS, Schafe GE. 2011. Early growth response gene 1 (Egr-1) is required for new and reactivated fear memories in the lateral amygdala. *Learn Mem* 18: 24-38.
- Magariños AM, McEwen BS. 1995. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* 69(1): 89-98.
- Maldonado NM, Martijena ID, Molina VA. 2011. Facilitating influence of stress on the consolidation of fear memory induced by a weak training: reversal by midazolam pretreatment. *Behav Brain Res* 225: 77-84.
- Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K. 1999. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283: 1923-1927.
- Malkani S, Rosen JB. 2000. Specific induction of early growth response gene 1 in the lateral nucleus of the amygdala following contextual fear conditioning in rats. *Neuroscience* 97: 693-702.
- Mamou CB, Gamache K, Nader K. 2006. NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nat Neurosci* 9: 1237-1239.

- Maren S, Aharonov G, Stote DL, Fanselow MS. 1996. N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. *Behav Neurosci* 110: 1365-1374.
- 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.
- Martijena ID, Calvo N, Volosin M, Molina VA. 1997. Prior exposure to a brief restraint session facilitates the occurrence of fear in response to a conflict situation: behavioral and neurochemical correlates. *Brain Res* 752: 136-142.
- Martijena ID, Molina VA. 2012. The influence of stress on fear memory processes. *Braz J Med Biol Res* 45(4): 308-313.
- Martijena ID, Rodriguez Manzanares PA, Lacerra C, Molina VA. 2002. Gabaergic modulation of the stress response in frontal cortex and amygdala. *Synapse* 45: 86-94.
- Matus A. 2000. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science* 290: 754-778.
- McEwen BS. 1999. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22: 105-122.
- McEwen BS. 2003. Mood disorders and allostatic load. *Biol Psychiatry* 54(3): 200-207. Review.
- McEwen BS, Stellar E. 1993. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med* 153: 2093-2101.
- McEwen BS, Wingfield JC. 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav* 43: 2-15.
- McGaugh JL. 1966. Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153: 1351-58.
- McGaugh JL. 2000. Memory--a century of consolidation. *Science* 287: 248-251.
- McGaugh JL. 2004. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 27: 1-28.
- McGaugh JL, Krivanek JA. 1970. Strychnine effects on discrimination learning in mice: effects of dose and time of administration. *Physiol Behav* 5(12): 1437-1442.
- McGaugh JL, Roozendaal B. 2002. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr Opin Neurobiol* 12: 205-210.
- McIntyre CK, Power AE, Roozendaal B, McGaugh JL. 2003. Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Ann N Y Acad Sci* 985: 273-293.

- McKenzie S, Eichenbaum H. 2011. Consolidation and reconsolidation: Two lives of memories? *Neuron* 71: 224-233.
- McKinney RA, Capogna M, Durr R, Gahwiler BH, Thompson SM. 1999. Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation. *Nat Neurosci* 2: 44-49.
- Melchor JP, Strickland S. 2005. Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thromb Haemost* 93(4): 655-660. Review.
- Merlo E, Freudenthal R, Maldonado H, Romano A. 2005. Activation of the transcription factor NF-kappaB by retrieval is required for long-term memory reconsolidation. *Learn Mem* 12: 23-29.
- Milekic MH, Alberini CM. (2002). Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron* 36: 521-525.
- Miller CA, Marshall JF. 2005. Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron* 47: 873-884.
- Miller RR, Springer AD. 1972. Induced recovery of memory in rats following electroconvulsive shock. *Physiol Behav* 8: 645-651.
- Milton AL, Merlo E, Ratano P, Gregory BL, Dumbreck JK, Everitt BJ. 2013. Double dissociation of the requirement for GluN2B- and GluN2A-containing NMDA receptors in the destabilization and restabilization of a reconsolidating memory. *J Neurosci* 33(3): 1109-1115.
- Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ. 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 160: 203-204.
- Mitra R, Jadhav S, McEwen BS, Vyas A, Chattarji S. 2005. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9371-9376.
- Mochny CR, Kincheski GC, Molina VA, Carobrez AP. 2012. Dorsolateral periaqueductal gray stimulation prior to retrieval potentiates a contextual fear memory in rats. *Behav Brain Res* 237C: 76-81.
- Morris RG, Inglis J, Ainge JA, Olverman HJ, Tulloch J, Dudai Y, Kelly PA. 2006. Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron* 50: 479-489.
- Moser MB, Trommald M, Andersen P. 1994. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc Natl Acad Sci* 91: 12673-12675.
- Müller GE, Pilzecker A. 1900. Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis. *Z. Psychol. Ergänzungsband* (Suppl. No. 1): 1-300.

- Murphy DD, Segal M. 1996. Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci* 16: 4059-4068.
- Nader K, Hardt O. 2009. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 10(3): 224-234. Review.
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE. 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406: 722-726.
- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K. 2002. Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64: 313-353.
- Pape HC, Pare D. 2010. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiol Rev* 90: 419-463.
- Paxinos G, Watson C. 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Pedreira ME, Maldonado H. 2003 Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* 38: 863-869.
- Pedreira ME, Perez-Cuesta LM, Maldonado H. 2002. Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *J Neurosci* 22: 8305-8311.
- Pelletier JG, Likhtik E, Filali M, Pare D. 2005. Lasting increases in basolateral amygdala activity after emotional arousal: implications for facilitated consolidation of emotional memories. *Learn Mem* 12: 96-102.
- Phillips RG, LeDoux JE. 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106: 274-285.
- Ploski JE, Park KW, Ping J, Monsey MS, Schafe GE. 2010. Identification of plasticity-associated genes regulated by Pavlovian fear conditioning in the lateral amygdala. *J Neurochem* 112: 636-650.
- Pozzo-Miller LD, Inoue T, Murphy DD. 1999. Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca<sup>2+</sup> transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J Neurophysiol* 81: 1404-1411.
- Przybylski J, Sara SJ. 1997. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* 84: 41-246.
- Quartermain D, McEwen B, Azmita E. 1972. Recovery of memory following amnesia in the rat and mouse. *J Comp Physiol Psychol* 79: 360-379.
- Ramón y Cajal S. 1894. La fine structure des centres nerveux. *Proc R Soc Lond* 55: 444-468.

- Rao-Ruiz P, Rotaru DC, van der Loo RJ, Mansvelder HD, Stiedl O, Smit AB, Spijker S. 2012. Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. *Nat Neurosci* 14(10): 1302-1308.
- Rattiner LM, Davis M, French CT, Ressler KJ. 2004a. Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdala-dependent fear conditioning. *J Neurosci* 24: 4796-4806.
- Rattiner LM, Davis M, Ressler KJ. 2004b. Differential regulation of brain-derived neurotrophic factor transcripts during the consolidation of fear learning. *Learn Mem* 11: 727-731.
- Rattiner LM, Davis M, Ressler KJ. 2005. Brain-derived neurotrophic factor in amygdala-dependent learning. *Neuroscientist* 11: 323-333.
- Ressler KJ, Paschall G, Zhou XL, Davis M. 2002. Regulation of synaptic plasticity genes during consolidation of fear conditioning. *J Neurosci* 22: 7892-7902.
- 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: 8206-8214.
- Ribot T. 1882. *Diseases of Memory*. New York: Appleton-Century-Crofts.
- Rodriguez-Ortiz CJ, De la Cruz V, Gutierrez R, Bermidez-Rattoni F. 2005. Protein synthesis underlies postretrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learn Mem* 12: 533-537.
- Rodriguez Manzanares PA, Isoardi NA, Carrer HF, Molina VA. 2005. Previous stress facilitates fear memory, attenuates GABAergic inhibition, and increases synaptic plasticity in the rat basolateral amygdala. *J Neurosci* 25: 8725-8734.
- Rohrbaugh M, Riccio DC. 1970. Paradoxical enhancement of learned fear. *J Abnorm Psychol* 75: 210-216.
- Rohrbaugh M, Riccio DC, Arthur A. 1972. Paradoxical enhancement of conditioned suppression. *Behav Res Ther* 10: 125-130.
- Romero LM, Dickens MJ, Cyr NE. 2009. The reactive scope model: a new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. *Horm Behav* 55: 375-389.
- Roosendaal B. 2002. Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiol Learn Mem* 78: 578-595.
- Roosendaal B, McEwen BS, Chattarji S. 2009. Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* 10: 423-433.

- Rosen JB, Fanselow MS, Young SL, Sircoske M, Maren S. 1998. Immediate-early gene expression in the amygdala following footshock stress and contextual fear conditioning. *Brain Res* 796: 132-142.
- Rouaud E, Billard JM. 2003. D-cycloserine facilitates synaptic plasticity but impairs glutamatergic neurotransmission in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol* 140: 1051- 1056.
- Rudy JW. 2008. Destroying memories to strengthen them. *Nat Neurosci* 11: 1241-1242.
- Rudy JW, Barrientos RM, O'Reilly RC. 2002. Hippocampal formation supports conditioning to memory of a context. *Behav Neurosci* 116: 530-538.
- Rudy JW, Huff NC, Matus-Amat P. 2004. Understanding contextual fear conditioning: Insights from a two-process model. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 675-685.
- Salvador A. 2005. Coping with competitive situations in humans. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 195-205.
- Sanders J, Cowansage K, Baumgärtel K, Mayford M. 2012. Elimination of dendritic spines with long-term memory is specific to active circuits. *J Neurosci* 32(36): 12570-12578.
- Sangha S, Scheibenstock A, Lukowiak K. 2003. Reconsolidation of a long-term memory in *Lymnaea* requires new protein and RNA synthesis and the soma of right pedal dorsal 1. *J Neurosci* 23: 8034-8040.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21: 55-89.
- Sara SJ. 1973. Recovery from hypoxia and ECS induced amnesia after a single exposure to the training environment. *Physiol Behav* 9: 85-89.
- Sara SJ. 2000. Retrieval and Reconsolidation: Toward a Neurobiology of Remembering. *Learn Mem* 7: 73-84.
- Sara SJ. 2010. Reactivation, retrieval, replay and reconsolidation in and out of sleep: connecting the dots. *Front Behav Neurosci* 13 (4): 185.
- Sarabdjitsingh RA, Kofink D, Karst H, de Kloet ER, Joels M. 2012. Stress-induced enhancement of mouse amygdalar synaptic plasticity depends on glucocorticoid and ss-adrenergic activity. *PLoS One* 7: e42143.
- Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, Bauer EP, Sweatt JD, LeDoux JE. 2000. Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of Pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* 20: 8177-8187.
- Schiller D, Monfils MH, Raio CM, Johnson DC, LeDoux JE, Phelps EA. 2010. Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. *Nature* 463: 49-53.

- Scoville WB, Milner B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Psychiatry* 20: 11-21.
- Segal I, Korkotian I, Murphy DD. 2000. Dendritic spine formation and pruning: common cellular mechanisms? *Trends Neurosci* 23: 53-57.
- Selye H. 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138: 32.
- Shin LM, Liberzon I. 2010. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology* 35: 169-191.
- Shors TJ. 2001. Acute stress rapidly and persistently enhances memory formation in the male rat. *Neurobiol Learn Mem* 75: 10-29.
- Shors TJ, Weiss C, Thompson RF. 1992. Stress-induced facilitation of classical conditioning. *Science* 257: 537-539.
- Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM. 2000. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* 97(2): 253-266.
- Squire LR, Alvarez P. 1995. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol* 5: 169-177.
- Sterling P, Eyer J. 1988. Allostasis a new paradigm to explain arousal pathology. In: Fisher S, Reason J (Eds.). *Handbook of Life Stress Cognition and Health*. Oxford University Press, Oxford, pp. 629-650.
- Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24: 4787-4795.
- Suzuki A, Mukawa T, Tsukagoshi A, Frankland PW, Kida S. 2008. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learn Mem* 15(6): 426-433.
- Sweatt JD. 2004. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14: 311-317.
- Tanzi E. 1893. I fatti e le induzioni nell'odierna istologia del sistema nervoso. *Riv Sper Freniatr* 19: 419-472.
- Trommald M, Hulleberg G, Andersen P. 1996. Long-term potentiation is associated with new excitatory spine synapses on rat dentate granule cells. *Learn Mem* 3: 218-228.
- Tronel S, Milekic MH, Alberini CM. 2005. Linking new information to a reactivated memory requires consolidation and not reconsolidation mechanisms. *PLoS Biol* 3: e293.

- Tronson NC, Taylor JR. 2007. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 8: 262-275.
- Tully K, Li Y, Tsvetkov E, Bolshakov VY. 2007. Norepinephrine enables the induction of associative long-term potentiation at thalamo-amygdala synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 14146-14150.
- Tulving E. 1972. Episodic and semantic memory. In: Tulving E, Donaldson W (Eds.), *Organization of Memory*. New York: Academic Press, pp. 381-402.
- Tulving E. 1983. *Elements of Episodic Memory*. Oxford: Clarendon Press.
- Tulving E, Thompson DM. 1973. Encoding specificity and retrieval processes in episodic memory. *Psychological Review* 80: 352-373.
- Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD. 2002. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem* 9: 224-237.
- 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* 108: 8456-8460.
- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S. 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 22: 6810-6818.
- Vyas A, Pillai AG, Chattarji S. 2004. Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience* 128: 667-673.
- Walker MP, Brakefield T, Hobson JA, Stickgold R. 2003. Dissociable stages of human memory consolidation and reconsolidation. *Nature* 425: 616-620.
- Weiss JM. 1972. Influence of psychological variables on stress-induced pathology. In: Porter R, Knight J (Eds.). *Physiology, Emotion and Psychosomatic Illness*. CIBA Foundation Symposium. Elsevier, Amsterdam.
- White NM, McDonald RJ. 2002. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem* 77(2): 125-184. Review.
- Wilensky AE, Schafe GE, LeDoux JE. 2000. The amygdala modulates memory consolidation of fear-motivated inhibitory avoidance learning but not classical fear conditioning. *J Neurosci* 20: 7059-7066.
- Woodson JC, Macintosh D, Fleshner M, Diamond DM. 2003. Emotion-induced amnesia in rats: working memory-specific impairment, corticosterone-memory correlation, and fear versus arousal effects on memory. *Learn Mem* 10: 326-336.



## REFERENCIAS

---

Yamada K, Nabeshima T. 2003. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* 91: 267-270.

Yang Y, Wang XB, Frerking M, Zhou Q. 2008. Spine expansion and stabilization associated with long-term potentiation. *J Neurosci* 28: 5740-5751.

Yuste R, Majewska A, Holthoff K. 2000. From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3: 653-659.

Zhang S, Cranney J. 2008. The role of GABA and anxiety in the reconsolidation of conditioned fear. *Behav Neurosci* 122: 1295-1305.

**TRABAJOS  
PUBLICADOS**

Bustos SG, **Giachero M**, Maldonado H, Molina VA. 2010. Previous stress attenuates the susceptibility to Midazolam's disruptive effect on fear memory reconsolidation: Influence of pre-activation D-cycloserine administration. *Neuropsychopharmacology* 35(5): 1097-1108.

**Giachero M**, Bustos SG, Calfa G, Molina VA. 2013. A BDNF sensitive mechanism is involved in the fear memory resulting from the interaction between stress and the retrieval of an established trace. *Learning and Memory* 20(5): 245-255.

**Giachero M**, Calfa G, Molina VA. 2013. Hippocampal structural plasticity accompanies the resulting contextual fear memory following stress and fear conditioning. *Learning and Memory*. En revisión.