



“Efecto de IL-1 β sobre el proceso de reconsolidación de una memoria de miedo contextual, mecanismos involucrados y rol modulador de α -MSH”

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

Licenciada en Bioquímica Clínica Ivana Noelia Machado

IFEC-CONICET

Departamento de Farmacología

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Argentina

Marzo 2016

COMISIÓN DE TESIS

Dra. María Angélica Perillo

Dra. Silvia Correa

Dr. Víctor Molina

Dra. Teresa Scimonelli

(Directora de Tesis)

Dra. María Eugenia Pedreira

(Evaluador Externo)

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

Para la realización de este trabajo la autora contó con una beca del CONICET 2011-2016, además del apoyo financiero de subsidios otorgados por CONICET, la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT-UNC) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (FONCyT).

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

Agradecimientos

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

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme el apoyo económico para la realización de esta tesis.

A las organizaciones IBRO-LARC y SfN/IBRO por la ayuda económica brindada para la asistencia a congresos.

A la Dra. Teresa Scimonelli por haberme dado la oportunidad de ser parte de su equipo, por el apoyo brindado en todos estos años y en especial por la paciencia. Además de lo profesional, le agradezco mucho por valorarme como persona y no sólo como tesista.

A los miembros de la comisión de tesis, Dr. Víctor Molina, a la Dra. Silvia Correa y a la Dra. María Angélica Perillo por sus valiosos aportes, críticas y sugerencias durante la realización de esta tesis doctoral.

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

A todos los profesores del Dpto. de Farmacología, especialmente al Dr. Molina y a la Dra. Martijena, por responder a mis inquietudes, por sus consejos y sus comentarios, por contribuir a mi crecimiento profesional. Al Dr. Calfa y a la Dra. Bollati por su excelente predisposición en ayudarme.

Al Dr. Alejandro Vilcaes, por su ayuda en los experimentos de liberación de glutamato e influjo de calcio. Al Dr. Germán Roth, por permitirme el espacio y la realización de los experimentos. A la gente del CIQUIBIC Lau, Natalí, Alicia, Inés y Nico por la ayuda brindada durante los experimentos.

A Estela por ser mucho más que una excelente profesional, por saber escuchar, acompañar, discutir, guiar y enseñar. Por todas las charlas Box 2 puertas cerradas, que seguramente extrañaré. ¡Gracias infinitas Este! Me siento afortunada de haberte conocido, mosqui de las buenas 😊

A Lore por haber sido un apoyo indispensable a nivel profesional y una amiga en lo personal. Por saber escuchar y compartir buenos y malos momentos. ¡Muchas gracias Lore!.

A Silvia D y Maria José, por ayudarme en lo profesional como personal. A Gladis por su complicidad. A todas por su simpatía y generosidad.

A las chicas de Fisis por ser tan geniales!! Graciela, Aldana, Eliana, Jime, Moni, Mari, Pato y Flor. ¡Gracias por apoyarme y estar en tanto chicas!. Son mucho mas que colegas, son unas grandes amigas.

A los chicos del bioterio, Yani, Nico y Javi. Seré la pesadilla de sus cuentos por siempre 😊. ¡Muchas muchas gracias por ayudarme en tanto!. Especialmente a Yani por el aguante de tantos años, finalmente te voy a dejar de molestar con las ratitas.

A mi BXDX (Lauri, Marisa y Pato) que tiene nombre de banda pero es el mejor grupo de locas divinas que he conocido, en todos estos años nos hemos acompañado, apoyado, inspirado y levantado juntas.

A Pato y Vane, por apoyarme y soportar mis descargas contra todo. Por nuestras conversaciones eternas, por ganarse la confianza que pocos tienen en mi vida y ser parte de innumerables recuerdos.

compartidos. Por la comida que sabe mejor a la mañana después de una noche de desvelo 😊. Si ese departamento hablara... Las quiero muchísimo chicas.

A Pato. Amiga, colega, compañera, guía, profe y hermana científica. No me alcanzan las palabras para agradecerte todo lo que me has ayudado a seguir adelante. Sos un ejemplo de persona Patito. ¡Te quiero mucho!.

A Andre y Guada porque aún siendo tan nuevitas son material BXDX y team mosqui a full. Guada, ¡muchas gracias por tantas molestias!.

A Pablito, Naty y Noe. Muchas gracias chicos por apoyarme en todos estos años, por escucharme y ayudarme en tanto. Son excelentes personas y amigos, agradezco mucho haberlos conocido.

A las locas lindas Ale, Noe, Mari, Flor, Mary, Mara, Pato, Vane, Lau G, Lau DG y Naty. Son unas divinas chicas, gracias por ser parte de tantos recuerdos lindos, por su complicidad, por su contención y por tantos momentos inolvidables.

A mis compañeros del departamento, Ale, Andre, Ceci, Emi, Eve, Noe, Fla, Flor, Guada, Javi, Lau G, Lau DG, Lore, Mara, Mari, Luz, Dai, Naty, Pablito, Pato, Pauli Avalos, Pauli A, Beta, Romi, Vane, Yani, Coty G, Coty P, Mary, Martín y Nico. Porque todos en mayor o menor medida han sido parte de este crecimiento, les agradezco mucho.

A mis padres, por haberme dado la oportunidad de estudiar y formarme. Por ser parte de mis logros y mis derrotas. Por estar pendientes de mi bienestar y mi seguridad en todo momento. Por trabajar día a día enseñándome el valor del esfuerzo. ¡Muchas gracias por todo!, los amo.

A mi hermana Daniela por ser tan buena amiga y hermana. Sos un ejemplo de dedicación y una excelente madre. Vos y Tizi son mi cable a tierra día a día. ¡Gracias a los dos por estar siempre con una gran sonrisa!. Por haber soportado todas las etapas de estos últimos años. Los peleo pero los re quiero.

A mi tía Teresa por enseñarme a que hay que seguir adelante pese a que las circunstancias no sean las mejores. ¡Muchas gracias Tía!, por estar a mi lado desde que tengo recuerdos y ser un ejemplo de perseverancia y lucha continua.

A mis difuntos abuelos, mis segundos padres. Me enseñaron a superar miedos, a valerme por mi misma y sobre todo a esforzarme en la vida sabiendo que hay recompensas en los pequeños detalles.

A João por enseñarme tanto de mi misma y de la vida, por ser mi google, mi diseñador gráfico, mi traductor, mi maestro, mi amigo, mi compañero de aventuras y sobre todo el amor de mi vida. Te agradezco por la paciencia y las horas de espera. Por saber sacarme una sonrisa cuando más lo necesito y conocerme tan bien. Por aceptar luchar conmigo contra todas las adversidades. ¡Muchas gracias amor!.

A mi amiga de la vida Auro. Loca sos una persona increíble y haber compartido tantos años juntas fue indispensable para mí. Gracias por dejarme ser una más en tu familia y acompañarme cuando más lo necesito. Sos de las pocas personas que siento cerca en todo momento. Sos un ejemplo de fortaleza, te quiero mucho amiga.

A mis padres,

ÍNDICE

Abreviaturas.....	4
Resumen.....	7
Introducción.....	9
I- Aprendizaje y memoria.....	10
-Hipocampo.....	11
- Plasticidad sináptica y LTP.....	13
- Etapas de procesamiento y almacenamiento de la información.....	14
-Reconsolidación.....	15
<i>Mecanismos moleculares implicados en el proceso de reconsolidación.....</i>	<i>16</i>
II- Modulación inmunológica de los procesos de memoria.....	20
- Vías de señalización de IL-1 β en el sistema nervioso central.....	21
- Efecto de IL-1 β sobre procesos de memoria.....	24
Mecanismos involucrados en el efecto de IL-1 β sobre la memoria.....	25
III- Melanocortinas.....	27
- Sistema melanocortinérgico.....	27
- Rol de α -MSH en la modulación de respuestas anti-inflamatorias centrales.....	29
- Rol modulador de α -MSH en procesos plásticos.....	31
Hipótesis y Objetivos.....	33
Hipótesis.....	34
Objetivo general.....	35
Objetivos específicos.....	35
Materiales y Métodos.....	36
- Animales.....	37

- Cirugía estereotáxica.....	37
- Microinyección intracerebral.....	38
- Drogas: administración y dosis.....	39
- Análisis histológico.....	39
- Condicionamiento de miedo contextual.....	40
<i>Aparato para la administración de shocks inescapables.....</i>	<i>40</i>
<i>Sesión de entrenamiento.....</i>	<i>41</i>
<i>Sesión de reactivación.....</i>	<i>41</i>
<i>Sesión de Test.....</i>	<i>42</i>
- Estudios bioquímicos.....	43
Disección.....	43
Liberación de glutamato e influjo de calcio.....	43
<i>Purificación de sinaptosomas.....</i>	<i>43</i>
<i>Ensayo de liberación de glutamato.....</i>	<i>44</i>
<i>Determinación del influjo de calcio.....</i>	<i>45</i>
Western blot.....	46
<i>Extracción de proteínas totales.....</i>	<i>45</i>
<i>Determinación de proteínas mediante inmunotransferencia.....</i>	<i>46</i>
<i>Análisis de datos.....</i>	<i>48</i>
Biotinilación.....	49
- Estadística.....	50
Resultados.....	51

Capítulo 1: Efecto de IL- 1 β sobre la reconsolidación de una memoria contextual de miedo, posible rol modulador de α -MSH y receptores melanocortinérgicos involucrados.....	52
Capítulo 2: Efecto de IL-1 β sobre la liberación de glutamato durante el proceso de reconsolidación de una memoria contextual de miedo y rol modulador de α -MSH.....	60
Capítulo 3: Efecto de IL-1 β sobre la activación de ERK2 y expresión de zif268 en hipocampo, durante el proceso de reconsolidación y modulación por α -MSH sobre dichos procesos.....	69
Capítulo 4: Efecto de IL-1 β sobre la fosforilación, expresión en la membrana celular y expresión total de la subunidad GluA1 del receptor AMPA. Rol modulador de α -MSH.....	77
Discusión.....	86
Bibliografía.....	101
Publicaciones científicas.....	122

Abreviaturas

AcP: proteína accesoria del receptor de IL-1 tipo I

ACTH: hormona adrenocorticotrófica

AgRP: proteína relacionada al gen agouti

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

AMPAR: receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

AMPC: adenosín monofosfato cíclico

ANOVA: análisis de la varianza

ASB: albúmina sérica bovina

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

BHE: barrera hemato encefálica

Ca²⁺: calcio

CaMKII: calcio calmodulina quinasa II

C/EBP β : proteína β de unión al promotor CCAAT

c.p.m: cuentas por minuto

CREB: proteína de unión al elemento de respuesta a AMPC

DSC: D-cicloserina

EC: estímulo condicionado

EI: estímulo incondicionado

ELK1: proteína con dominio para ETS

ERK1/2 o p42/p44: proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2

HD: hipocampo dorsal

HS: antagonista HS014

i.c.v.: intracerebroventricular

IEG: gen de expresión temprana

i.p.: intraperitoneal

IL-1: interleucina 1

IL-1ra: antagonista del receptor de IL-1

IL-1RI: receptor de IL-1 tipo I

IL-1RII: receptor de IL-1 tipo II

IRAK: proteína quinasa asociada a IL-1RI

LPS: lipopolisacáridos

LTP: potenciación a largo plazo

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos

MCs: melanocortinas

MCR: receptor melanocortinérgico

NDP- α -MSH: análogo sintético de α -MSH, Nle₄, D-Phe₇-hormona alfa melanocito estimulante

NF- κ B: factor nuclear kappa B

NMDA: N-metil-D-aspartato

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

POMC: péptido pro-opiomelanocortina

RC: respuesta condicionada

SAL: solución salina estéril 0.9%

SDS: dodecil sulfato sódico

SHU: antagonista SHU9119

SI: sistema inmunológico

SNC: sistema nervioso central

TBS: solución tampón tris- salina

TNF α : factor de necrosis tumoral α

zif268: factor de transcripción dedos de zinc

α -MSH: hormona alfa melanocito estimulante

β -AR: receptores β -adrenérgicos

β -LPH: hormona β -lipotropina

Resumen

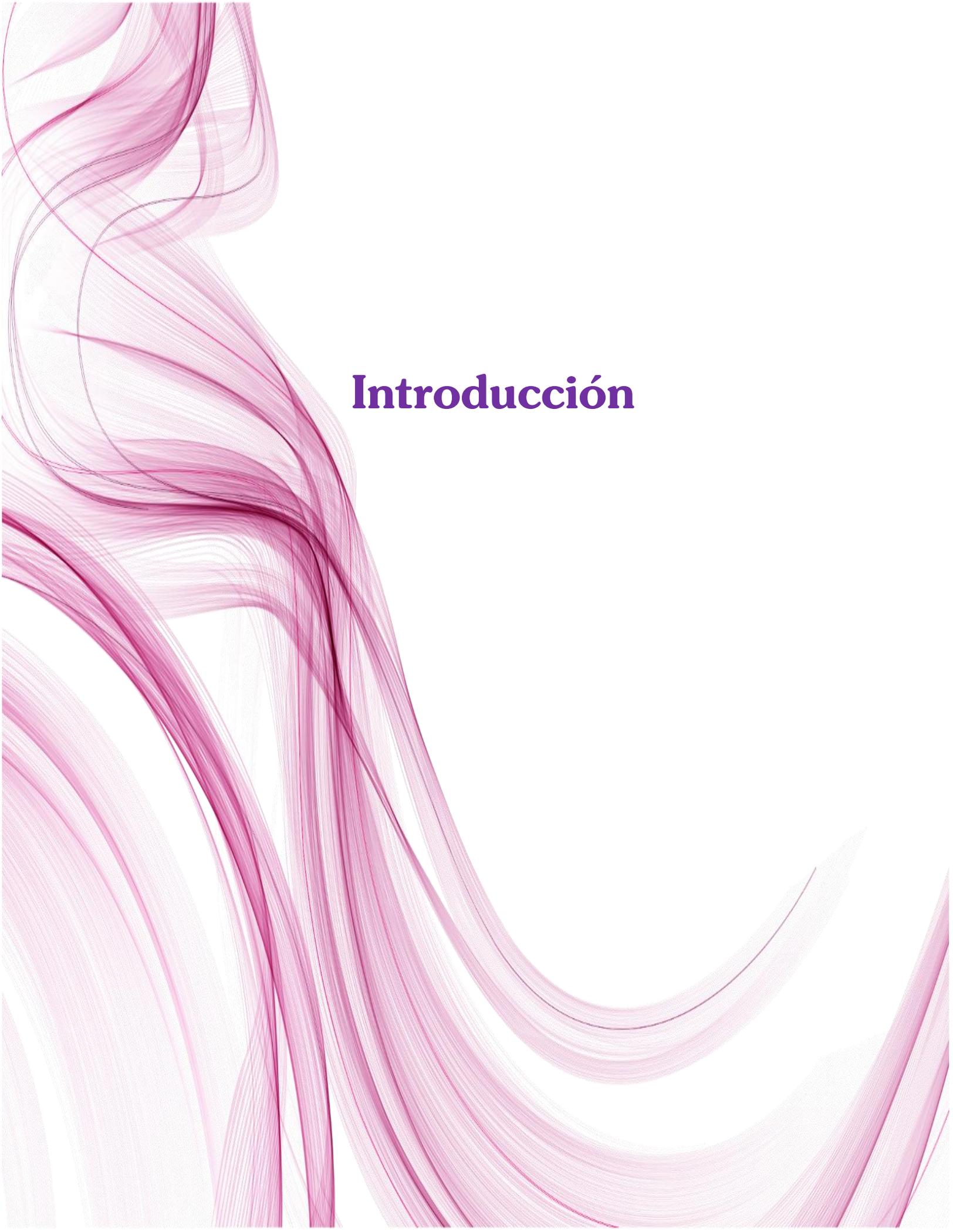
El sistema inmunológico es un importante modulador del aprendizaje y la memoria. Interleucina 1- β (IL-1 β) es una citocina pro-inflamatoria capaz de afectar numerosos procesos cognitivos. Se ha descrito que IL-1 β puede interferir específicamente memorias dependientes de hipocampo, estructura cerebral que expresa una alta densidad de receptores para la esta citocina. Tratamientos que elevan la concentración de IL-1 β a nivel central deterioran el proceso de consolidación de la memoria. Sin embargo, no se conoce el efecto de IL-1 β sobre la reconsolidación de la memoria. Por otra parte, las melanocortinas son consideradas como importantes neuromoduladores de los efectos de las citocinas. Principalmente la hormona alfa-melanocito estimulante (α -MSH) ejerce potentes acciones anti-inflamatorias, a través de la activación de receptores melanocortinérgicos (MC1-MC5). Los receptores MC3 y MC4 se expresan predominantemente en SNC y en particular, presentan alta densidad en hipocampo. Numerosas evidencias demuestran que α -MSH puede inhibir tanto la expresión como los efectos de las citocinas pro-inflamatorias en sistema nervioso central. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar el efecto de IL-1 β sobre la reconsolidación de una memoria de miedo contextual así como el posible rol modulador de α -MSH. Los resultados presentados demuestran que IL-1 β interfiere específicamente el proceso de reconsolidación de una memoria de miedo contextual actuando sobre el influjo de calcio y la liberación de glutamato. Además, la citocina genera una disminución en la fosforilación de ERK2 y la expresión de zif268, así como en la fosforilación, expresión en superficie y expresión total de la subunidad GluA1 del receptor AMPA durante la reconsolidación de la memoria. Los efectos observados pueden ser consecuencia de la activación del receptor para IL-1 β tipo I (IL-1RI) pre-sináptico, sin embargo no es posible descartar la participación de IL-1RI a nivel post-sináptico. Por otra parte, α -MSH actúa a nivel pre-sináptico a través del receptor MC3 revirtiendo el efecto de IL-1 β sobre la reconsolidación de la memoria a través de un mecanismo que involucra cambios en el influjo de calcio y en consecuencia la liberación de glutamato. Además, α -MSH actúa a nivel post-sináptico posiblemente mediante la activación del receptor MC4 revirtiendo la activación de ERK y disminución de zif268, y los efectos sobre la subunidad GluA1 del receptor AMPA.

Abstract

The immune system is an important modulator of learning, memory and neural plasticity. Interleukin 1 β (IL-1 β), a pro-inflammatory cytokine, significantly affects several cognitive processes. Treatments which raise the level of IL-1 β in the brain impair memory consolidation in contextual fear conditioning. However, the effect of IL-1 β on memory reconsolidation has not yet been established. The melanocortin α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) exerts potent anti-inflammatory actions by antagonizing the effect of proinflammatory cytokines. Five subtypes of melanocortin receptors (MC1R–MC5R) have been identified, of which MC3R and MC4R are predominant in the central nervous system. The present thesis show that the injection of IL-1 β (5 ng/0.25 μ l) in dorsal hippocampus up to 60 min after re-exposition to the context decreases freezing during the contextual fear test. Impairment of memory reconsolidation was reversed by treatment with α -MSH (0.05 μ g/0.25 μ l).

The mechanisms underlying the effect of IL-1 β on memory reconsolidation have not yet been established. Therefore, we examined the effect of IL-1 β on glutamate release, ERK phosphorylation and the activation of the transcription factor zinc finger-268 (zif268), phosphorylation of the GluA1 subunit of AMPA glutamatergic receptor at Serine 831 and 845, and also total and surface expression of GluA1 AMPA during reconsolidation. Our results demonstrated that IL-1 β induced a significant decrease of glutamate release after reactivation of the fear memory. Examination of the cytosolic Ca²⁺ revealed that the inhibition of glutamate release could be attributed to a reduction in voltage-dependent Ca²⁺ influx. IL-1 β also reduced ERK phosphorylation and zif268 expression in the hippocampus. Moreover, western blot analysis demonstrated that IL-1 β reduced the phosphorylation of GluA1 AMPA subunit at Serine 845 and 831. Besides, the cytokine reduced total and Surface expression of GluA1 AMPA. Central administration of α -MSH prevented the decrease in glutamate release, calcium influx, ERK phosphorylation, zif268 expression and over the phosphorylation, total and surface expression of GluA1 AMPA subunit induced by IL-1 β .

Our results establish possible mechanisms involved in the detrimental effect of IL-1 β on memory reconsolidation and also indicate that α -MSH may exert a beneficial modulatory role in preventing IL-1 β effects.



Introducción

I- Aprendizaje y memoria

Las memorias relacionadas a individuos, lugares, experiencias y emociones son extremadamente importantes para la supervivencia, bienestar y adaptación de organismos complejos (Tronson y Taylor, 2007). Se puede definir al aprendizaje como el proceso de adquisición de la información y a la memoria como la representación interna de un evento o experiencia (sensorial, emocional, conductual) que perdura en el tiempo y puede ser evocada (Maldonado, 2008).

Se distinguen básicamente dos tipos de aprendizaje: el asociativo y el no asociativo. El aprendizaje no asociativo consiste en un cambio en la conducta debido a la presencia de un estímulo, sin ser asociado a ningún otro. En cambio, aprendizajes que promueven la asociación entre estímulo y respuesta o entre dos estímulos, son conocidos como asociativos (Quilfeldt, 2006) y constituyen el principio básico del condicionamiento. El condicionamiento clásico o pavloviano (en honor a su creador Iván Pavlov) es uno de los más empleados en el estudio de la memoria. En este tipo de condicionamiento se establece la asociación entre un estímulo inicialmente neutro con un evento biológicamente relevante para el individuo (estímulo incondicionado, EI). El EI puede ser aversivo o apetitivo. Como resultado del aprendizaje, el estímulo neutro adquiere un significado emocional convirtiéndose en un estímulo condicionado (EC) que predice la ocurrencia del estímulo incondicionado y produce respuestas condicionadas.

El condicionamiento de miedo contextual es un paradigma ampliamente utilizado para el estudio de los mecanismos neurobiológicos implicados en el aprendizaje y la memoria emocional. Consiste en establecer la asociación entre un EC (contexto novedoso) y un EI (shock eléctrico) generando respuestas condicionadas similares a las respuestas innatas de miedo (Blanchard y Blanchard, 1989; Wilensky et al., 2000). En la formación de dicha memoria intervienen la amígdala (Dalglish, 2004) y el hipocampo (Besnard et al., 2013). El hipocampo participa en el procesamiento de la información espacial del entorno, es decir la integración de múltiples claves para generar una representación unificada del contexto (Holland y Bouton, 1999; Rudy y O'Reilly, 2001). La amígdala es una estructura fundamental en vincular estímulos externos y respuestas de defensa (Ledoux, 2002) y participa en el procesamiento de las emociones (LeDoux, 2000). En

el condicionamiento de miedo contextual, el hipocampo elabora una representación contextual (Phillips y LeDoux, 1992) y transmite esa información a la amígdala donde tiene lugar la convergencia de estímulos (Romanski et al., 1993) y se genera la respuesta de miedo (LeDoux, 2000).

Existen diversos tipos de memorias. Desde el punto de vista biológico podemos distinguir a la memoria declarativa o explícita de la no declarativa, implícita o de procedimientos. La memoria declarativa implica la recuperación consciente de la información relacionada a personas, cosas, eventos, lugares y experiencias; comprende, a su vez a la memoria semántica y a la episódica o autobiográfica (Tulving, 1972). La memoria de procedimientos o implícita involucra la evocación inconsciente de información para llevar a cabo tareas, como habilidades motoras (Lynch et al., 2004; Squire y Zola, 1996). Ambos tipos de memorias dependen de la integridad de diferentes estructuras cerebrales. El lóbulo temporal medial ha sido reconocido como una región cerebral esencial en la formación de memorias declarativas en humanos (Squire, 1992) y su equivalente en roedores, la memoria espacial o contextual (Eichenbaum, 2000; Wallenstein et al., 1998). Esta región comprende la formación hipocampal, el complejo amigdalino y áreas corticales adyacentes (corteza parahipocampal, entorrinal y perirrinal) (Scoville y Milner, 1957; Squire y Zola, 1996; Squire y Zola-Morgan, 1991). La formación hipocampal incluye hipocampo, subiculum y corteza entorrinal.

- **Hipocampo**

El hipocampo ha sido implicado en la formación de memorias visuales y espaciales (Smith y Milner, 1981) así como memorias episódicas (Burgess et al., 2002; Cohen, 2001) en humanos. En ratas y otros animales, el hipocampo es esencial en la formación de memorias espaciales y contextuales (Burgess et al., 2002).

El hipocampo es una estructura cerebral que se encuentra ubicada en la porción medial del lóbulo temporal y está conformado por dos capas celulares. Una capa está formada por los cuerpos de las células piramidales agrupados de forma densa en la estructura denominada Cornu Ammonis

(CA) y dividida en tres regiones principales CA1, CA2 y CA3 (Bear, 2001; Lombroso, 2009). La otra capa corresponde al giro dentado (GD), una banda de sustancia gris conformada por tres estratos: molecular, granular y polimórfico. El estrato granular es la más prominente y contiene células granulares, las principales neuronas excitatorias del giro dentado (Treves et al., 2008).

El circuito neuronal del hipocampo consiste de tres vías glutamatérgicas excitatorias principales (**Fig.1**). La primera es la vía perforante, que conduce información proveniente de áreas corticales y subcorticales a GD desde la corteza entorrinal. La segunda vía involucra a las células granulares de GD que proyectan a células piramidales de CA3 a través de las fibras musgosas. La última vía conecta a neuronas de CA3 con células piramidales de CA1 a través de las colaterales de Schaffer (Neves et al., 2008). Finalmente, la información proveniente de neuronas de CA1 retorna a estructuras corticales y subcorticales (Purves et al., 2012).

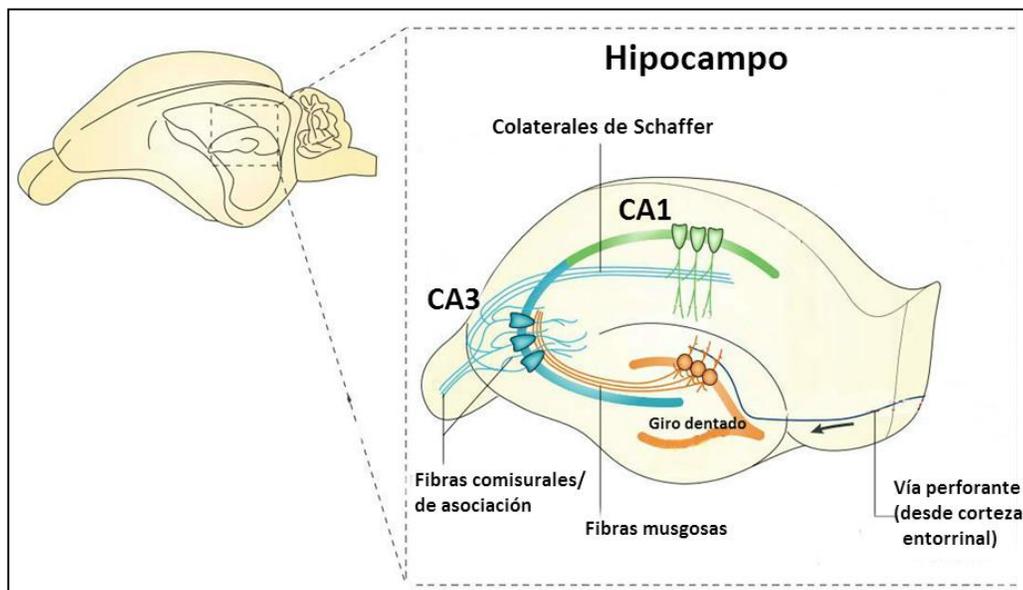


Figura 1. Estructura básica de hipocampo. Esquema de una sección de hipocampo de roedor que muestra los tres principales circuitos excitatorios. Figura adaptada de Neves et al., 2008.

- Plasticidad sináptica y potenciación a largo plazo

La plasticidad sináptica es una propiedad del sistema nervioso central (SNC) y se refiere a su capacidad de producir cambios funcionalmente relevantes en los circuitos sinápticos en respuesta a un estímulo (Benfenati, 2007). La formación de la memoria depende de la eficiencia de los cambios sinápticos que permitan mejorar la comunicación entre neuronas; en efecto, la plasticidad sináptica es tanto necesaria como suficiente para permitir el almacenamiento de la información (Lynch et al., 2004). La potenciación a largo plazo (LTP) es una forma de plasticidad sináptica y el modelo celular más ampliamente empleado para el estudio de la formación de la memoria (Cooke y Bliss, 2006).

El evento crítico en la inducción de la LTP es la liberación de glutamato y el consecuente influjo de Ca^{2+} (Ca^{2+}) que resulta de la estimulación de los receptores glutamatérgicos NMDA (N-metil-D-aspartato) (Lynch et al., 1983; Malenka et al., 1988). El incremento de Ca^{2+} a nivel post-sináptico activa proteínas quinasas, como la proteína calcio calmodulina quinasa (CaMKII). CaMKII junto a otras proteínas quinasas como proteína quinasa A (PKA) y la proteína quinasa activadas por señales extracelulares (ERK1/2) participan en la activación de factores de transcripción como la proteína de unión al elemento que responde a AMPc (CREB), la proteína β de unión al promotor CCAAT (C/EBP β) y la proteína con dominio para ETS (ELK1) (Alberini, 2009; Lynch et al., 2004). Los factores de transcripción inducen un incremento en la síntesis de proteínas, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), responsables de aumentar el número y tráfico de receptores, y los niveles de proteínas de andamiaje y del citoesqueleto (Derkach et al., 2007; Meis et al., 2012). En conjunto, estos cambios permiten la expresión en superficie, difusión lateral y estabilización de los receptores glutamatérgicos ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) (Derkach et al., 2007) necesarios para generar los cambios estructurales en el tipo y número de espinas (Shepherd y Huganir, 2007).

- Etapas de procesamiento y almacenamiento de la información

El proceso de formación y almacenamiento de la información es complejo y altamente dinámico. En el procesamiento de la información intervienen diferentes etapas, tales como adquisición, consolidación, evocación, reconsolidación o extinción de la memoria.

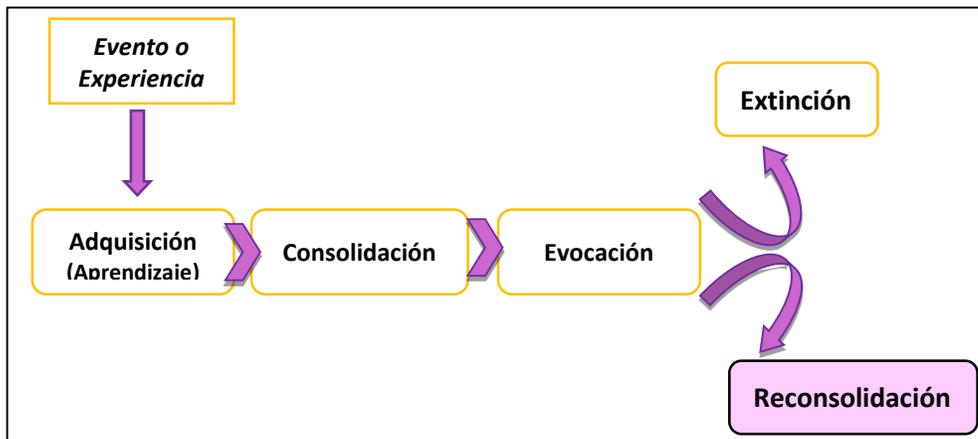


Figura 2. Etapas de procesamiento y almacenamiento de información.

La adquisición es el proceso mediante el cual se incorpora nueva información. El almacenamiento de la información adquirida requiere que la traza de memoria inicialmente lábil pase a una forma más estable mediante el proceso de consolidación (Abel y Lattal, 2001). La consolidación se define como un proceso activo dependiente de la síntesis de proteínas, limitado temporalmente, durante el cual ocurren cambios bioquímicos y estructurales para lograr el almacenamiento de la memoria (Nader et al., 2000; Wang et al., 2006; Wiltgen y Tanaka, 2013). La evocación de la información se refiere al recuerdo consciente o inconsciente de la experiencia aprendida, puede ser capaz de inducir una nueva etapa de labilización (desestabilización) de la memoria. La evocación puede inducir el proceso de reconsolidación, con el fin de estabilizar la memoria después del recuerdo (re-estabilización). El proceso de reconsolidación es un proceso activo, que tiene lugar dentro de una ventana temporal y también conduce a cambios bioquímicos y estructurales. Si bien se asemeja a la consolidación de la memoria, se diferencia en los sustratos bioquímicos, áreas anatómicas involucradas y/o conexiones entre áreas cerebrales (Barnes et al.,

2012; Lee et al., 2004; McKenzie y Eichenbaum, 2011). El proceso de reconsolidación permite actualizar la memoria luego del recuerdo, pudiendo inclusive modificarla (a través del fortalecimiento o deterioro). La evocación también puede inducir otro proceso denominado extinción. La extinción es un nuevo aprendizaje que suprime la respuesta inducida por la memoria original sin eliminarla (Abel y Lattal, 2001; Myers y Davis, 2002).

- Reconsolidación

La observación de que una memoria luego de ser reactivada es susceptible a la interrupción, incluso después de finalizada la ventana temporal de la consolidación, permitió dejar de lado las corrientes de pensamiento que apoyaban la idea de una memoria estable, permanente e invariable en el tiempo (Lewis et al., 1968; Przybyslawski y Sara, 1997). A esta observación, se sumaron numerosas evidencias conductuales y moleculares que ayudaron a establecer el concepto de reconsolidación de la memoria (Debiec et al., 2002; Dudai, 2006, 2004; Nader et al., 2000). El proceso de reconsolidación de la memoria ha sido ligado al mantenimiento, fortalecimiento o modificación de las memorias. El estudio de este proceso podría llegar a tener importantes aplicaciones en el tratamiento de numerosos desórdenes mentales, incluyendo las adicciones y desórdenes de ansiedad como el estrés post traumático (Rubin y Franks, 1968; Schwabe et al., 2014).

La reconsolidación de la memoria ha sido observado en diferentes protocolos experimentales, que incluyen vertebrados e invertebrados, aprendizajes simples y complejos, y condicionamientos de tipo apetitivo y aversivo (Dudai, 2006; Tronson y Taylor, 2007).

Para demostrar experimentalmente la reconsolidación, o el rol de una molécula en particular en la reconsolidación, primero la memoria debe consolidarse, luego reactivarse (por medio de la re-exposición a la información adquirida durante el aprendizaje) de forma simultánea con algún tipo de manipulación. Por último, podría observarse la modificación de la memoria (Tronson y Taylor, 2007). Resulta importante destacar que la reactivación de la memoria debe ser capaz de iniciar

la evocación-labilización para que se pueda hablar de reconsolidación de la memoria (Sevenster et al., 2012). La reconsolidación de la memoria depende de factores limitantes como la edad de la memoria, el tiempo que transcurre desde el aprendizaje inicial (Eisenberg y Dudai, 2004; Frankland et al., 2006; Milekic y Alberini, 2002); fuerza de la memoria (intensidad del aprendizaje) (Eisenberg y Dudai, 2004; Suzuki et al., 2004); y duración de la reactivación de la memoria (Bustos et al., 2009; Pedreira y Maldonado, 2003; Tronson y Taylor, 2007). Memorias remotas o antiguas y entrenamientos de mayor intensidad generan memorias más estables y menos susceptibles a la labilización-reconsolidación inclusive empleando sesiones de reactivación prolongadas. Existe otro factor a tener en cuenta para que ocurra la reconsolidación de la memoria: la incorporación de nueva información durante la reactivación de la memoria (Forcato et al., 2010, 2009; Pedreira et al., 2004). La discrepancia entre lo que se espera (basado en un aprendizaje previo) y lo que se experimenta (durante la reactivación) es lo que iniciaría el proceso de reconsolidación con el objetivo de incorporar nueva información (Pedreira et al., 2004). Si la reactivación por si misma fuera suficiente para labilizar una traza de memoria, la memoria sería demasiado maleable. De modo que, incorporar nueva información durante la reactivación tendría un propósito funcional y adaptativo (Sevenster et al., 2012).

-Mecanismos moleculares implicados en el proceso de reconsolidación de la memoria

Numerosas evidencias indican que la transmisión adrenérgica y glutamatérgica son fundamentales en la señalización intracelular responsable del proceso de reconsolidación de la memoria. Los receptores β -adrenérgicos (β -AR) se encuentran acoplados a proteína G y generan un incremento en los niveles de AMPc/PKA. El bloqueo de los receptores β -AR afecta la reconsolidación de memorias contextuales y auditivas de miedo, espaciales y de adicción a drogas (Bernardi et al., 2006; Debiec et al., 2004; Murchison et al., 2004; Rouillet y Sara) Glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante del SNC y ha sido ampliamente ligado a procesos plásticos. La señalización glutamatérgica a través de los receptores NMDA y AMPA es necesaria para la evocación y reconsolidación de la memoria (Pedreira et al., 2002;

Suzuki et al., 2004). NMDA (N-metil-D-aspartato) es un receptor ionotrópico para glutamato, existe como tetrámero conformado por dos subunidades GluN1 y dos subunidades GluN2. GluN2 presenta cuatro tipos diferentes de unidades (GluN2A-D), de las cuales GluN2A y GluN2B han sido las más estudiadas (Ivanov et al., 2006; Kim et al., 2005; Zhang et al., 2008). Se ha observado que el tratamiento con antagonistas NMDA (MK-801, CPP y APV) afecta la reconsolidación de memorias de miedo contextuales, olfativas, espaciales y de adicción a drogas (Barreiro et al., 2013; Milton y Everitt, 2010; Przybyslawski y Sara, 1997; Suzuki et al., 2004; Torras-Garcia et al., 2005). Por otro lado, el tratamiento con D-cicloserina (DCS) un agonista parcial NMDA potencia la reconsolidación de una memoria de miedo (Lee et al., 2006). La activación de NMDA produce un incremento en los niveles de calcio intracelular (Martin et al., 2000) que conducen a la activación de numerosas proteínas, algunas de las cuales cumplen un rol importante en el tráfico de los receptores AMPA. El tráfico de receptores AMPA es uno de los mecanismos que contribuye a la plasticidad sináptica; involucra la inserción del receptor en la membrana post-sináptica y su internalización (Malinow y Malenka, 2002). AMPA también es un receptor ionotrópico para glutamato, presenta estructura tetramérica y se compone de las subunidades GluA1-GluA4. Las principales conformaciones del receptor AMPA (AMPA) en hipocampo incluyen heterómeros de GluA1/2 y GluA2/3, así como homómeros GluA1 (Lu et al., 2009). Ha sido demostrado que la fosforilación de las subunidades del receptor AMPA en los extremos carboxilo terminales (C-terminales) tiene un rol esencial en el tráfico del receptor hacia la membrana post-sináptica (Shepherd y Huganir, 2007). En particular, ha sido estudiado el tráfico de los receptores AMPA como mecanismo fundamental en el remodelado sináptico dentro del proceso de reconsolidación de la memoria (Rao-rui et al., 2011). El tráfico de receptores se acompaña de cambios estructurales en el tipo y número de espinas dendríticas. Para que tengan lugar estas modificaciones morfológicas se requiere la síntesis proteica ligada al incremento en los factores de transcripción. Entre los factores de transcripción involucrados en la reconsolidación de la memoria se encuentran CREB, elk1 y zif268 (Kida et al., 2002; Lee et al., 2004; Miller y Marshall, 2005). El factor de transcripción dedos de zinc también denominado zif268, krox24 o egr-1 proviene del gen de expresión temprana ZIF268, y su expresión se encuentra ligada a procesos plásticos, tales como la reconsolidación de la memoria. Numerosas publicaciones describen la

importancia de este factor en la reconsolidación de memorias de reconocimiento de objetos (Bozon et al., 2003), de miedo contextual (Hall et al., 2001; Lee et al., 2004) y auditivo (Thomas et al., 2002) entre los paradigmas más estudiados.

Las proteínas quinasas son enzimas responsables de fosforilar a los factores de transcripción. En la reconsolidación de la memoria se destacan ERK1/2 y PKA. Las proteínas ERK1/2 forman parte de la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). ERK cataliza la fosforilación de diversos factores de transcripción y para ello requiere ser translocada al núcleo. Debido a su rol en la transcripción génica ha sido ampliamente estudiada y ligada a eventos plásticos como la reconsolidación de memorias contextuales de miedo (Chen et al., 2005) entre otras memorias (Duvarci et al., 2005; Kelly et al., 2003; Valjent et al., 2006). La proteína quinasa activada por AMPc o PKA ejerce su acción en procesos plásticos de diversas maneras (Kandel, 2012; Schafe et al., 2000). En el proceso de reconsolidación, PKA interviene en la activación del factor CREB de manera directa o indirecta (a través de ERK) regulando de esta manera la síntesis de nuevas proteínas; además cumple un rol esencial en el tráfico de receptores AMPA (Esteban et al., 2003; Tronson et al., 2006).

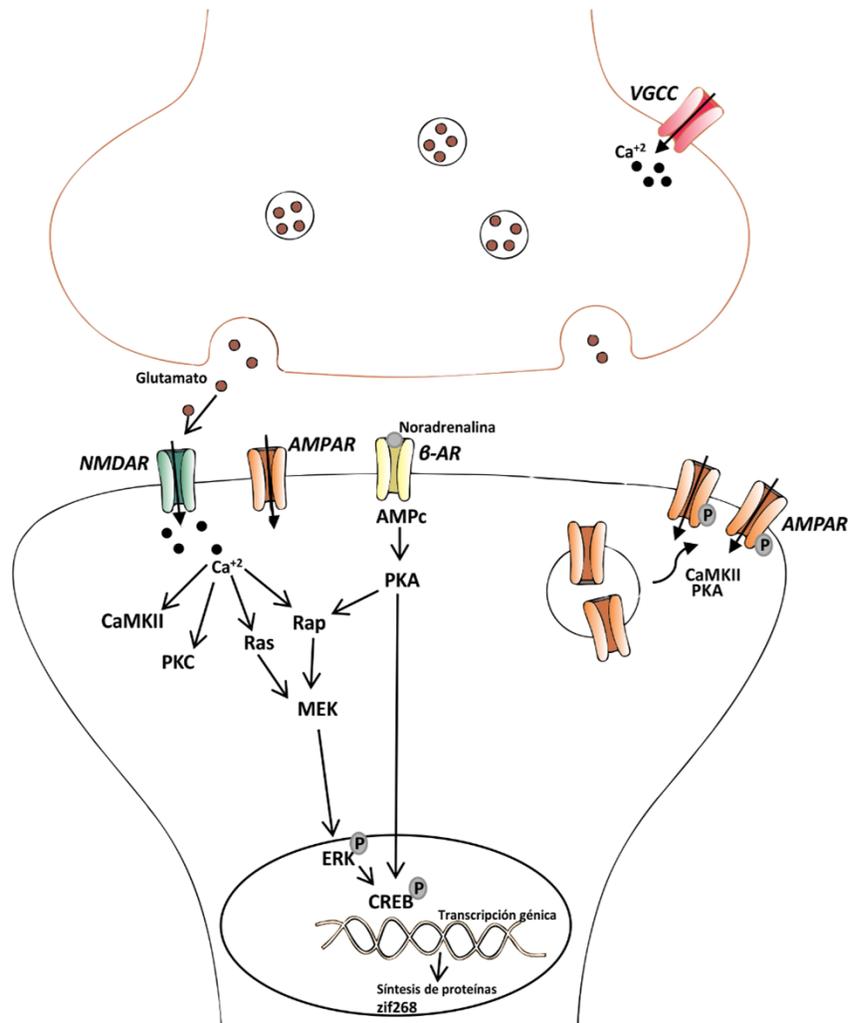


Figura 3. Mecanismos moleculares involucrados en la reconsolidación de la memoria.

Abreviaturas: VGCC, canales de calcio voltaje dependientes; Ca^{2+} , calcio; NMDAR, receptor NMDA; AMPAR, receptor AMPA; AMPc, adenosín monofosfato cíclico; PKA, proteína quinasa A; PKC, proteína quinasa C; CaMKII, proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina II; Ras y Rap GTPasas de pequeño tamaño; MEK, quinasa regulada por señales extracelulares; CREB, proteína de unión al elemento que responde a AMPc; zif268, factor de transcripción dedos de zinc. Figura adaptada de Caruso et al., 2014.

II- Modulación inmunológica de los procesos de memoria

El sistema inmunológico (SI) es una organización de células y moléculas con roles especializados en la defensa del organismo. Durante un proceso infeccioso, células del SI se activan y responden con la liberación de mediadores inflamatorios. Los principales factores reguladores de la respuesta inmune son las citocinas, proteínas con actividad anti-inflamatoria o pro-inflamatoria, que cumplen un rol crucial en la comunicación entre el SI y el SNC. Las citocinas liberadas en la circulación sistémica pueden actuar sobre el SNC a través de una vía neural, que no requiere el pasaje de las mismas a través de la barrera hemato-encefálica (BHE), mediante la estimulación de fibras aferentes periféricas como el nervio vago (Dantzer et al., 2008; Romeo et al., 2001). Además, las citocinas pueden atravesar la BHE por transportadores especiales (Banks et al., 1991) o ingresar al SNC por los órganos circunventriculares, carentes de barrera. Algunos procesos inflamatorios pueden ocasionar pérdida de la integridad de la BHE y permitir el ingreso de las citocinas (Turnbull y Rivier, 1999). Por otra parte, las citocinas también pueden ser sintetizadas en el SNC, por neuronas y células de la glía (Borovikova et al., 2000). Si bien la expresión constitutiva es baja, puede aumentar en respuesta a infección, trauma y diversas enfermedades (Ross et al., 2003).

El SI es capaz de modular numerosas funciones del sistema nervioso. Entre ellas se encuentran los procesos cognitivos, como el aprendizaje y la memoria. En condiciones fisiológicas, mediadores de la respuesta inmune regulan positivamente el remodelado de circuitos neuronales promoviendo la LTP en hipocampo (Balschun et al., 2003; Schneider et al., 1998) y el proceso de consolidación de la memoria (Gibertini, 1998; Goshen et al., 2007; Song et al., 2003). Estos efectos del SI son mediados por interacciones complejas entre células que participan en la respuesta inmune en el SNC, células inmunes periféricas y células progenitoras neurales. De esas interacciones resulta la liberación de neurotransmisores, hormonas, bajos niveles (niveles basales) de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF α , al igual que otros mediadores como prostaglandinas y neurotrofinas (Goshen y Yirmiya, 2007). Por otro lado, en condiciones en que el SI se encuentra fuertemente activado por infección o injuria, así como por condiciones

estresantes crónicas o severas, las células de la glía cambian su morfología y funcionamiento secretando niveles elevados de citocinas pro-inflamatorias y prostaglandinas. En estas condiciones tiene lugar la denominada conducta de enfermedad o “*sickness behavior*” (Dantzer et al., 1999). La conducta de enfermedad es un mecanismo inducido por citocinas pro-inflamatorias (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α e IL-6) y caracterizada por cambios metabólicos, neuroendocrinos y comportamentales, tales como anhedonia, anorexia, somnolencia, depresión de la actividad locomotora, disminución de la interacción social y sexual, así como deterioro de funciones cognitivas como aprendizaje y memoria (Dantzer y Kelley, 2007; Dantzer et al., 2008). Este proceso es el resultado de un estado motivacional tendiente a reorganizar las prioridades del organismo para enfrentar la infección (Dantzer et al., 1999).

En humanos, enfermedades infecciosas agudas y crónicas (Abu Faddan et al., 2015; Selnes et al., 2003; Shapira-Lichter et al., 2008), depresión (Young et al., 2014), demencia (Stefaniak y O’Brien, 2015) y enfermedades neurodegenerativas (Cacquevel et al., 2004; Nagatsu y Sawada, 2005) presentan niveles elevados de citocinas en SNC y se asocian con una variedad de déficits cognitivos. Por esta razón, han sido empleados modelos de inflamación en animales para evaluar el rol del SI en el déficit de la memoria. Numerosos trabajos se han concentrado en el estudio de una citocina en particular, IL-1 β , por tratarse de la citocina pro-inflamatoria prototípica además de haber sido correlacionada de manera directa con los déficits cognitivos observados en la vejez, la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y demencia asociada al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Plata-Salamán y Turrin, 1999; Tyor et al., 1992).

- **Vías de señalización de IL-1 β en el sistema nervioso central**

La familia de IL-1 produce distintos efectos a nivel central. Las citocinas IL-1 median las respuestas defensivas ante una enfermedad sistémica, injuria, así como neuroinflamación y muerte celular en condiciones neurodegenerativas (Thornton et al., 2006). Han sido implicadas en enfermedades degenerativas crónicas, en particular, Esclerosis Múltiple, Enfermedad de Parkinson y de Alzheimer. En el SNC, son producidas en poblaciones celulares particulares como

neuronas piramidales de hipocampo (Ericsson et al., 1995), células endoteliales, y células de la glía (Blasi et al., 1999; Dinarello, 1996; Zhang et al., 1998) particularmente después de una injuria (Friedman, 2001).

La familia de IL-1 comprende once elementos (Dinarello, 2009; Garlanda et al., 2013). Entre los ligandos se destacan tres de naturaleza glicoproteica: IL-1 α , IL-1 β y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra). Los tres ligandos se forman como precursores, de los cuales pro-IL-1 α y pro-IL-1ra son biológicamente activos, mientras que pro-IL-1 β requiere ser clivado por la enzima caspasa 1 o enzima convertidora de IL-1 β para ser activo (Thornberry et al., 1992). IL-1 β , a menudo referida como la citoquina pro-inflamatoria típica de la familia, es la principal forma secretada (Rothwell y Luheshi, 1994) mientras que IL-1 α permanece esencialmente unida a la membrana celular (Schöbitz et al., 1994). No obstante, IL-1 α e IL-1 β ejercen efectos biológicos idénticos mientras que el IL-1ra es un antagonista altamente selectivo y competitivo que funciona como un inhibidor endógeno de las acciones de IL-1 (Eisenberg et al., 1990; Hannum et al., 1990). Los tres ligandos se unen a dos tipos de receptores de IL-1 denominados tipo I (IL-1RI) y tipo II (IL-1RII). Estos receptores son glicoproteínas que presentan típicamente dominios extracelulares del tipo de las inmunoglobulinas y un dominio Toll citoplasmático que es crítico para la activación de las vías de señalización intracelulares. Los agonistas, IL-1 α e IL-1 β , producen sus efectos biológicos mediante la unión al receptor IL-1RI (Friedman, 2001; O'Neill y Dinarello, 2000), el cual requiere de la asociación con una proteína accesoria (AcP) para la transducción de la señal (Sims, 2002). Recientemente, se identificó una isoforma de la AcP denominada AcPb que se expresa exclusivamente en SNC (Smith et al., 2009).

La vía clásica de señalización de IL-1 β involucra la activación de IL-1RI-AcP y reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88 por el dominio intracelular del receptor. A su vez, quinasas serina-treonina asociadas a IL-1RI (IRAK I y II) se asocian a AcP y llevan a la activación de proteínas como TRAF6 (Cao et al., 1996). La cascada de eventos que resulta de la activación IL-1RI-AcP involucra proteínas de señalización como las quinasas activadas por mitógenos (MAPK): c-Jun N-terminal (JNK), p38 y ERK1/2 o p42/p44 (Dunne y O'Neill, 2003). Además se estimula la translocación al núcleo del factor nuclear κ B (NF- κ B) a través de la fosforilación y la degradación de su inhibidor, I κ B. La expresión de factores de transcripción como NF- κ B (subunidades p65 y p50) y AP-1

controlan la expresión de mediadores inflamatorios. Por otro lado, la unión de IL-1ra al IL-1RI impide la asociación con la AcP bloqueando de esta forma la activación del receptor (Greenfeder et al., 1995). La unión de ligandos al receptor IL-1RII funciona como un mecanismo de regulación negativa (Sims y Smith, 2010).

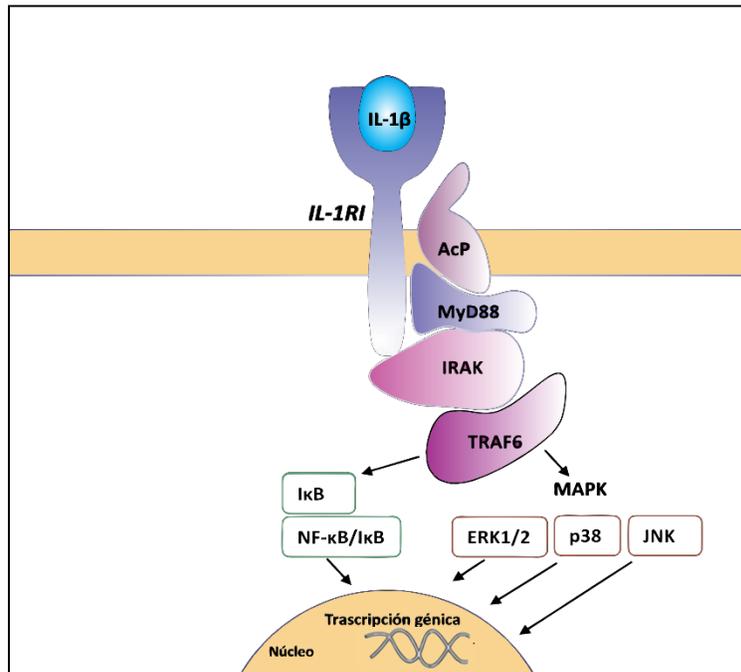


Figura 4. Vías de señalización activadas por IL-1β a través del receptor IL-1RI.

Abreviaturas: AcP, proteína accesoria del IL-1RI; IRAK, quinasa asociada al IL-1RI; TRAF6, factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral; IKK, quinasa de I-κB; NF-κB, factor nuclear- κB; MAPK, proteína quinasa activada por mitógenos; ERK1/2, quinasa regulada por señales extracelulares; JNK, quinasa amino terminal c-jun. Figura adaptada de Rothwell y Luheshi (Rothwell y Luheshi, 2000).

Las vías de señalización de IL-1β a nivel central difieren en neuronas y células gliales (Friedman, 2001; Srinivasan et al., 2004). Entre las vías mejor caracterizadas se encuentran la activación de MAPK p38 y NF-κB en astrocitos hipocampales (Huang et al., 2011). NF-κB se expresa de forma constitutiva en algunas poblaciones neuronales, incluyendo neuronas de hipocampo (Kaltschmidt y Kaltschmidt, 2009). Sin embargo, no se observa activación de NF-κB en respuesta al tratamiento con IL-1β en neuronas hipocampales que expresan el receptor IL-1RI (Srinivasan et al., 2004). Por otro lado, la activación de MAPK p38 por IL-1β conduce a la activación del factor

CREB en neuronas hipocampales (Shaywitz y Greenberg, 1999). CREB es un factor involucrado en regular la expresión de genes durante la LTP y otros procesos de memoria en hipocampo (Frank y Greenberg, 1994; Segal y Murphy, 1998).

- Efecto de IL-1 β sobre procesos de memoria

El rol de IL-1 β en procesos de memoria ha sido ampliamente estudiado. Dependiendo de las concentraciones de IL-1 β a nivel central podemos hablar de un efecto negativo sobre procesos de aprendizaje y memoria, o de un requerimiento esencial para el normal funcionamiento de la memoria (Goshen y Yirmiya, 2007).

Numerosos estudios han demostrado el rol de IL-1 β en la formación de memorias dependientes de hipocampo (Goshen y Yirmiya, 2007). En condiciones fisiológicas tanto la LTP (Avital et al., 2003; del Rey et al., 2013) como el condicionamiento de miedo contextual inducen un incremento en la expresión de IL-1 β (Goshen et al., 2007). El tratamiento con antagonistas del receptor IL-1RI afecta la inducción y el mantenimiento de la LTP (Schneider et al., 1998), así como la consolidación de memorias contextuales de miedo, memorias espaciales y memorias de evitación inhibitoria (Depino et al., 2004; Ross et al., 2003). Recientemente, el trabajo de Barnes et al. (Barnes et al., 2012) comprobó, mediante la administración de un antagonista que el receptor para IL-1 media la señalización necesaria para el proceso de reconsolidación de la memoria en hipocampo, específicamente en memorias de miedo contextual. Estos antecedentes indican que IL-1 β cumple un rol esencial en los procesos de aprendizaje y memoria dependientes de hipocampo en condiciones fisiológicas.

Por el contrario, concentraciones elevadas de IL-1 β deterioran la memoria. IL-1 β inhibe la LTP en CA1, CA3 y GD, y el tratamiento con IL-1Ra atenúa el efecto inhibitorio de la citocina sobre este proceso (Cunningham et al., 1996; Lynch, 1998). La administración sistémica o central de la citocina es capaz de deteriorar memorias dependientes de hipocampo (Oitzl et al., 1993) tales como memorias espaciales y contextuales (Gibertini, 1998; Pugh et al., 1999). La administración intracerebroventricular (i.c.v.) o en hipocampo de IL-1 β produce un deterioro de la consolidación

de una memoria de miedo contextual (Barrientos et al., 2004; Gonzalez et al., 2009). Sin embargo, el tratamiento con IL-1 β no afecta memorias independientes de hipocampo (Brennan et al., 2004; Oitzl et al., 1993). Así, la administración i.c.v. de IL-1 β no afecta el condicionamiento de miedo asociado a claves auditivas (Pugh et al., 2001, 1999). Barrientos et al. (Barrientos et al., 2002) realizó una modificación del condicionamiento de miedo contextual clásico con el fin de disociar el efecto de la citocina. En el paradigma empleado, un día antes del entrenamiento se realizó una breve pre-exposición al contexto con el fin de facilitar la representación contextual, dependiente de hipocampo y evaluar el efecto de IL-1 β sobre dicha representación. La administración de IL-1 β en hipocampo después de la pre-exposición produjo una disminución en la respuesta de congelamiento durante el test. Este resultado sugiere que el efecto de IL-1 β sobre el condicionamiento de miedo contextual es causado por una interferencia en la formación de la representación del contexto en el hipocampo (Goshen y Yirmiya, 2007).

El efecto de IL-1 β sobre otras etapas de la memoria ha sido menos estudiado. Se observó un deterioro en el proceso de reconsolidación de una memoria de miedo contextual luego de la administración periférica de LPS inmediatamente después de la reactivación de la memoria. La administración de LPS genera un aumento en los niveles de IL-1 β indicando que esta citocina podría estar mediando dicho efecto (Kranjac et al., 2012).

Los antecedentes descriptos sugieren que la influencia de IL-1 β sobre la memoria sigue el patrón de U invertida, ya que niveles basales son necesarios para el aprendizaje y la memoria. Sin embargo, cualquier desviación del rango fisiológico, ya sea por un incremento de IL-1 β (desafío inmune, físico o psicológico) o bloqueo de la señalización de IL-1 β resultan en un deterioro de la memoria (Goshen y Yirmiya, 2007).

- **Mecanismos involucrados en el efecto de IL-1 β sobre la memoria**

La liberación de glutamato es un mecanismo fundamental en los procesos de memoria. Se observó que el tratamiento con IL-1 β impide la LTP en hipocampo mediante la inhibición de los niveles de liberación de glutamato inducidos por KCl (Kelly et al., 2003). Además, el efecto sobre la LTP fue correlacionado con una reducción en las corrientes de Ca²⁺ dependientes de voltaje

(Cunningham et al., 1996; Plata-Salamán y Ffrench-Mullen, 1992). Adicionalmente, se demostró que el efecto sobre la LTP se correlaciona con un incremento en la actividad de las proteínas quinasas activadas por estrés p38 y JNK (Vereker et al., 2000; Kelly et al., 2003). La co-administración de IL-1 β con un inhibidor de p38 (SB203580) atenúa el deterioro observado sobre la potenciación a largo plazo y restablece los niveles de liberación de glutamato inducidos por KCl (Kelly et al., 2003).

IL-1 β deteriora el proceso de consolidación de una memoria de miedo contextual mediante la inhibición de la liberación de glutamato en sinaptosomas en hipocampo en forma dependiente de MAPK p38. La administración de SB203580 revierte el efecto de IL-1 β sobre la respuesta de miedo condicionado y sobre la liberación de glutamato (Gonzalez et al., 2013). Adicionalmente los efectos de IL-1 β sobre la memoria podrían estar mediados por una disminución de los niveles de BDNF. Se observó que la administración en hipocampo de IL-1 β disminuye el incremento en BDNF producido por el condicionamiento de miedo contextual (Barrientos et al., 2004; Gonzalez et al., 2013).

III- Melanocortinas

- Sistema melanocortinérgico

El sistema melanocortinérgico forma parte de un sistema modulador ancestral que fue detectado de manera temprana en la evolución, convertido en blanco de estudio debido a su participación en el metabolismo energético, en funciones anti-inflamatorias y modulación de procesos plásticos. Este sistema ha sido detectado en hipotálamo, núcleo del tracto solitario, hipófisis y en la periferia incluyendo al SI, bazo, pulmones y sistema gastrointestinal (Wikberg et al., 2000). Debido a su amplia distribución, las melanocortinas son capaces de influenciar funciones endócrinas, autónomas, comportamentales e inmunológicas (Bertolini et al., 2009). Este sistema consta de péptidos melanocortinérgicos o melanocortinas (MCs): hormonas melanocito estimulantes alfa, beta y gama (α -MSH, β -MSH y γ -MSH) y la hormona adrenocorticotrófica (ACTH); una familia de cinco receptores transmembrana acoplados a proteína G y antagonistas melanocortinérgicos endógenos: agouti y proteína relacionada al gen agouti (AgRP). El péptido pro-opiomelanocortina (POMC) es el precursor de las MCs (Catania, 2010). Modificaciones post-traduccionales de la POMC debidas a clivajes proteolíticos generan varios péptidos biológicamente activos entre los que se encuentran las MCs, la hormona β -lipotropina (β -LPH) y las β -endorfinas. La POMC genera los diferentes péptidos de manera específica para cada tejido y como resultado de la acción de dos enzimas proteolíticas: pro-conwertasa 1 y 2. α -MSH es un péptido formado por 13 aminoácidos, contenidos dentro de la región N-terminal de ACTH. α -MSH posee, además, una amidación en el sitio carboxilo terminal (C-terminal) y una acetilación en el extremo amino terminal (N-terminal). Todas las MCs comparten una secuencia de cuatro aminoácidos, His-Phe-Arg-Trp, además α -MSH, β -MSH y ACTH comparten un hexapéptido formado por Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly, que está relacionado a los efectos melanogénicos de las MCs (Abdel-Malek, 2001).

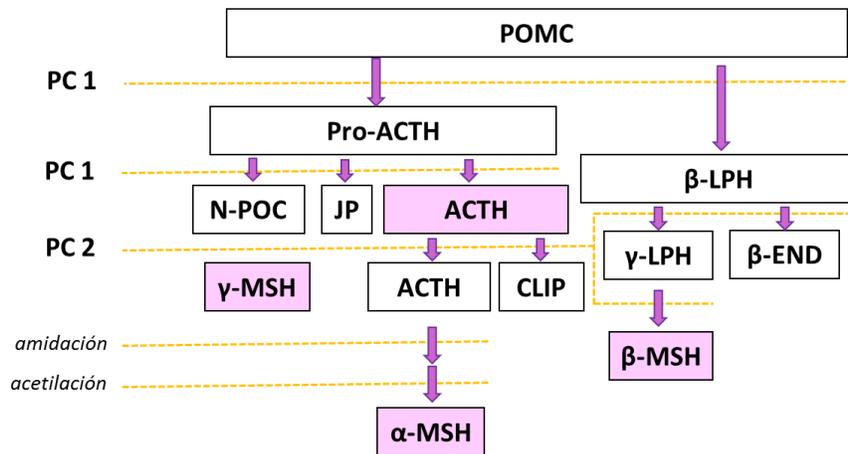


Figura 5. Esquema del procesamiento de la POMC. Imagen adaptada de Getting et al., 2006. Abreviaturas: POMC, pro-opiomelanocortina; ACTH, hormona adrenocorticotrópica; β -LPH, β -lipotropina; γ -LPH, γ -lipotropina; β -END, β -endorfina; α -MSH, β -MSH y γ -MSH, hormona melanocito estimulante α , β , y γ ; N-POC, péptido N terminal; CLIP, péptido del lóbulo intermedio semejante a la corticotropina; JP, péptido de unión; CPE, carboxipeptidasa.

Los efectos de las MCs son mediados por la activación de una familia de receptores melanocortinérgicos (MCR). Se han identificado cinco receptores hasta el momento MC1-5R (Wikberg et al., 2000). Cada receptor es el producto de un gen diferente y colectivamente constituyen una familia de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteína G. Todos los MCR están funcionalmente acoplados a adenilato ciclasa y sus efectos son mediados por la activación de la vía de señalización dependiente de AMPc. Cada receptor se diferencia del resto debido a su distribución en el organismo y la diferente afinidad que presentan tanto para las MCs como para los antagonistas (Abdel-Malek, 2001).

El receptor MC1 tiene gran afinidad por α -MSH y se expresa en una amplia gama de células como las de la piel, inmunes, glía y endotelio (Böhm et al., 1999a, 1999b). La activación del receptor está ligada a la melanogénesis o síntesis de melanina, regulación de la fisiología de la piel (Hunt et al., 1994) así como inmunomodulación periférica durante la inflamación (Getting, 2002). El receptor MC2 tiene afinidad preferencial por ACTH y se expresa predominantemente en corteza adrenal. La activación del receptor resulta en la secreción de esteroides adrenales con un rol predominante en el estrés. El receptor MC3 responde con mayor afinidad a γ -MSH y ACTH pero también a α -MSH, se expresa en el SNC, principalmente en el hipotálamo, la corteza, el

hipocampo y el tálamo (Cone, 2006; Lasaga et al., 2008), pero también en estómago, duodeno, placenta, corazón y monocitos (Leoni et al., 2008). La activación de este receptor además de incrementar los niveles de AMPc, induce una señalización dependiente de IP_3/Ca^{2+} luego del tratamiento con ACTH y α -MSH en células HEPA transfectadas con el receptor MC3 y tratadas con ACTH y α -MSH (Konda et al., 1994). Las funciones relacionadas al receptor incluyen respuestas anti-inflamatorias (Getting y Perretti, 2000), regulación de la ingesta y del metabolismo energético (Chen et al., 2000). El receptor MC4 tiene mayor afinidad por α -MSH y se expresa en SNC en la corteza, el tálamo, el hipocampo, el hipotálamo, el tronco encefálico y la médula espinal (Cone, 2006). Su actividad se relaciona con cambios neuroendócrinos relacionados con la ingesta, la memoria y respuestas anti-inflamatorias (Caruso et al., 2014). El receptor MC5 se encuentra en un gran número de tejidos periféricos, y posee gran afinidad para α -MSH y ACTH. Sus funciones predominantes son la regulación de glándulas exócrinas y el control de la secreción de sebo (Eves y Haycock, 2010).

- Rol de α -MSH en la modulación de respuestas anti-inflamatorias centrales

La hormona α -MSH es un neuropéptido de bajo peso molecular capaz de atravesar la BHE y un potente modulador de respuestas inmunológicas y anti-inflamatorias centrales (Brzoska et al., 2010; Luger y Brzoska, 2007).

La administración i.c.v. de α -MSH suprime la fiebre inducida por endotoxinas (polisacáridos de la superficie de las bacterias que producen activación inmunológica y reacción inflamatoria) (Martin y Lipton, 1990), las proteínas del virus V.I.H (Catania y Lipton, 1993) y las citocinas pro-inflamatorias IL-1 (Opp et al., 1988). La endotoxemia genera un aumento en los niveles séricos de α -MSH (Martin y Lipton, 1990). Además, α -MSH ejerce un efecto anti-inflamatorio a través de la inhibición en la síntesis y acción de citocinas pro-inflamatorias como IL- 1β (Delgado et al., 1998; Lipton et al., 1994) y, por otro lado, estimula la producción de citocinas anti-inflamatorias al unirse a MCR en SNC (Luger y Brzoska, 2007; Luger et al., 2003). Adicionalmente, la infusión i.c.v.

de α -MSH en ratas inhibe los efectos de IL-1 β sobre la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y respuestas inmunológicas como la supresión de la respuesta inmune celular y la inflamación a nivel periférico (Cragolini et al., 2004; Weiss et al., 1991).

α -MSH es capaz de afectar vías de señalización implicadas en la regulación de la respuesta inflamatoria, tales como la activación del factor NF- κ B, expresión de moléculas de adhesión y de receptores de quimiocinas (Luger y Brzoska, 2007). NF- κ B es un factor de transcripción esencial para la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α (Kunsch et al., 1994; Libermann y Baltimore, 1990; Roulston et al., 1995). α -MSH inhibe la activación de NF- κ B y la degradación de la proteína I κ B α , proteína que retiene NF- κ B en el citoplasma evitando que actúe a nivel nuclear, en diferentes líneas celulares (Manna y Aggarwal, 1998). Además se observó inhibición de la activación de NF- κ B en un modelo de inflamación periférica aguda en ratones luego de la administración central de α -MSH (Ichiyama et al., 1999).

Los principales efectos anti-inflamatorios a nivel central estarían mediados por los receptores MC3 y MC4 (Lasaga et al., 2008). La vía de señalización predominante involucra adenilatociclasa/AMPC. Existe una vía adicional a través de segundos mensajeros, con incremento de Ca²⁺ intracelular luego de la activación del receptor MC3 (Konda et al., 1994). Otras vías de señalización incluyen la fosforilación de la vía MAPK/ERK, ligada a la atenuación en la fosforilación de MAPK p38 y disminución de la quinasa activada por estrés, JNK. La activación de AMPC por el receptor MC4, también conduce a la atenuación en los niveles de p38 y JNK, dando por resultado una disminución en la producción de TNF- α e inhibición de NF- κ B (Eves y Haycock, 2010).

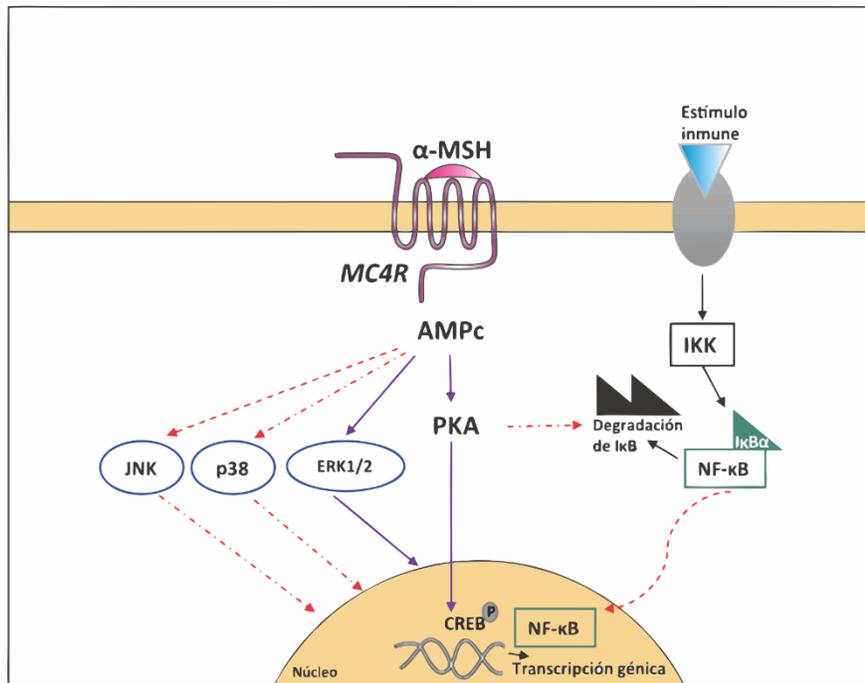


Figura 6. Vías de señalización implicadas en los efectos de las MC en la modulación de la respuesta inflamatoria en SNC. Las líneas continuas indican estimulación y las líneas de puntos inhibición. Abreviaturas: MC4R, receptor MC4; α-MSH, hormona α-melanocito estimulante; AMPc, adenosin monofosfato cíclico; PKA, proteína quinasa A; ERK, quinasa regulada por señales extracelulares; JNK, quinasa N-terminal c-Jun; FT, factores de transcripción; CREB, proteína de unión al elemento que responde a AMPc; NF-κB: factor nuclear kappa B. Figura adaptada de Lasaga et al., 2008.

- Rol modulador de α-MSH en procesos plásticos.

α-MSH es capaz de modular procesos de aprendizaje y memoria en numerosos paradigmas conductuales (Datta y King, 1982; McLay et al., 2001). Entre las primeras evidencias del efecto de α-MSH sobre la memoria se encuentran los estudios de Beckwith et al. (Beckwith et al., 1977) donde el tratamiento con α-MSH produce una mejora en tareas de discriminación visual y espacial, así como en el aprendizaje de evitación activa. Otros trabajos exploraron los efectos de la MC sobre memorias apetitivas (Sandman et al., 1969) y de evitación pasiva (Dempsey, 1972).

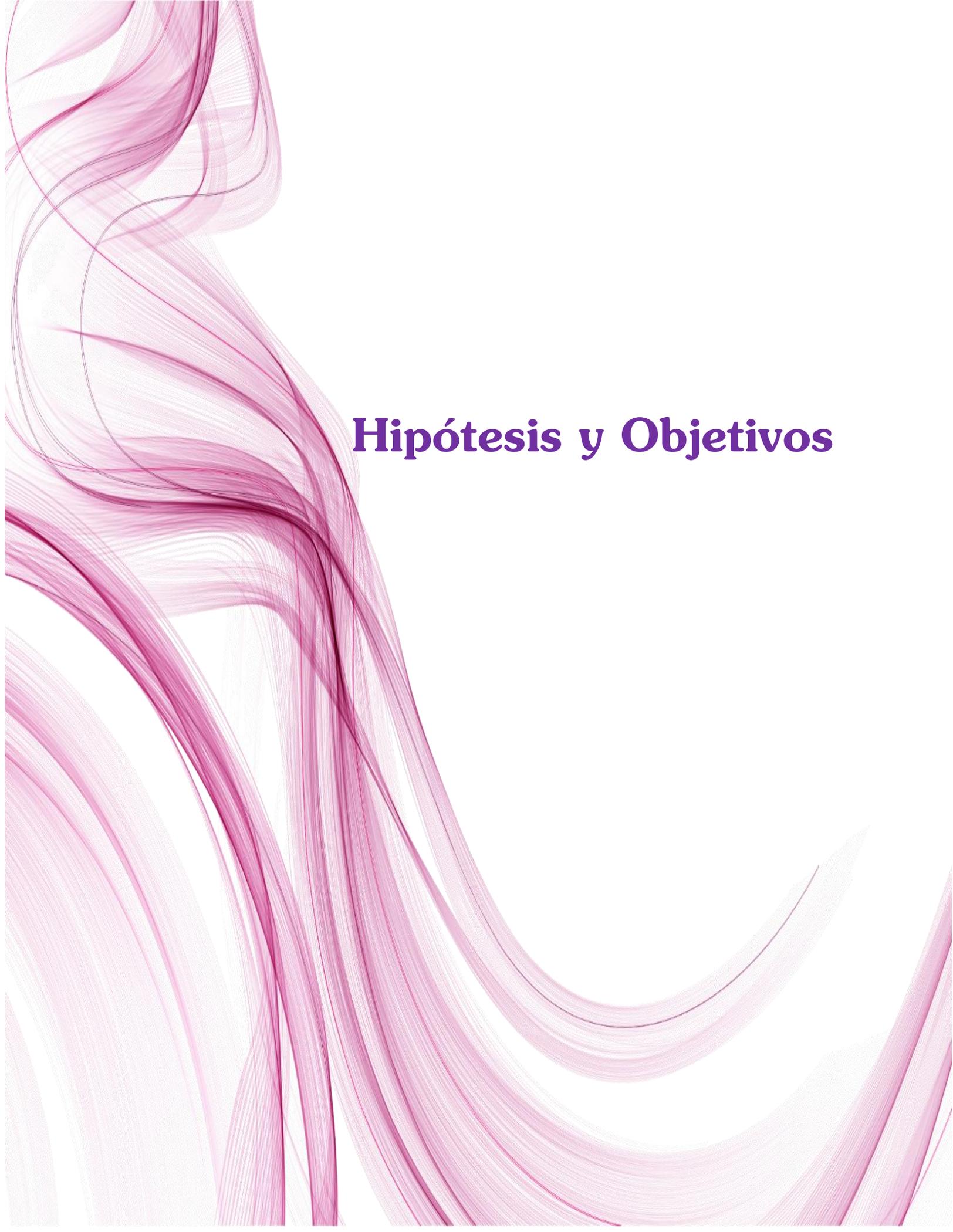
Los mecanismos por los cuales las MCs y en particular α-MSH modulan los procesos de aprendizaje y memoria se encuentran en estudio. Sin embargo, trabajos recientes aportan fuerte

evidencia de que la activación del receptor MC4 induce cambios morfológicos que conducen a la maduración de espinas dendríticas e incremento de la fuerza sináptica en hipocampo (Cui et al., 2012; Shen et al., 2013). Los mecanismos moleculares involucrados en el efecto de las MCs han sido estudiados a nivel central, ligados al receptor MC4 (Kishi et al., 2003; Muceniece y Dambrova, 2010). El receptor MC4 está acoplado a proteína G y su estimulación aumenta la LTP mediante la activación de la cascada AMP_c/PKA (Oosterom et al., 2001). Luego de la activación de MC4 aumenta la expresión en superficie de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en la post-sinapsis de forma dependiente de PKA (Shen et al., 2013). La activación de MC4, además, ha sido asociada a cambios estructurales a nivel sináptico, como el incremento en el volumen de espinas dendríticas inmaduras, que promueven la arborización y fortalecimiento de las sinapsis existentes (Caruso et al., 2014; Kopec et al., 2007; Man et al., 2007). Adicionalmente, el receptor MC4 es esencial en el mantenimiento de las espinas dendríticas maduras en neuronas piramidales de hipocampo (Shen et al., 2013). Estas evidencias demuestran el rol de MC4R en la regulación estructural y funcional de las conexiones sinápticas en hipocampo.

El tratamiento con un análogo sintético de α -MSH (NDP- α MSH) luego de una isquemia cerebral produce recuperación funcional del tejido, reduce el daño en hipocampo y mejora el aprendizaje y la memoria. Este efecto protector se encuentra asociado a un incremento del factor de transcripción zif268 en hipocampo y es mediado por el receptor MC4 (Giuliani et al., 2009, 2006). Además, se ha demostrado que el tratamiento de isquemia cerebral con agonistas del receptor MC4 induce neurogénesis, incluyendo proliferación, migración y diferenciación de precursores neuronales (Giuliani et al., 2011).

Adicionalmente el tratamiento con α -MSH revierte la progresión de la enfermedad de Alzheimer en modelos experimentales mediante diferentes vías de acción, siendo capaz de reducir la neurodegeneración característica de la enfermedad. Entre los mecanismos involucrados se describe una disminución de los niveles de citocinas pro-inflamatorias así como una inhibición en la activación de MAPK p38 (Giuliani et al., 2014).

Las propiedades del neuropéptido α -MSH lo convierten en un posible blanco terapéutico para el tratamiento de diversas patologías inflamatorias y degenerativas del SNC.



Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

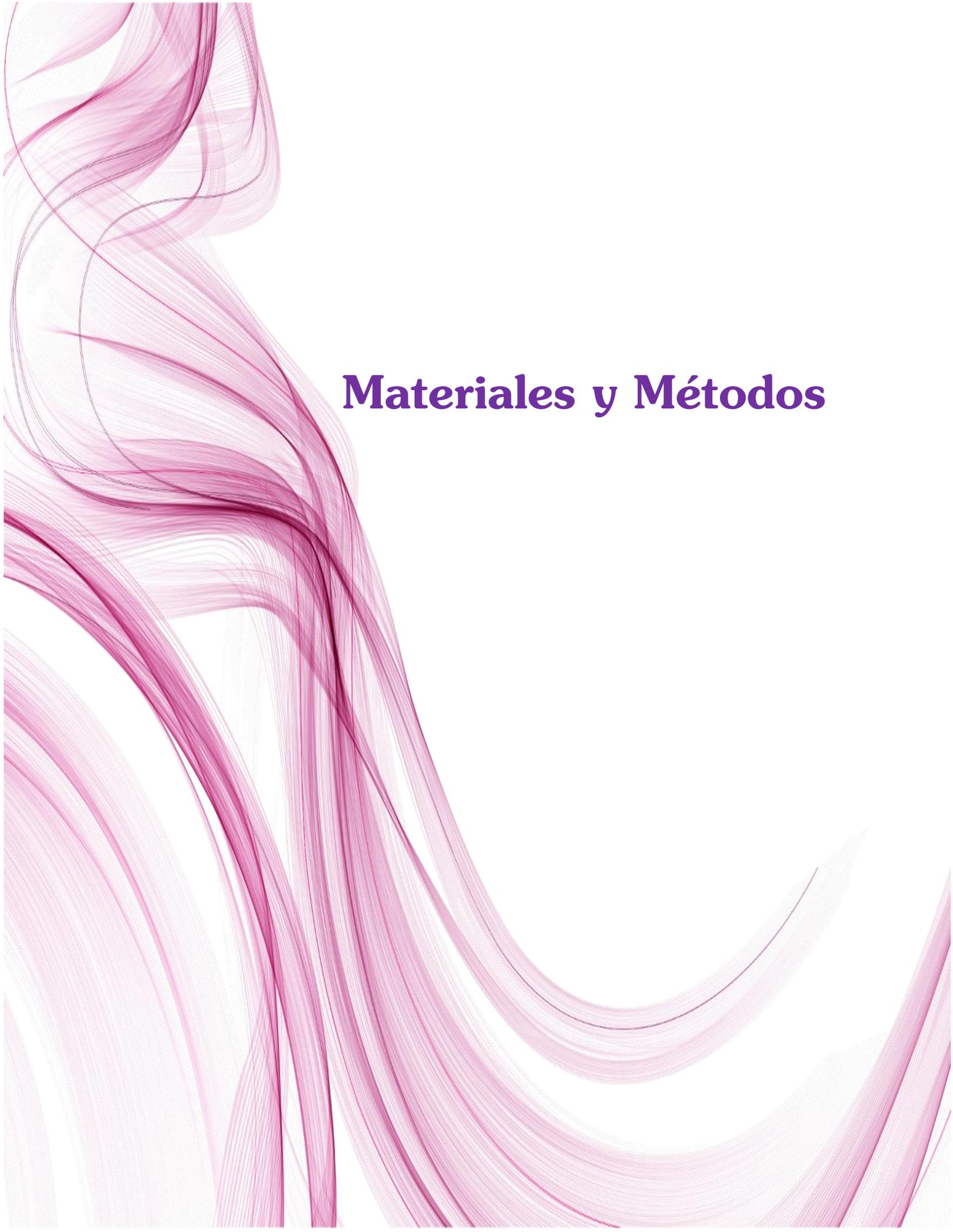
En base a los antecedentes expuestos, se propone que IL- 1 β podría producir un deterioro en la reconsolidación de la memoria de miedo contextual interfiriendo las vías de señalización específicas de este proceso en hipocampo. Por otra parte, es probable que α -MSH sea capaz de revertir el efecto de IL-1 β sobre la reconsolidación de la memoria, a través de la activación de receptores melanocortinérgicos específicos.

Objetivo general:

Determinar el efecto de la administración de IL-1 β sobre el proceso de reconsolidación de una memoria contextual de miedo, los mecanismos involucrados y establecer el posible rol modulador de α -MSH.

Objetivos específicos:

- ❖ Evaluar a nivel conductual el efecto de IL-1 β en la reconsolidación de una memoria contextual de miedo. Establecer el posible rol modulador de α -MSH y los receptores melanocortinérgicos involucrados.
- ❖ Estudiar el efecto de IL-1 β sobre la liberación de glutamato durante el proceso de reconsolidación.
- ❖ Determinar si IL-1 β modifica la activación de ERK2 y expresión de zif268 en hipocampo, durante el proceso de reconsolidación.
- ❖ Determinar el efecto de IL-1 β sobre la fosforilación y expresión en superficie y total de la subunidad GluA1 del receptor AMPA.
- ❖ Establecer el efecto de α -MSH sobre los cambios inducidos por IL-1 β en los mecanismos involucrados en la reconsolidación de una memoria.



Materiales y Métodos

- Animales

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar con un peso de 270 a 300 g (al momento de la cirugía). Los animales fueron criados en el bioterio del Departamento de Farmacología (IFEC-CONICET) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Se alojaron en grupos de 3 o 4 en cajas de plástico estándar de laboratorio (Plexiglas) con libre acceso al agua y al alimento (dieta balanceada para ratas y ratones de laboratorio, Gepsa Córdoba). Los animales fueron albergados en salas con ciclos de luz-oscuridad de 12h (luces encendidas de 7:00 a 19:00 h) y a una temperatura ambiente constante de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Los procedimientos experimentales fueron realizados entre las 9:00 y 14:00 h. Las ratas fueron asignadas al azar a los distintos grupos experimentales.

Los animales fueron habituados al contacto con el experimentador; para ello fueron trasladados a una habitación diferente, retirados de sus cajas, manipulados, pesados y luego retornados a sus cajas y a su habitación de alojamiento común. Este procedimiento se repitió los días posteriores a la cirugía y previos a iniciarse los experimentos.

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas establecidas por la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto Nacional de la Salud (NIH) de Estados Unidos de América, aprobada por el comité de cuidado y uso de animales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento y reducir el número de animales utilizados.

- Cirugía estereotáxica

Todos los animales utilizados en este trabajo fueron implantados bilateralmente en el área CA1 del HD mediante técnicas estereotáxicas. Cada animal fue anestesiado con una mezcla de Ketamina (55 mg/kg) (Holliday) y Xilazina (10 mg/Kg) (König) mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) y colocado en el aparato estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, IL) con la barra dental incisiva ubicada a -3.3 mm. Se realizó un corte en el cuero cabelludo, se dejó el

cráneo expuesto y se tomaron las coordenadas según la posición del Bregma. Se realizaron dos orificios en el cráneo para implantar las cánulas guías de acero inoxidable (calibre 22) de 9 mm longitud. Las cánulas fueron fijadas al cráneo con un tornillo y acrílico dental. Las coordenadas para el área CA1 de HD fueron tomadas del atlas de Paxinos y Watson (2009) siendo las siguientes: antero posterior (AP), -3,2 mm; lateral (L) ± 2.0 mm; dorso ventral (DV), -2,3 mm. Las cánulas guías se ubican justo por encima del área CA1, sin dañarla. Los animales fueron retirados del estereotáxico y colocados en una caja separada bajo supervisión constante hasta su recuperación. Después de la cirugía los animales recibieron una inyección subcutánea de una suspensión de estreptomicina y penicilina (Norcilina; Laboratorios NORT, Argentina) a fin de reducir el riesgo de infecciones. El tiempo de recuperación de la cirugía fue alrededor de 7 días. Durante este periodo, los animales fueron manipulados y se simuló la microinyección con el fin de minimizar las respuestas no específicas a este procedimiento durante el experimento.

- **Microinyección intracerebral**

Para la realización de las microinyecciones se utilizaron agujas de acero inoxidable (calibre 30) de 10 mm de longitud como inyectores, que sobrepasaban la cánula guía en 1 mm. El día de la microinyección los animales fueron cubiertos con un paño, sujetados suavemente y se introdujeron los inyectores. La microinyección fue realizada mediante la conexión del inyector a través de un tubo de polietileno (PE 10, BectonDickinson, MD) a una jeringa de 10 μ l (Hamilton, Reno, NV) montada en una bomba de infusión (Stoelting, USA). Cada rata fue inyectada bilateralmente con 0.25 μ l/lado de solución con una velocidad de flujo de 0.25 μ l/min. Para permitir la difusión de la droga, los inyectores permanecieron en las cánulas guías durante un min adicional.

- Drogas: administración y dosis

Para el desarrollo de los experimentos fueron utilizadas las siguientes drogas: rrIL-1 β (IL-1 β recombinante de rata) (R&D Systems, Reino Unido UK); α -MSH (agonista de los receptores MC3 y MC4) (NeoMPS, Francia); HS014 (antagonista selectivo de MC4R); SHU919 (antagonista selectivo MC3R, MC4R) (PolyPeptide, Francia).

rrIL-1 β fue disuelto en salina estéril (NaCl 0,9%) que contenía 0,01% de albúmina sérica bovina (ASB) y almacenada en alícuotas a -70°C. α -MSH, HS014 y SHU919 fueron reconstituidos en solución salina estéril y las alícuotas se guardaron a -20°C.

Se utilizó solución salina estéril 0,9% (SAL) como control debido a que no se encontraron diferencias a nivel conductual ni molecular cuando se administró salina conteniendo 0,01% de ASB.

Los animales fueron inyectados bilateralmente en HD con salina o las diferentes drogas en las siguientes dosis: IL-1 β (5ng), α -MSH (0,05 μ g), HS014 (0,5 μ g), SHU919 (0,5 μ g). En los casos donde correspondiese todos los grupos experimentales recibieron dos inyecciones administradas con 10 min de diferencia entre ellas. Cuando se administró salina o una sola droga la otra inyección fue realizada con salina. Los tratamientos se administraron a diferentes tiempos luego de la reactivación de la memoria dependiendo del diseño experimental. Las dosis utilizadas fueron seleccionadas en base a estudios previos y curvas dosis respuesta realizadas en el laboratorio.

- Análisis histológico

Al finalizar los experimentos conductuales, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de hidrato de cloral 16% o mediante la exposición a una cámara de CO₂. Los cerebros fueron extraídos y luego fijados por inmersión en una solución de formaldehído al 4% durante 3 días. Posteriormente se realizaron cortes coronales de 60 μ m de espesor mediante un criostato

(Leica, Alemania) en los que se evaluó la correcta difusión de la droga en el área CA1 de hipocampo, así como la ausencia de necrosis y/o hemorragias en el sitio de infusión causado por la implantación de la cánula guía. Para visualizar los cortes se empleó una lupa binocular (Arcano). Los datos correspondientes a los animales que presentaron una localización incorrecta de las cánulas o daño tisular fueron excluidos del análisis de resultados. A continuación, se representa en láminas del atlas de Paxinos (Paxinos y Watson, 2007) los sitios de infusión correspondientes a diferentes grupos de animales (Fig.7).

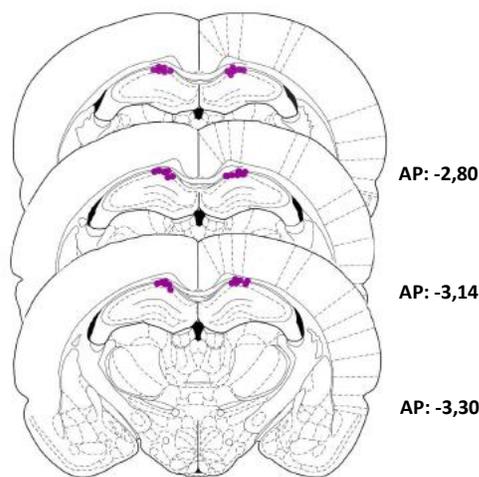


Figura 7. Cortes histológicos de cerebro de rata con marca representativa del sitio de infusión en CA1.

- **Condicionamiento de miedo contextual**

Se llevarán a cabo test conductuales, utilizando el paradigma de condicionamiento de miedo asociado al contexto. Para estudiar el proceso de reconsolidación, cada experimento consiste de tres fases: condicionamiento (entrenamiento), re-exposición (sesión de reactivación) y test.

Aparato para la administración de shocks inescapables

Se utilizó una caja de acrílico blanco (44 x 22 x 20 cm) con cubierta superior transparente, dividida en dos compartimentos iguales (Fig. 8). Cada compartimento tiene una base formada

por una grilla de acero inoxidable que consta de 10 barras paralelas de 4 mm de diámetro, separadas por 1.5 cm (de centro a centro). Las barras están conectadas a un generador de corriente eléctrica que permite la administración de shocks eléctricos en las patas del animal. La caja fue limpiada antes y después de cada sesión experimental con un solución de alcohol etílico al 30%. Este equipo fue colocado en una habitación aislada acústicamente, con iluminación (foco de luz blanca de 60 W) y climatización controladas ($22 \pm 2^\circ\text{C}$).

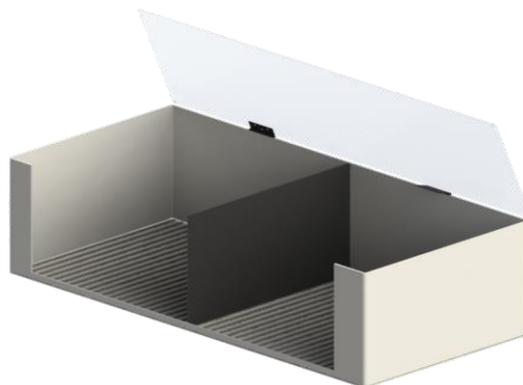


Figura 8. Aparato para la administración de shocks inescapables.

Sesión de entrenamiento

El día del condicionamiento cada animal fue trasladado a la habitación experimental cubierto por un paño y colocado individualmente en la caja de condicionamiento (estímulo condicionado, EC). Luego de 4 min de habituación (periodo pre-shock) los animales recibieron 3 shocks eléctricos en las patas (intensidad: 0,7mA, duración: 2,5 s, intervalo entre shocks: 30 s) (estímulo incondicionado, EI). Los animales permanecieron en el contexto asociado con el shock por 2 min adicionales (periodo post-shock). Posteriormente fueron retornados en sus cajas de alojamiento a la habitación de la colonia.

Sesión de reactivación

Los animales fueron re-expuestos al contexto apareado con el shock 24 h después del entrenamiento y se midió la respuesta de miedo durante un periodo de 3 min utilizando

cronómetros. Distintos grupos de animales fueron inyectados con los diferentes tratamientos inmediatamente después de la reactivación de la memoria (considerándose 0 min), excepto en el experimento de la **Figura 11** donde se evaluó la ventana temporal de acción de IL-1 β , y las infusiones se realizaron además a los 15, 30, 60 y 120 min después.

Sesión de Test

Los animales fueron re-expuestos al contexto apareado con el shock 24 h después de la sesión de reactivación y se midió la respuesta de miedo (conducta de congelamiento o freezing) durante un periodo de 5 min. La conducta de congelamiento (freezing) se define como la adopción de postura de inmovilidad total durante la cual el animal sólo realiza los movimientos asociados a la respiración (Blanchard y Blanchard, 1969; Bolles y Collier, 1976; Fanselow MS, 1980) y es utilizado comúnmente como un índice de miedo en roedores.

La retención de la memoria fue evaluada y expresada como el porcentaje de tiempo que las ratas permanecían en la conducta de congelamiento. El tiempo total que la rata permaneció en postura de congelamiento o freezing en cada período (pre-shock; post-shock; reactivación; test) fue cuantificado en segundos utilizando un cronómetro y expresado como porcentaje respecto del tiempo total (% de tiempo de congelamiento). La conducta de congelamiento fue evaluada por un experimentador que desconocía el tratamiento de cada animal.

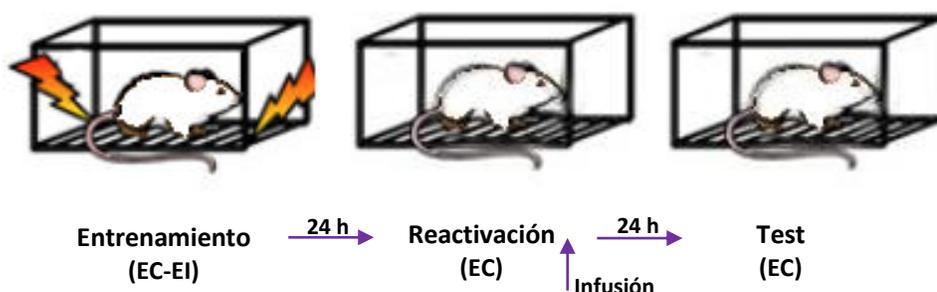


Figura 9. Esquema del condicionamiento de miedo contextual.

- Estudios bioquímicos

Disección

Luego de la reactivación de la memoria de miedo contextual, se infundieron los distintos tratamientos en la región CA1 de HD y se procedió a sacrificar los animales a diferentes tiempos según el experimento. Con ese propósito, los animales fueron transferidos individualmente a una sala e inmediatamente sacrificados por decapitación. Los cerebros fueron removidos rápidamente y colocados en una matriz de acrílico (Stoelting, USA) en hielo. Se realizaron cortes coronales del cerebro de 4 mm de espesor, 2 mm por delante y 2 mm detrás de la marca de la cánula guía y posteriormente se procedió a realizar la disección del HD (George Paxinos, Charles Watson, 2007). Para el experimento de **Biotinilación**, se realizó un corte coronal del cerebro de 2 mm, 1 mm por delante y 1 mm por detrás de la marca de la cánula guía. El tejido extraído fue suficiente para proveer la cantidad de proteínas necesarias para los diferentes experimentos. La disección descrita es común a todos los experimentos bioquímicos.

Liberación de glutamato e influjo de calcio

Purificación de sinaptosomas

Los sinaptosomas se purificaron en un gradiente discontinuo de Percoll según la técnica descrita por Dunkley et al. (Dunkley et al., 2008). Los animales fueron sacrificados 10 min después de la reactivación de la memoria y se disecó HD, como se describió previamente. El tejido fue homogeneizado en solución tampón GB (sacarosa 0,32 M, EDTA 1 mM y DTT 0,25 mM a pH 7,4 y 4°C), y el homogenato resultante se centrifugó a 2000g durante 6 min a 4°C, recogiendo el sobrenadante (S1). El sobrenadante resultante se centrifugó a 14500 g durante

14 min a 4°C. El sedimento resultante (P2) se re-suspendió en 3 ml de GB. Esta suspensión se colocó sobre un gradiente discontinuo de Percoll, preparado en un medio compuesto por GB y formado por bandas de 3 ml de Percoll al 3 %, al 10 % y al 23 %, a pH 7,4. Los gradientes se centrifugaron a 32500 g durante 15 min a 4°C, recogiéndose los sinaptosomas en la interfase formada por las bandas de Percoll al 10 % y al 23 %. La mielina quedó en la banda de Percoll al 3 %, mientras que las mitocondrias sedimentaron en el fondo del tubo. Los sinaptosomas se diluyeron hasta un volumen final de 10 ml con medio HBM (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, NaHCO₃ 5 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 10 mM y HEPES 10 mM; pH 7.4), y fueron centrifugados a 27000 g durante 14 min a 4°C. El sedimento (P3) resultante se re-suspendió en 1 ml de medio HBM, determinándose a continuación el contenido de proteínas por el método de Bradford. Las alícuotas con sinaptosomas se conservaron en un baño de hielo hasta su utilización.

Ensayo de liberación de glutamato.

Brevemente, una suspensión de sinaptosomas (250 mg/ml) en 1ml de HBM, se transvasó a una cubeta de cuarzo para fluorescencia mantenida a 37 °C y en constante agitación en un fluorómetro (FluoroMax-P HoribaJobinYvon). Posteriormente se adicionaron los siguientes reactivos: NADP⁺ (1mM) y CaCl₂ (1.2 mM). Después de 2 min, se adicionó la enzima L-glutamato deshidrogenasa (GDH, 50 unidades/ml) y finalmente, luego de 5 min se agregó 4AP (3mM) (bloqueante selectivo de canales de potasio dependientes del voltaje) para inducir la despolarización de la membrana y consecuente liberación del neurotransmisor. Los cambios de fluorescencia debidos a la producción de NADPH (excitación, 330 nm; emisión, 460 nm) refleja la liberación de glutamato, el cual es convertido a α -cetoglutarato por la enzima L-glutamato deshidrogenasa mediante la reducción de NADP⁺ a NADPH. Un estándar de glutamato es adicionado al final de cada experimento para calcular la liberación de glutamato como la relación de nanomoles de glutamato por miligramos de proteína sinaptosomal. Los valores de fluorescencia se midieron en cuentas por min (c.p.m.) y se registraron a intervalos de 1 segundo. Los resultados de las determinaciones fueron expresados en nanomoles de glutamato

en 1 mg de proteína a los 8 min (valor seleccionado para evaluar los diferentes tratamientos a un determinado punto de la curva).

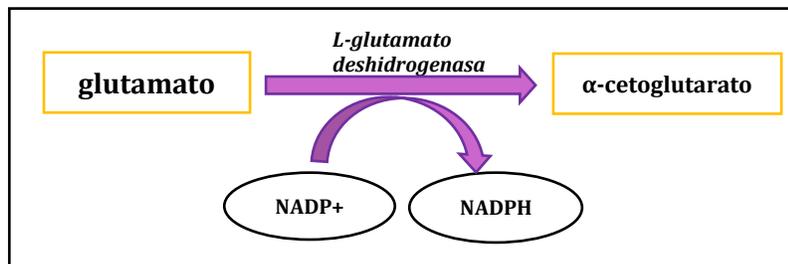


Figura 10. Esquema de la reacción indirecta para la determinación de glutamato.

Determinación del influjo de calcio

Sinaptosomas purificados (0,4mg/ml) fueron pre-incubados en solución tampón HBM con el indicador de calcio (Ca^{2+}) Fluo-3AM (acetiloximetil éster) (Life Technologies) (1mM) durante 30 min a 37°C en un tubo eppendorf. Posteriormente, cada tubo fue centrifugado dos veces a 5000g durante 30 s para descartar el exceso del indicador de calcio en el sobrenadante. El sedimento fue re-suspendido en 1ml de HBM y transvasado a una cubeta de cuarzo para fluorescencia mantenida a 37 °C y en constante agitación en un fluorómetro (FluoroMax-P HoribaJobinYvon). Luego de 3 min se adicionó CaCl_2 (1,2mM) y 10 min después 4AP (3mM). 4AP indujo la despolarización y consecuente activación de los canales de calcio voltaje dependientes. Los cambios de fluorescencia (excitación, 330 nm; emisión, 460 nm) se debieron a la unión del indicador Fluo-3 a calcio, y fueron indicadores del influjo de calcio al sinaptosoma. Los valores de fluorescencia se midieron en c.p.m. y se registraron a intervalos de 1 segundo. Se llevaron a cabo los procedimientos de calibración descritos por Grynkiewicz y Poenie, 1985. Brevemente, se empleó SDS 0,1% para obtener el máximo de fluorescencia de Fluo-3 cuando se encuentra saturado con calcio, seguido de EGTA (10mM) para obtener el valor mínimo de fluorescencia debido a la ausencia de calcio. La concentración de calcio se calculó de manera similar a la descrita para quin2 (Tsien y col, 1982), considerando F_{\min} los valores de

fluorescencia antes del agregado de CaCl_2 y con un valor de constante de disociación (KD) para Fluo-3AM de 400 nM.

Western Blot

Extracción de proteínas totales

Para realizar la extracción de proteínas totales, el tejido obtenido luego de la disección, fue homogeneizado en solución tampón RIPA (50mM tris pH7,5, 150 mMNaCl, 0,1% tritón X-100, 0,5% deoxicolato de sodio y 0,1% dodecilsulfato de sodio (SDS)), con inhibidores de proteasas (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinina, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatina A and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)) e inhibidores de fosfatasa (1 mM ortovanadato de sódio (Na_3VO_4)) en hielo. Luego las muestras fueron centrifugadas a 10,000 g durante 10 min a 4°C. Al sobrenadante obtenido se le adicionó igual volumen de solución tampón Laemmli2x (2% SDS, 20% glicerol, 10% β -mercaptoetanol, 125mM tris pH 6,8, 0,01% azul de bromofenol). Posteriormente, las muestras fueron hervidas durante 5 min a 100 °C y almacenadas a -70 °C hasta su utilización. Alícuotas del sobrenadante fueron utilizadas para realizar la cuantificación de proteínas utilizando el método de Bradford (Bio-Rad Bradford ProteinAssay Kit; Hercules, CA). La activación de la proteína ERK, los niveles de expresión del factor de transcripción zif268, las fosforilaciones de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en los amino ácidos serina845 y serina 831 (p-Ser845 GluA1 y p-Ser831 GluA1), y niveles de expresión de GluA1 fueron determinados utilizando extractos de proteínas totales.

Determinación de proteínas mediante inmunotransferencia

Las muestras conteniendo 40 μg del homogenato de tejido fueron sembradas y separadas en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 10% para la determinación de ERK y zif268. En la determinación de p-Ser845 GluA1, p-Ser831 GluA1 y GluA1, se sembraron 60 μg de proteínas en un gel SDS-PAGE al 7,5%. Luego las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, BioRad). Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas durante 2 h

a temperatura ambiente con leche descremada (0% grasa) disuelta al 5% en TTBS (50 mM tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, and 0,1%, tween 20) y luego incubadas durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente:

- anticuerpo monoclonal de conejo anti-fosfo ERK1/2, que reconoce la proteína ERK1/2 (42-44kDa) fosforilada en los aminoácidos treonina 202 y tirosina 204 (1:1000; Cell Signaling Technology).
- anticuerpo policlonal de conejo anti-Egr1, que reconoce la proteína Egr1 conocida como zif268 (82 kDa), en la porción carboxilo terminal (1:500; Santa Cruz Biotechnology).
- anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfoSerina 845 GluA1 (p-Ser845 GluA1), que reconoce la proteína GluA1 fosforilada en el aminoácido serina 845 (100kDa), (1:500; Merck Millipore).
- anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfoSerina 831 GluA1 (p-Ser831 GluA1), que reconoce la proteína GluA1 fosforilada en el aminoácido serina 831 (100 kDa), (1:500; Merck Millipore).
- anticuerpo monoclonal de conejo anti-GluR1 (GluA1), que reconoce los aminoácidos 858-868 de la proteína GluA1 (106 kDa), (1:200; Merck Millipore).

Para las determinaciones de ERK2 y zif268 (revelado convencional), las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario, IgG anti-conejo, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) en una dilución (1:2500, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a realizar el revelado utilizando la técnica de quimioluminiscencia con luminol, ácido cumárico como catalizador y peróxido de hidrógeno como sustrato de reacción (ECL) y mediante la exposición de las membranas a placas radiográficas Ortho CO-G Plus (AGFA).

Para p-Ser845 GluA1, p-Ser831 GluA1 y GluA1, las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios anti conejo o ratón conteniendo fluoróforos IRDye 800 (Licor) (marcado infrarrojo de absorción a 800nm, dilución 1:20000) durante 2 h a temperatura ambiente y se visualizó con el equipo Odyssey CLx Infrared Imaging System - LI-COR Biosciences (sistema para la detección de imágenes en el rango infrarrojo). Las imágenes obtenidas pudieron ser visualizadas por el programa Image Studio (Analysis Software Version 3.1.)

Después del revelado los anticuerpos primarios adheridos a las membranas fueron removidos mediante la utilización de NaOH 0,1M durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se

procedió al lavado de las membranas 3 veces con TTBS (el tiempo de cada lavado varió de acuerdo al anticuerpo utilizado) y posteriormente se incubaron con alguno de los siguientes anticuerpos primarios, a 4 °C toda la noche:

- anticuerpo monoclonal de ratón anti-ERK1/2 (42-44kDa)(1:2500; Cell Signaling Technology).
- anticuerpo monoclonal de ratón anti-actina (42kDa) (1:1000; Sigma-Aldrich).

Al día siguiente las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con la peroxidasa de rábano (1:2500, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) durante 2 h a temperatura ambiente, y reveladas como se describió previamente. Para el revelado de actina en las membranas que se determinó p-Ser845 GluA1, p-Ser831 GluA1 y GluA1, el esquema del revelado fue similar al empleado para estos anticuerpos. Todos los anticuerpos fueron diluidos en una solución de ASB al 5% disuelta en TTBS.

Análisis de datos

Las placas radiográficas o imágenes obtenidas fueron analizadas con un programa computacional de análisis de imágenes (GelPro32 Analyzer). Cada banda se normalizó a su control interno que corresponde a una proteína de expresión constitutiva. Además, los resultados de la cuantificación fueron normalizados con la señal total de cada placa. Los datos fueron presentados como la relación entre el p-ERK2/ERK2, zif268/actina, p-Ser845 GluA1/actina, p-Ser831 GluA1/actina y GluA1/actina en cada muestra. En relación a la proteína ERK, si bien, los anticuerpos primarios utilizados reconocen tanto a las proteínas fosforiladas ERK1 como ERK2 (p-ERK1/2), p-ERK1 no ha sido cuantificado por presentar señal inconsistente y débil.

Biotinilación

Luego de la disección de HD el tejido fue cortado con bisturí longitudinal y transversalmente y se transvasó a un tubo conteniendo una solución de biotina sulfosuccinimidil-6-biotina-amidohexanoato (Pierce) en solución tampón fosfato salina (PBS) (0,3mg/ml) e incubada por 1 h a 4 °C. Posterior a la incubación, se lavaron las diferentes muestras con Tris-glicina frío, para detener la reacción de la biotina libre (5 min), seguido de tres lavados con TBS (5 min x 3 veces). Luego del lavado el tejido, fue homogeneizado en 300 µL de solución tampón RIPA. Los homogenatos fueron centrifugados a 13000 g por 30 min para precipitar la fracción insoluble. Para determinar la fracción total (contenido total, superficie+ interna) de GluA1, 50 µL de sobrenadante fue mezclado con 12,5 µL de Laemmli4x y hervido durante 5 min. Las proteínas de superficie biotiniladas en el resto de sobrenadante (200µL) fueron inmunoprecipitadas con 50 µL de esferas de avidina-agarosa (Pierce) al 50% durante 2 h a 4 °C. Luego las muestras fueron centrifugadas a 3000 g durante 10 min. Las esferas de agarosa fueron separadas (pellet) y el sobrenadante mezclado y hervido con solución Laemmli4x (fracción interna). Posteriormente se lavaron las esferas de agarosa tres veces con PBS y fueron hervidas con 50 µL de Laemmli2X (fracción de superficie). Alícuotas de las diferentes fracciones fueron utilizadas para realizar la cuantificación de proteínas utilizando la técnica de Bradford (Bio-Rad Bradford).

Las muestras de la fracción de superficie y de la fracción total (superficie+ interna) conteniendo entre 80-90 µg de proteínas fueron procesadas por western blot para la determinación de la subunidad GluA1 del receptor AMPA empleando actina como control de carga de proteínas. El procedimiento es idéntico al descrito para evaluar la expresión de GluA1 en homogenato de proteínas totales.

- Estadística

Todos los datos fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (E.E.M.) y los resultados fueron analizados utilizando el test t de Student o el análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías según correspondiera. Cuando se encontraron diferencias significativas se realizó el test de comparación post-hoc de Newman Keuls (N-K). Cuando no se encontraron diferencias en las interacciones de las variables se llevó a cabo un análisis de contraste (Montgomery, 2001). Las diferencias con un valor de $p \leq 0,05$ fueron consideradas estadísticamente significativas. Los datos se analizaron con el software estadístico STATISTICA 7.0 (StatSoft).



Resultados

Capítulo 1

Efecto de IL-1 β en la reconsolidación de una memoria contextual de miedo, posible rol modulador de α -MSH y receptores melanocortinérgicos involucrados.

Interleucina-1 β influencia significativamente diversos procesos cognitivos, entre ellos el aprendizaje y la memoria. Particularmente, ha sido demostrado que los tratamientos tendientes a incrementar los niveles de IL-1 β en el cerebro, afectan la LTP en hipocampo y deterioran el proceso de consolidación de la memoria. Sin embargo, el efecto de IL-1 β sobre el proceso de reconsolidación de la memoria ha sido menos estudiado (Kranjac et al., 2012).

Por otra parte, la hormona α -MSH ejerce potentes acciones anti-inflamatorias, a través de la activación de receptores melanocortinérgicos (MC1-MC5). Los receptores MC3 y MC4 se expresan predominantemente en SNC y en particular, presentan alta densidad en hipocampo. Además de las acciones anti-inflamatorias, otros efectos de la administración central de IL-1 β pueden ser bloqueados por α -MSH, tales como fiebre e inducción de ansiedad (Cragolini et al., 2006, 2004). Resultados de nuestro laboratorio establecieron que la administración de α -MSH puede revertir el efecto de IL-1 β sobre la consolidación de una memoria contextual de miedo (Gonzalez et al., 2009).

Dada la importancia del proceso de reconsolidación y teniendo en cuenta los antecedentes presentados, decidimos estudiar el efecto de IL-1 β sobre el proceso de reconsolidación de una memoria contextual de miedo. Además, nos propusimos evaluar si α -MSH es capaz de modular el efecto de IL-1 β sobre la reconsolidación, así como los MCR involucrados.

I- a) Curva temporal del efecto de IL-1 β sobre la reconsolidación de una memoria contextual de miedo

Para estudiar el efecto de IL-1 β sobre el proceso de reconsolidación de la memoria, se administró IL-1 β en HD luego de la reactivación de la memoria y se evaluó el porcentaje de tiempo de congelamiento durante el test, 24 h después.

Los animales que recibieron la infusión de IL-1 β inmediatamente después de la reactivación de la memoria mostraron una reducción del porcentaje de tiempo de congelamiento respecto a los controles tratados con solución salina (SAL) (**Fig. 11**). Para evaluar la curva temporal de

acción de la citocina se administró SAL o IL-1 β en HD 15, 30, 60 o 120 min luego de la reactivación. El ANOVA de dos vías reveló una diferencia significativa en el tratamiento [F (1,37)=67,12, $p<0,001$], tiempo [F (4,37)=3,59, $p<0,01$] y en la interacción de las variables [F (4,37)=2,76, $p<0,05$]. Al realizar el análisis post hoc de Newman Keuls se observó una diferencia significativa entre los grupos tratados con IL-1 β inmediatamente, 15, 30 y 60 min luego de la reactivación pero no en el grupo tratado 120 min luego de la reactivación respecto de los controles correspondientes (Fig. 11).

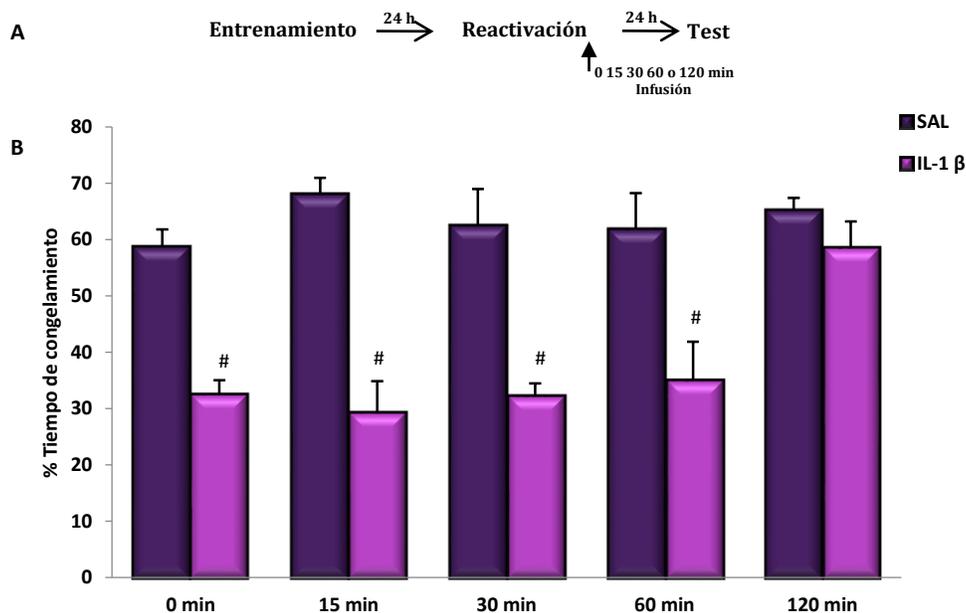


Figura 11. Efecto de la administración de IL-1 β a diferentes tiempos luego de la sesión de reactivación de una memoria contextual de miedo. A. Esquema experimental. B. Después de la reactivación de la memoria de miedo contextual los animales recibieron los distintos tratamientos y 24 h después se evaluó el porcentaje de tiempo de congelamiento. Los datos se expresan como la media \pm EEM del porcentaje del tiempo de congelamiento durante el test. ANOVA de dos vías seguido del test de Newman-Keuls # $p<0,001$ respecto del grupo SAL correspondiente (n=4-6 por grupo).

Para determinar que la citocina específicamente afecta la reconsolidación de la memoria contextual de miedo, distintos grupos de animales fueron inyectados con SAL o IL-1 β 24 h

después del entrenamiento sin haber sido expuestos a la sesión de reactivación y 24 h después se evaluó el porcentaje de tiempo de congelamiento. Ambos grupos de animales demostraron porcentajes similares de tiempo de congelamiento (% de tiempo de congelamiento: SAL= $69,89 \pm 6,16$; IL-1 β = $67,17 \pm 0,17$), es decir, no hubo diferencias significativas entre ambos grupos (**Fig. 12**).

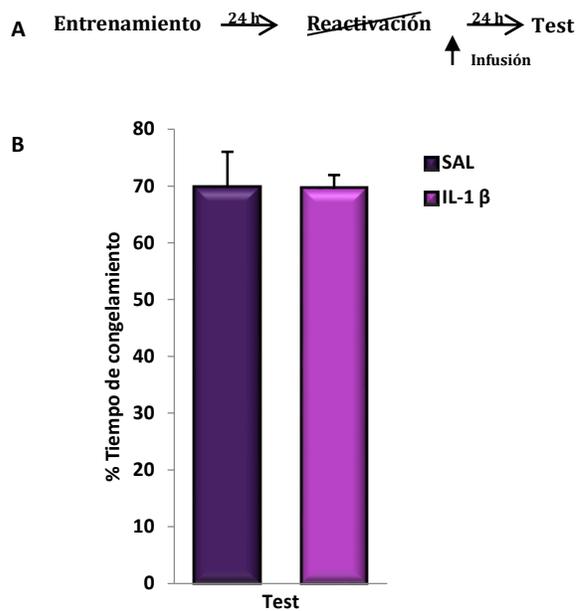


Figura 12. Control de la especificidad del efecto de IL-1 β sobre la reconsolidación de una memoria contextual de miedo. A. Esquema experimental. **B.** Los animales recibieron los distintos tratamientos 24 h después del entrenamiento y al día siguiente se evaluó el porcentaje de tiempo de congelamiento. Los datos se expresan como la media \pm EEM del porcentaje del tiempo de congelamiento durante el test. El Test T de Student no mostró diferencias significativas ($n=4-5$ por grupo).

I- b) Persistencia del efecto de IL-1 β

Para evaluar la persistencia del efecto de IL-1 β sobre el proceso de reconsolidación de la memoria de miedo contextual, se realizó un test (Test 2) 6 días después del test realizado 24 h luego de la sesión de reactivación (Test 1). Diferentes grupos de animales recibieron una inyección de SAL o IL-1 β inmediatamente después de la reactivación de la memoria y se evaluó el porcentaje de tiempo de congelamiento a las 24 h y a los 7 días (**Fig. 13**). Se observó una disminución del porcentaje de tiempo de congelamiento en los animales tratados con IL-1 β en

II- Efecto de α -MSH sobre el deterioro inducido por IL-1 β en el proceso de reconsolidación de la memoria contextual de miedo. Receptores melanocortinérgicos involucrados.

Nos propusimos determinar si el tratamiento con α -MSH podía revertir el efecto de IL-1 β sobre la reconsolidación de la memoria y establecer los MCR implicados. Inmediatamente después de la sesión de reactivación, los animales recibieron los distintos tratamientos: salina + salina (SAL+SAL); IL-1 β + salina (IL-1 β +SAL); salina + α -MSH (SAL+ α -MSH); IL-1 β y α -MSH (IL-1 β + α -MSH); IL-1 β y SHU + α -MSH (IL-1 β /SHU+ α -MSH) y SHU + salina (SHU+SAL). Los tratamientos fueron administrados con 10 min de separación entre ambas inyecciones.

La administración de IL-1 β luego de la reactivación de la memoria produjo niveles de congelamiento menores al grupo salina (control), mientras que la infusión de IL-1 β y α -MSH produjo niveles de congelamiento similares al grupo control (**Fig. 14**). Por otro lado, el grupo que recibió una infusión de SHU9119 (antagonista de los receptores melanocortinérgico MC3 y MC4) junto a IL-1 β y 10 min después α -MSH, presentó un % de tiempo de congelamiento similar al grupo tratado con IL-1 β (**Fig. 14**). El ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del tratamiento [$F(5,21)=24.74$, $p<0.001$]. El subsecuente análisis post hoc indicó que los grupos IL-1 β +SAL e IL-1 β /SHU+ α -MSH son significativamente diferentes de los otros grupos analizados. Los grupos SHU+SAL y SAL+ α -MSH no son diferentes del grupo control.

memoria contextual de miedo mediante la activación de los receptores melanocortinérgico hipocampales MC4, aunque no podemos descartar la participación de receptores MC3.

Capítulo 2

Efecto de IL-1 β sobre la liberación de glutamato durante el proceso de reconsolidación de una memoria contextual de miedo, rol modulador de α -MSH.

I- Efecto de los distintos tratamientos sobre la liberación de glutamato

Se ha propuesto que la liberación de glutamato es fundamental durante la reconsolidación ya que produce la activación de las vías de señalización involucradas en este proceso. El empleo de antagonistas de los receptores glutamatérgicos NMDA afecta la reconsolidación de memorias contexto señal (Pedreira et al., 2002), memorias contextuales de miedo (Lee et al., 2006; Suzuki et al., 2004) y memorias apetitivas (Torras-Garcia et al., 2005).

Ha sido establecido que IL-1 β disminuye la liberación de glutamato de sinaptosomas hipocampales luego de la LTP (Kelly et al., 2003; Vereker et al., 2000). Además, en ratas de edad avanzada, en las cuales la concentración de IL-1 β es elevada, se atenúa el incremento en la liberación de glutamato asociado a LTP. También, se determinó que puede afectar la liberación de glutamato durante el proceso de consolidación de la memoria (Gonzalez et al., 2013).

Considerando estos antecedentes y la importancia de conocer los mecanismos moleculares involucrados en la reconsolidación de la memoria sobre los cuales podría incidir IL-1 β , decidimos estudiar su efecto sobre la liberación de glutamato.

Con el fin de evaluar la liberación de glutamato luego de la reactivación de la memoria de miedo contextual, dos grupos de animales fueron entrenados y 24 h después uno de los grupos fue re-expuesto al contexto de entrenamiento (grupo reactivado, R) y el otro grupo no (no reactivado, NR) (**Fig. 15**). Se administró SAL en ambos grupos: el grupo R recibió la infusión inmediatamente después de la reactivación y el grupo NR 24 h después del entrenamiento. Diez min después, se procedió a la disección de HD y a la purificación de sinaptosomas. La liberación de glutamato inducida por 4-AP fue evaluada en sinaptosomas obtenidos de HD mediante un ensayo fluorométrico. El análisis estadístico indicó que la liberación de glutamato fue significativamente mayor en el grupo R respecto del grupo NR [$t = 5,23$; $df = 7$; $p < 0,005$] (**Fig. 15**).

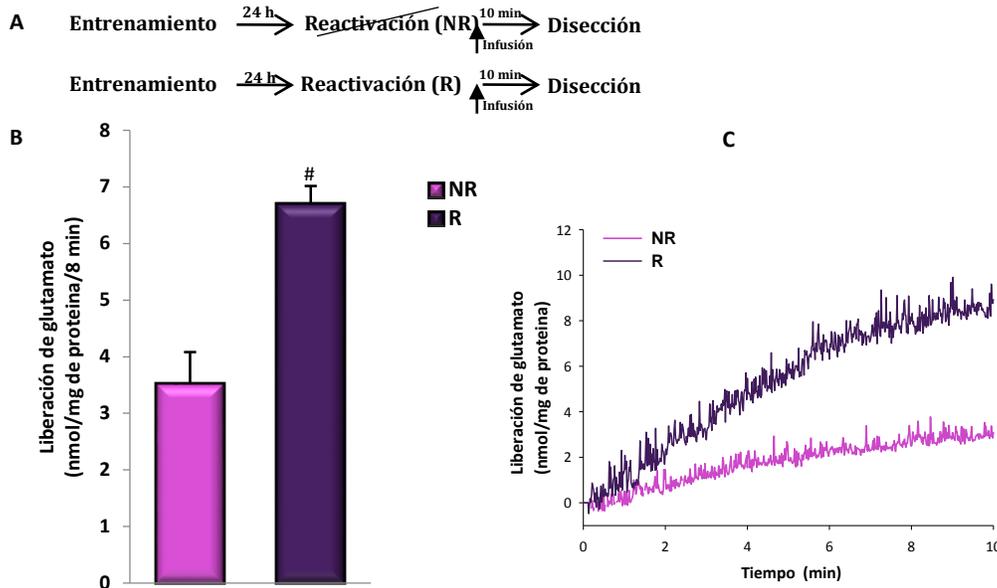


Figura 15. Liberación de glutamato durante el proceso de reconsolidación de la memoria.

A. Esquema experimental. **B.** Los grupos reactivado y sin reactivar fueron sacrificados 10 min después de la infusión de salina. Los valores registrados se expresan como la media (a los 8 min) \pm EEM Test T # $p < 0,005$ respecto del grupo NR (n=4-5 por grupo). **C.** Curvas representativas de la liberación de glutamato, correspondientes a los distintos grupos experimentales.

A continuación se estudió el efecto de la citocina sobre la liberación de glutamato luego de la reactivación de la memoria. Distintos grupos de animales fueron inyectados en HD con SAL o IL-1 β inmediatamente después de la sesión de reactivación. La liberación de glutamato en los animales tratados con IL-1 β fue menor que la observada en animales controles (**Fig. 16**). El efecto de IL-1 β observado es específico de la reactivación de la memoria debido a que la administración de la citocina en un grupo no reactivado no difiere del control en las mismas condiciones [$t=0,54$; $df=4$; $p=0,61$].

Con el fin de determinar el efecto de α -MSH sobre la liberación de glutamato, diferentes grupos de animales fueron tratados con salina, IL-1 β y/o α -MSH inmediatamente después de la reactivación de la memoria. La administración de α -MSH no indujo cambios en la liberación de glutamato pero revirtió el efecto de IL-1 β (**Fig. 16**). El ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del tratamiento [$F(3,14) = 9,54$; $p < 0,005$]. El análisis post hoc de Newman Keuls

indicó que los niveles de liberación de glutamato del grupo IL-1 β eran significativamente diferentes de los otros grupos ($p < 0,05$) (Fig. 16).

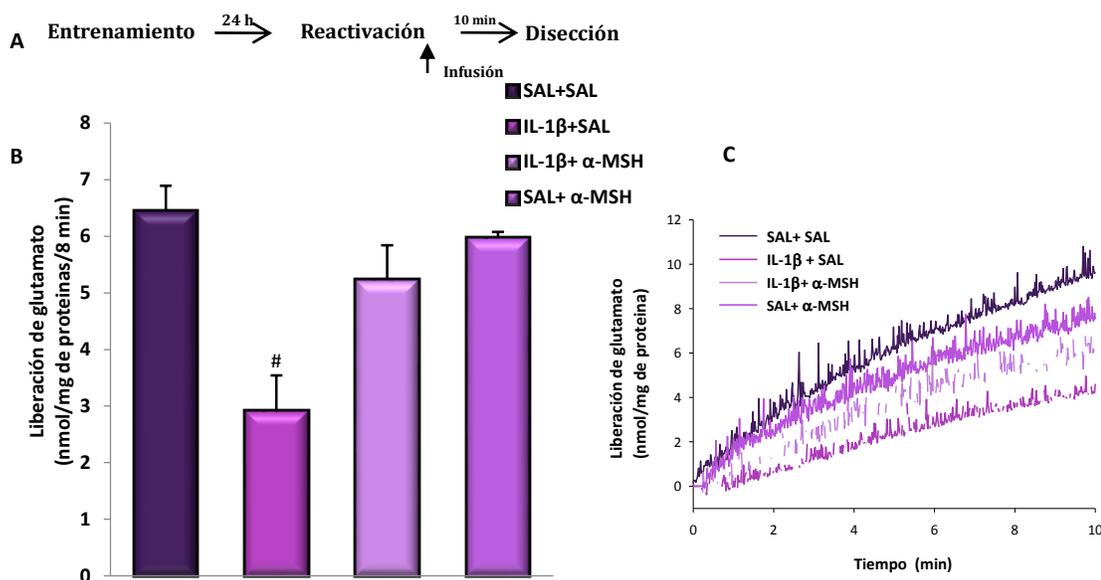


Figura 16. Efecto de los distintos tratamientos sobre la liberación de glutamato luego de la reactivación de una memoria contextual de miedo A. Esquema experimental. B. Después de la reactivación de una memoria de miedo contextual los animales recibieron los distintos tratamientos y fueron sacrificados 10 min después. Los valores registrados se expresan como la media (a los 8 min) \pm EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman Keuls # $p < 0,05$ vs. los otros grupos ($n=4-7$ por grupo). C. Curvas representativas de la liberación de glutamato, correspondientes a los distintos grupos experimentales.

II- Efecto de los distintos tratamientos sobre el influjo de calcio

Numerosa evidencia indica que las citocinas pueden interactuar con canales iónicos, regulando la excitabilidad neuronal (Viviani et al., 2007). Específicamente, se ha demostrado que IL-1 β inhibe canales de calcio voltaje dependientes y que este efecto podría estar relacionado a su habilidad para reducir la liberación de neurotransmisores y en consecuencia la transmisión sináptica (Murray et al., 1996; Plata-Salamán y Ffrench-Mullen, 1994). En particular, un estudio

realizado en ratas de edad avanzada demostró que IL-1 β tiene un efecto inhibitorio sobre el influjo de calcio y liberación de glutamato de sinaptosomas hipocampales (Murray et al., 1996). Por otra parte, ha sido descrito que las corrientes de calcio pueden ser moduladas por una variedad de hormonas y neurotransmisores (Catterall, 2000). La unión de α -MSH a sus receptores puede inducir un incremento del AMPc y la activación de PKA, los cuales podrían modular canales de calcio disparados por voltaje y el influjo de calcio (Bean et al., 1984). Se ha demostrado también, en células HEK293 que expresan ya sea el receptor MC3 o el receptor MC4 tratadas con α -MSH un aumento en la concentración de calcio intracelular (Mountjoy et al., 2001).

En base a estos antecedentes, es probable que IL-1 β disminuya la liberación de glutamato alterando el influjo de calcio y que α -MSH puede revertir este efecto.

Se determinó influjo de calcio en sinaptosomas purificados de HD incubados con el indicador Fluo-3AM. Luego de la incubación, se lavó el exceso de indicador en cada muestra y la solución de sinaptosomas resultantes fue colocada en el fluorómetro a 37 °C y en agitación constante. Unos min después, se indujo la despolarización mediante 4-AP y de este modo se pudo evaluar la entrada de calcio al terminal pre-sináptico a través del incremento en la señal de fluorescencia debida a la unión del calcio al indicador Fluo-3AM.

En primera instancia se evaluó si la reactivación de la memoria producía cambios en la entrada de calcio al terminal pre-sináptico. Se midió el influjo de calcio en sinaptosomas purificados de HD de un grupo de animales no expuestos a la sesión de reactivación (NR) y de un grupo expuesto a la misma (grupo R), tratados con SAL. El test T mostró diferencias significativas ($t = 5,23$; $df = 6$; $p < 0,005$) en los niveles de calcio entre los grupos NR y R (**Fig. 17**). Podemos concluir que se produce un aumento en la entrada de calcio al terminal pre-sináptico luego de la reactivación de la memoria, lo que se correlacionaría con el incremento observado en la liberación de glutamato.

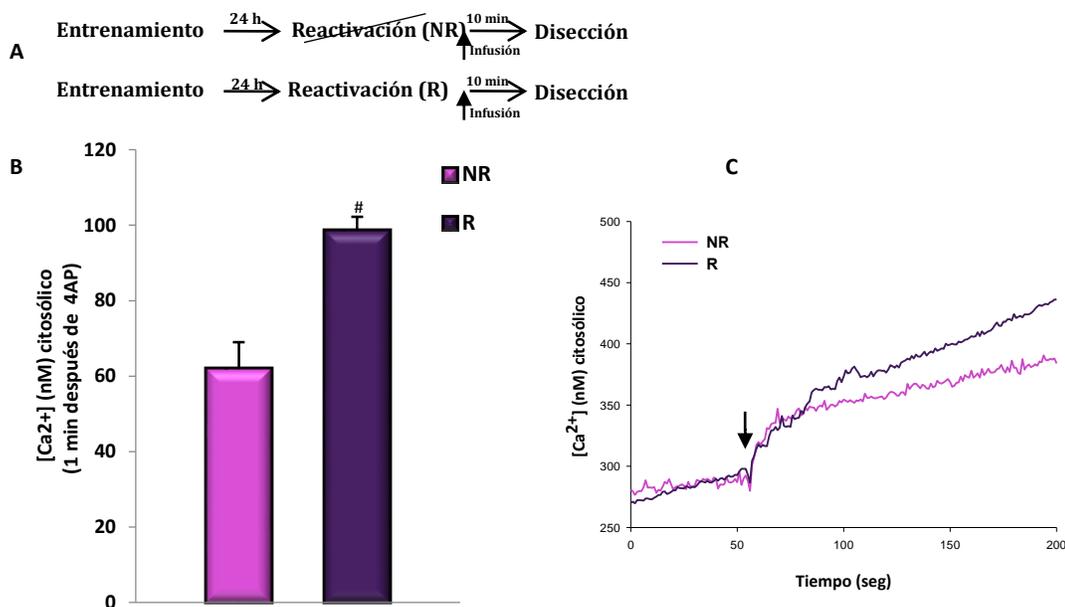


Figura 17. Influjos de calcio al terminal sináptico luego de la reactivación de una memoria de miedo contextual. **A.** Esquema experimental. **B.** Los grupos reactivado y sin reactivar fueron sacrificados 10 min después de la infusión con salina. Los valores registrados se expresan como la media (a 1 min) \pm EEM. Test T # $p < 0,005$ respecto del grupo NR ($n = 3-5$ por grupo). **C.** Curvas representativas del influjos de calcio, correspondiente a distintos grupos experimentales. El influjos de calcio dependiente del voltaje fue inducido por 4AP (flecha).

A continuación se evaluó el efecto de IL-1 β sobre el influjos de calcio determinado luego de la reactivación de la memoria. Para ello, animales entrenados y cuya memoria fue reactivada, fueron tratados con SAL (SAL+SAL) o IL-1 β (IL-1 β +SAL) inmediatamente después de la reactivación. En los sinaptosomas obtenidos del grupo infundido con IL-1 β se observó un influjos de calcio menor al grupo control (**Fig. 18**).

Se determinó además el efecto de α -MSH sobre la disminución en el influjos de calcio observada luego del tratamiento con IL-1 β . El tratamiento con α -MSH revirtió el efecto de IL-1 β sobre el influjos de calcio luego de la reactivación de la memoria. El análisis estadístico (ANOVA de una vía) reveló una diferencia significativa en el tratamiento [$F(5,21) = 13,45$; $p < 0,001$]. El análisis post hoc de Newman-Keuls indicó que el influjos de calcio en el grupo tratado con IL-1 β fue

significativamente diferente a los otros grupos ($p < 0,05$); además, los grupos α -MSH+SAL e IL-1 β + α -MSH no son estadísticamente diferentes del grupo control (SAL+SAL).

Para determinar el MCR involucrado en el efecto de α -MSH se emplearon dos antagonistas de dichos receptores: SHU9119 (antagonista de los receptores MC3/MC4) y HS014 (antagonista selectivo del receptor MC4). Se administraron los tratamientos: IL-1 β + SHU9119 + α -MSH (IL-1 β /SHU+ α -MSH), IL-1 β + HS014 + α -MSH (IL-1 β /HS+ α -MSH), SHU9119 + SAL (SHU+SAL) o HS014 + SAL (HS+SAL) luego de la sesión de reactivación de la memoria (**Fig. 18**). El influjo de calcio fue significativamente diferente en el grupo tratado con IL-1 β /SHU+ α -MSH respecto a los grupos tratados con IL-1 β +SAL y SAL+SAL ($p < 0,05$), es decir, el tratamiento con el antagonista SHU9119 revierte parcialmente el efecto de α -MSH. El análisis estadístico, también, reveló que el grupo tratado con IL-1 β /HS+MSH no es estadísticamente diferente del grupo SAL+SAL, ni del grupo IL-1 β + α -MSH, indicando que el bloqueo del receptor MC4 no revirtió el efecto de α -MSH.

Debido a que la inyección de SHU9119 produce una reversión parcial del efecto de α -MSH sobre la reducción en el influjo de calcio inducida por IL-1 β y que HSO14 no revierte el efecto de la melanocortina, es posible que α -MSH produzca su efecto mediante la activación del receptor MC3.

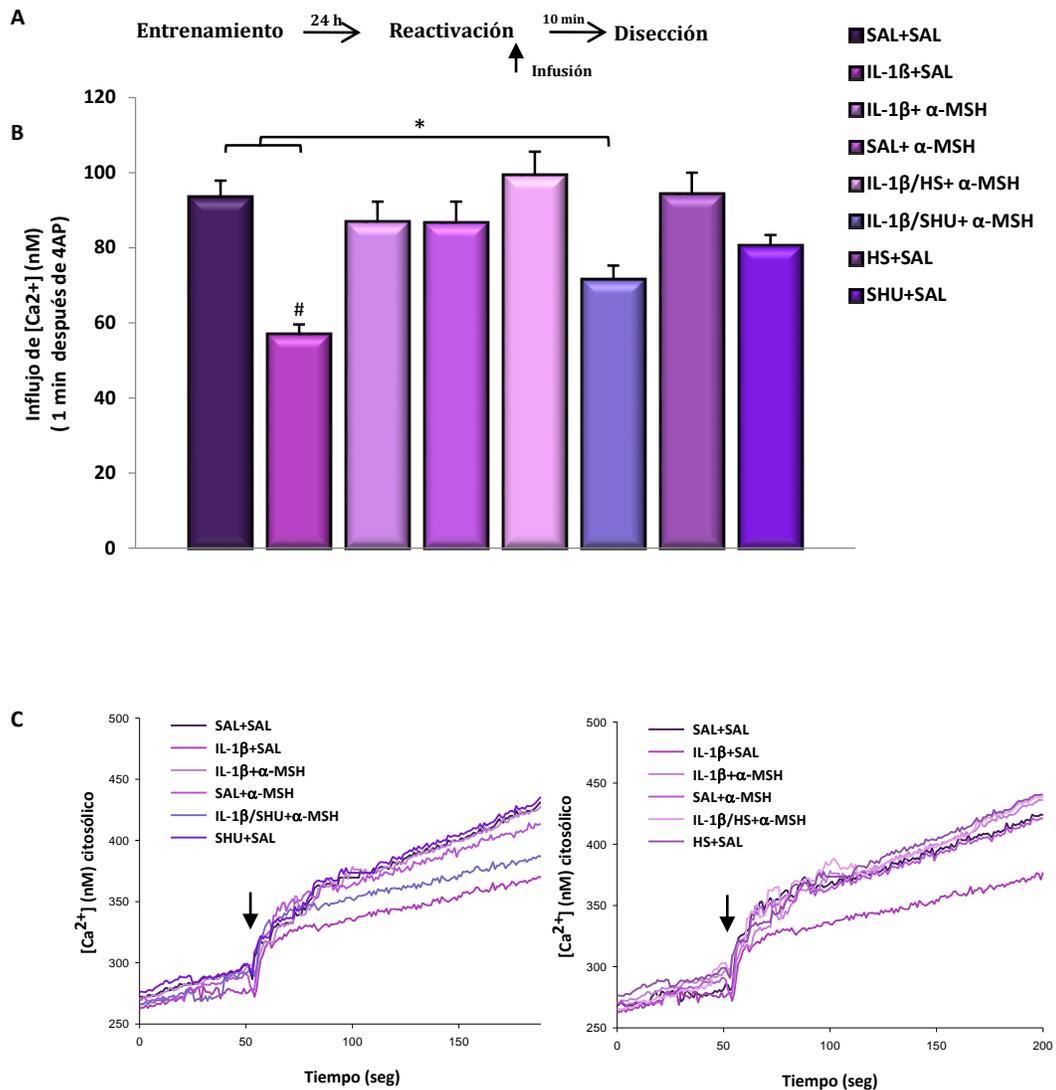


Figura 18. Efecto de IL-1 β sobre el influjo de calcio luego de la reactivación de una memoria contextual de miedo. Modulación por α -MSH y receptores melanocortinérgicos involucrados. **A.** Esquema experimental. **B.** Después de la reactivación de una memoria de miedo contextual los animales recibieron los distintos tratamientos y fueron sacrificados 10 min después. Los valores registrados se expresan como la media (a 1 min) \pm EEM. ANOVA de una vía # $p < 0,05$ respecto de los otros grupos, * $p < 0,05$ respecto de SAL+SAL e IL-1 β +SAL (n=4-5 por grupo). **C.** Curvas representativas del influjo de calcio, correspondiente a los distintos grupos experimentales. El influjo de calcio dependiente del voltaje fue inducido por 4AP (flecha).

Conclusiones del capítulo: durante la reconsolidación de una memoria contextual de miedo se produjo un aumento en el influjo de calcio en sinaptosomas hipocampales, que probablemente

estaría correlacionado con el incremento en la liberación de glutamato observado. IL-1 β reduce la entrada de calcio al terminal sináptico y en consecuencia la liberación de glutamato luego de la reactivación de la memoria. α -MSH revierte el efecto de IL-1 β sobre el influjo de calcio (a través de la activación del receptor MC3) y la liberación de glutamato, lo que podría ser un mecanismo clave para impedir el deterioro sobre el proceso de reconsolidación de la memoria.

Capítulo 3

Efecto de IL-1 β sobre la activación de ERK2 y expresión de zif268 en hipocampo, durante el proceso de reconsolidación y modulación por α -MSH sobre dichos procesos.

I- Efecto de los distintos tratamientos sobre la fosforilación de ERK2

Los procesos plásticos en memoria, entre los que se encuentran la LTP, sinaptogénesis y neurogenesis, entre otros; requieren de proteínas quinasas, enzimas que transfieren grupos fosfatos a una proteína en un sitio específico (serina, treonina o tirosina). Numerosos estudios han correlacionado las quinasas con procesos de memoria y aprendizaje. Se describió que estas proteínas son capaces de regular la transmisión sináptica alterando las propiedades de los canales iónicos o su densidad, o afectar la estructura sináptica o la sinaptogénesis al alterar la síntesis de determinadas proteínas (Giese y Mizuno, 2013). Dentro de estas quinasas se encuentra la familia de MAPK. Esta familia consiste en 7 quinasas: ERK 1, 2 y 5; quinasas n-terminales c-Jun (JNKs) 1-3 y p-38 (Giese y Mizuno, 2013). ERK 1/2 están involucradas en la señalización necesaria para el proceso de consolidación de la memoria (Chwang et al., 2007), así como en procesos inducidos por la evocación de la memoria. Se observó que la fosforilación de ERK 1/2 es necesaria para la reconsolidación de una memoria de reconocimiento de objetos (Kelly et al., 2003), de miedo auditivo (Duvarci et al., 2005) y contextual (Chen et al., 2005).

IL-1 β es capaz de modular la activación de ERK 1/2 en cultivo de microglía de hipocampo (Saud et al., 2005), al igual que en el proceso de consolidación de una memoria (Gonzalez et al., 2013). Por otro lado, se ha observado que α -MSH produce activación de la vía de MAPK/ERK en diferentes modelos experimentales. Un agonista del receptor MC4, melanotan II, incrementó los niveles de ERK1/2 en vivo (Sutton et al., 2005), y un análogo sintético de las MCs, indujo incrementos dosis dependientes en la activación de las ERK en células CHO-K1 (Vongs et al., 2004).

Teniendo en cuenta que IL-1 β afecta el proceso de reconsolidación de la memoria contextual de miedo y con la intención de establecer los mecanismos moleculares sobre los que actúa, nos propusimos evaluar posibles cambios en la activación de la vía ERK1/2. Además, de acuerdo a los antecedentes mencionados, estudiamos la modulación de α -MSH sobre los efectos de IL-1 β en la activación de ERK1/2.

Se evaluó la fosforilación de ERK2 en diferentes grupos de ratas entrenadas y re-expuestas al contexto (para la reactivación de la memoria) tratadas inmediatamente con SAL o IL-1 β y sacrificadas 15, 30 o 60 min después, mediante western blot. La reactivación de la memoria indujo cambios en la fosforilación de ERK2 a los distintos tiempos como reveló el ANOVA de dos vías [$F(2,28) = 41,31$; $p < 0,001$]. El ANOVA demostró un efecto del tratamiento [$F(1,28) = 5,67$; $p < 0,05$], pero no en la interacción entre tratamiento y el tiempo [$F(2,28) = 1,29$; $p = 0,29$] (**Fig. 19**). Los patrones de cambios en la fosforilación de ERK a lo largo del tiempo son similares en ambos grupos. Sin embargo, se observó una reducción en el nivel de p-ERK2 en el grupo tratado con IL-1 β en comparación con el grupo tratado con salina a los 30 min. Para comparar estos grupos se realizó un análisis de contrastes dentro del ANOVA (Montgomery, 2001) que indicó una diferencia significativa entre ambos grupos [$F(1,10) = 7,52$; $p < 0,05$]. El efecto de IL-1 β observado es específico de la reactivación de la memoria debido a que la administración de la citocina en un grupo no reactivado y sacrificado 30 min después no difiere del control en las mismas condiciones [$t=1,04$; $df=5$; $p=0,36$].

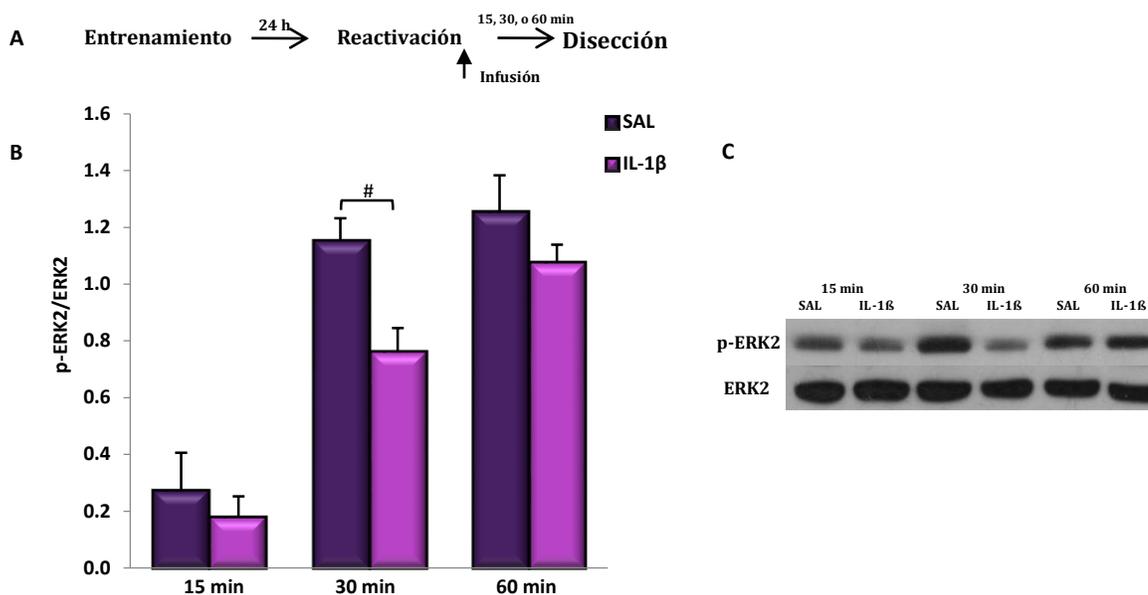


Figura 19. Efecto de IL-1 β sobre la fosforilación de ERK2 luego de la reactivación de una memoria contextual de miedo. **A.** Esquema experimental. **B.** Después de la reactivación de la memoria los animales fueron tratados con SAL o IL-1 β y sacrificados 15, 30 o 60 min después. La fosforilación de ERK2 se evaluó en homogenato total de HD por western blot. Los valores se expresan como la media de la relación p-ERK2/ERK2 \pm EEM, # $p < 0.05$ respecto de SAL 30 min ($n = 5-7$ por grupo). **C.** Western blot representativo de los niveles de p-ERK2 y de ERK2 total.

A continuación evaluamos el efecto de α -MSH sobre la disminución de la fosforilación de ERK2 producida por IL-1 β , 30 min después de la reactivación de la memoria. Los animales fueron tratados, después de la sesión de reactivación de la memoria, con: salina (SAL+SAL), IL-1 β (IL-1 β +SAL), α -MSH (α -MSH+SAL) o IL-1 β y α -MSH (IL-1 β + α -MSH). La inyección de α -MSH en HD luego del tratamiento con IL-1 β produjo niveles de p-ERK2 similares a los observados en el grupo control (**Fig. 20**). El ANOVA de una vía indicó un efecto significativo del tratamiento [$F(3,22) = 4.54$; $p < 0.05$] y el test de Newman-Keuls demostró que IL-1 β reduce de manera significativa la fosforilación de ERK2 en comparación a los otros grupos ($p < 0,05$) y el tratamiento con α -MSH revierte este efecto ($p < 0,05$). No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con SAL+SAL, SAL+ α -MSH e IL-1 β + α -MSH.

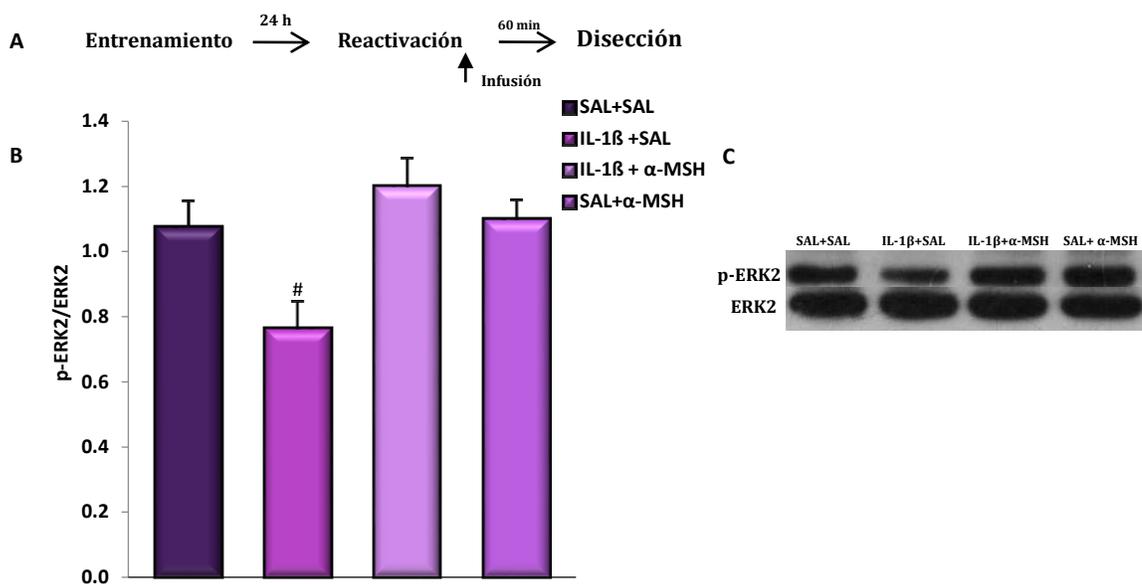


Figura 20. Efecto de α -MSH sobre la disminución en la fosforilación de ERK2 inducida por IL-1 β luego de la sesión de reactivación de una memoria contextual de miedo. **A.** Esquema experimental. **B.** los animales recibieron los distintos tratamientos luego de la reactivación de la memoria y fueron sacrificados 30 min después. Los valores se expresan como la media de la relación p-ERK2/ERK2 \pm EEM, # $p < 0.05$ respecto de los otros grupos (n=5-6 por grupo). **C.** Western blot representativo de los niveles de p-ERK2 y de ERK2 total.

II- Efecto de los distintos tratamientos sobre la expresión de zif-268

La vía de MAPK/ERK puede conducir a la activación de la proteína CREB y al factor Elk-1. ERK 1/2 a través de la fosforilación de CREB puede inducir un incremento en los niveles de zif268, entre otras proteínas efectoras, en hipocampo (Bozon et al., 2003; Davis et al., 2000). Zif268 también conocido como Egr-1 es un gen de expresión temprana (IEG) que codifica al factor de transcripción dedos de zinc (zif268). La expresión de la proteína zif268 ha sido relacionada con la inducción de la LTP (Cole et al., 1989), así como con el proceso de reconsolidación de una memoria contextual de miedo (Hall et al., 2001). IL-1 β es capaz de inducir la expresión de zif268 en queratinocitos epidérmicos humanos (Lukiw et al., 1998). Por otro lado, α -MSH puede inducir un incremento en la expresión de zif268 en modelos de isquemia cerebral (Giuliani

et al., 2009) y de la enfermedad de Alzheimer, a través de la activación del receptor MC4 (Giuliani et al., 2014).

Teniendo en cuenta estos antecedentes decidimos estudiar el efecto de IL-1 β sobre la expresión de zif268 en la reconsolidación de una memoria contextual de miedo, así como la posible modulación por α -MSH.

Se evaluó la expresión del factor de transcripción zif268 en HD mediante western blot a diversos tiempos luego de la sesión de reactivación. Diferentes grupos de animales fueron expuestos al contexto de condicionamiento, 24 h después del entrenamiento e inyectados inmediatamente después con salina o IL-1 β y sacrificados inmediatamente, 30 o 60 min después.

Los resultados mostraron un incremento en la expresión de zif268 a los 30 min que se mantuvo hasta los 60 min luego de la reactivación, en el grupo control. En el grupo de animales que recibió la infusión de IL-1 β , la expresión de zif268 fue menor que en el grupo control a los 60 min (**Fig. 21**). El ANOVA de dos vías indicó una interacción significativa entre tratamiento y tiempo [$F(2,28) = 3,61$; $p < 0,05$]. El análisis post hoc reveló un incremento significativo en la expresión de zif268 30 y 60 min después de la reactivación en relación al tiempo 0 ($p < 0,005$) en el grupo control. En los animales tratados con IL-1 β los niveles de expresión de zif268 a los 60 min fueron significativamente diferentes de los controles (**Fig. 21**). El efecto de IL-1 β observado es específico de la reactivación de la memoria debido a que la administración de la citocina en un grupo no reactivado y sacrificado 60 min después no difiere del control en las mismas condiciones [$t=0,74$; $df=5$; $p=0,49$].

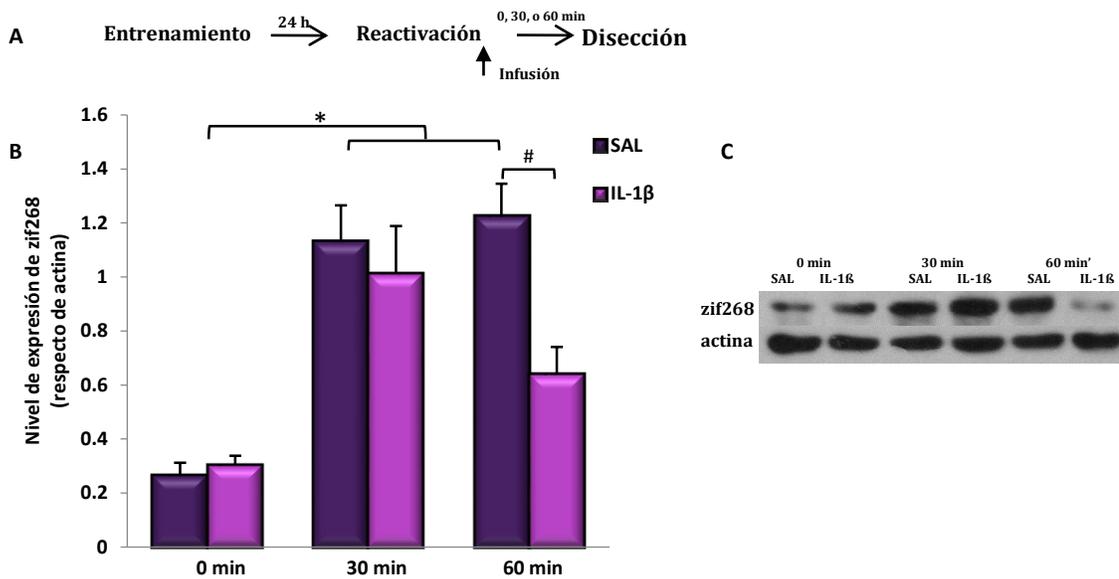


Figura 21. Efecto de IL-1 β sobre la expresión de zif268 luego de la reactivación de una memoria contextual de miedo. **A.** Esquema experimental. **B.** Después de la reactivación de una memoria de miedo contextual los animales fueron tratados con salina (SAL) o IL-1 β y sacrificados inmediatamente, 30 o 60 min después. Los valores se expresan como la media de la relación zif268/actina \pm EEM, # $p < 0.05$, * $p < 0.005$ respecto del grupo SAL 0 min ($n = 5-6$ por grupo). **C.** Western blot representativo de los niveles de zif268 y de actina.

En animales tratados con α -MSH los niveles de expresión del factor de transcripción 60 min después de la reactivación de la memoria fueron similares a los controles (**Fig. 22**). El ANOVA de una vía indicó un efecto significativo del tratamiento [$F(3,21) = 5.05$; $p < 0.01$]. El test de Newman-Keuls demostró que IL-1 β redujo significativamente la expresión de zif268 en relación al grupo control ($p < 0.05$) y que no hubo diferencias significativas entre los grupos tratados con SAL+SAL, SAL+ α -MSH e IL-1 β + α -MSH.

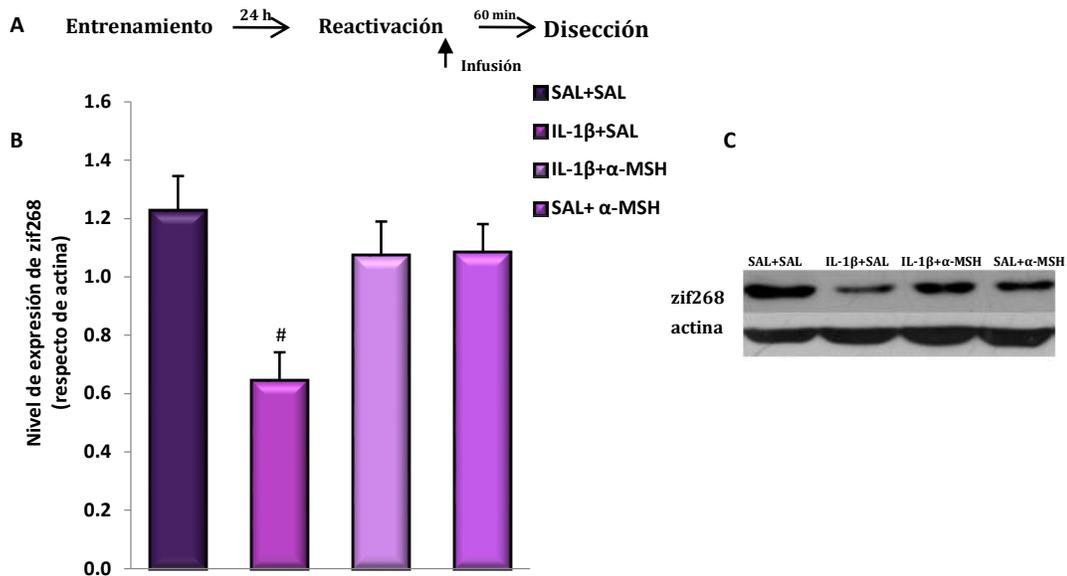


Figura 22. Efecto de α -MSH sobre la disminución en la expresión de zif268 inducida por IL-1 β luego de la sesión de reactivación de una memoria contextual de miedo. A. Esquema experimental. **B.** Después de la reactivación de una memoria de miedo contextual los animales recibieron los distintos tratamientos y fueron sacrificados 60 min después. Los valores se expresan como la media de la relación zif268/actina \pm EEM, # $p < 0,05$ respecto de los otros grupos ($n=6-7$ por grupo). **C.** Western blot representativo de los niveles de zif268 y de actina.

Conclusiones del capítulo: durante el proceso de reconsolidación de la memoria se observa un aumento en la fosforilación de ERK2 y en los niveles del factor zif268. IL-1 β produce una disminución en la activación de ERK2 y en la expresión de zif268 luego de la reactivación de una memoria contextual de miedo. Dada la importancia de estos mediadores en el proceso de reconsolidación, los efectos descritos podrían ser parte de los mecanismos a través de los cuales la citocina interfiere en este proceso. α -MSH es capaz de revertir estos efectos.

Capítulo 4

Efecto de IL-1 β sobre la fosforilación, expresión en la membrana celular y expresión total de la subunidad GluA1 del receptor AMPA. Rol modulador de α -MSH.

El proceso de reconsolidación de la memoria genera cambios estructurales en el número y tipo de espinas dendríticas. El tráfico de los receptores AMPA dentro y fuera de la membrana post-sináptica contribuye a esta forma de plasticidad (McKinney et al., 1999). Para la expresión del receptor AMPA en la superficie celular se requiere la fosforilación de la subunidad GluA1 en la serina 845 (p-Ser845 GluA1), la cual es dependiente de PKA (Esteban et al., 2003; Monfils et al., 2009) como también en la serina 831 (p-Ser831 GluA1), que es dependiente de CaMKII y PKC (Shepherd y Huganir, 2007). Recientemente, mediante el paradigma de evitación inhibitoria, se observó un incremento en la fosforilación de GluA1 en la serina 831 y la serina 845 luego de la reactivación de la memoria (Fukushima et al., 2014). IL-1 β fue capaz de afectar la fosforilación y expresión en superficie de receptores AMPA en un cultivo primario de neuronas de hipocampo (Lai et al., 2006). Por otro lado, la activación del receptor MC4 puede favorecer el tráfico de receptores AMPA hacia la superficie celular, a través de la fosforilación de GluA1 en la Serina 845, de manera dependiente de AMPc/PKA (Shen et al., 2013).

Nos propusimos evaluar la fosforilación de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en serina 831 y serina 845, su expresión en la superficie celular y el nivel de expresión total de esta subunidad luego de la reactivación de una memoria contextual de miedo. Además, teniendo en cuenta antecedentes previos, decidimos evaluar el efecto de IL-1 β sobre los parámetros mencionados y la posible modulación por α -MSH.

I- a) Efecto de los distintos tratamientos sobre la fosforilación de la subunidad GluA1 en Serina 831

Para determinar el efecto de IL-1 β sobre la fosforilación de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en serina 831 (dependiente de CaMKII /PKC) luego de la reactivación de la memoria, distintos grupos de animales fueron inyectados en HD con salina (SAL) o IL-1 β y sacrificados inmediatamente, a los 30 o 60 min posteriores. Los niveles de p-Ser831 GluA1 fueron determinados mediante western blot y normalizados a los valores de actina para cada muestra.

En el grupo control se observó un incremento en los niveles de p-Ser831 GluA1 60 min después de la reactivación de la memoria. En el grupo tratado con IL-1 β no se observó este aumento (Fig. 23). El ANOVA de dos vías indicó que existen diferencias en el tratamiento [$F(1,25) = 6,86$; $p < 0,05$], tiempo [$F(2,25) = 5,84$; $p < 0,01$] y en la interacción de las variables [$F(2,25) = 7,33$; $p < 0,005$]. El test post hoc de Newman Keuls indicó que el grupo SAL 60 min es significativamente diferente de los grupos SAL 0 min y 30 min, y del grupo IL-1 β 60 min. Estos resultados sugieren que IL-1 β es capaz de impedir el incremento en la fosforilación de GluA1 en serina 831 observado luego de la reactivación de una memoria contextual de miedo.

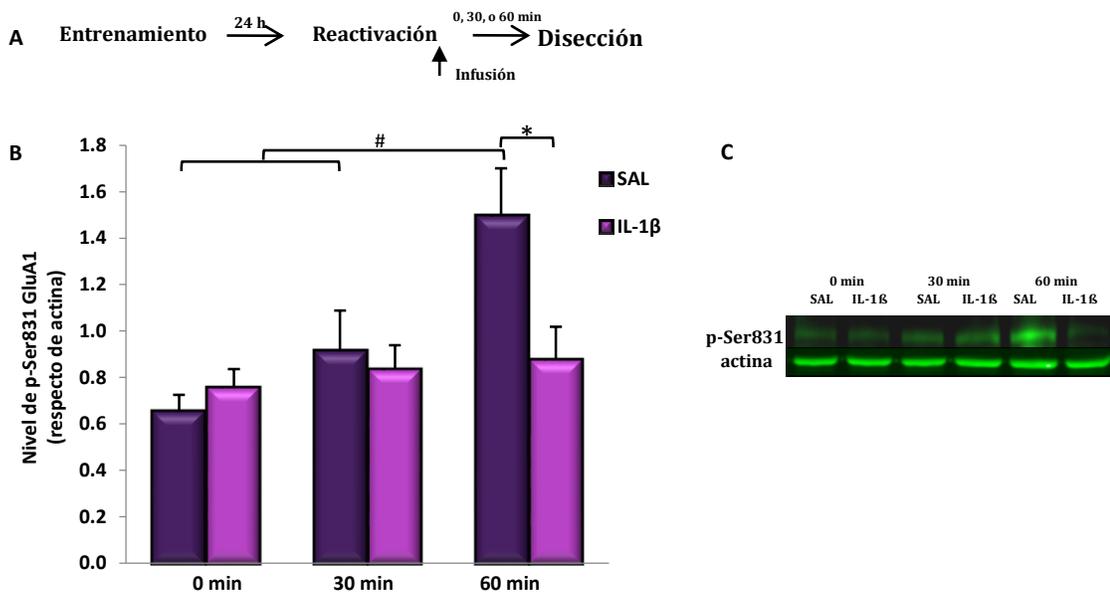


Figura 23. Efecto de IL-1 β sobre la fosforilación de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en serina 831 luego de la reactivación de la memoria. **A.** Esquema experimental. **B.** Después de la reactivación de una memoria de miedo contextual los animales fueron tratados con salina (SAL) o IL-1 β y sacrificados inmediatamente, 30 o 60 min después. Los valores se expresan como la media de la relación p-Ser831GluA1/actina \pm EEM, # $p < 0,01$ respecto de SAL 0 min y SAL 30 min, * $p < 0,005$ ($n = 4-7$ por grupo). **C.** Western blot representativo de los niveles de p-Ser831 GluA1 y de actina.

La administración de α -MSH no produjo cambios en los niveles de p-Ser831 GluA1, ni revirtió la disminución producida por IL-1 β en este proceso (**Fig. 24**). El ANOVA de una vía mostró un efecto significativo del tratamiento [$F(3,23) = 4,63$; $p < 0,05$]. El test post hoc Newman Keuls indicó que el grupo SAL+SAL es significativamente diferente de los grupos IL-1 β +SAL e IL-1 β + α -MSH pero no del grupo SAL+ α -MSH.

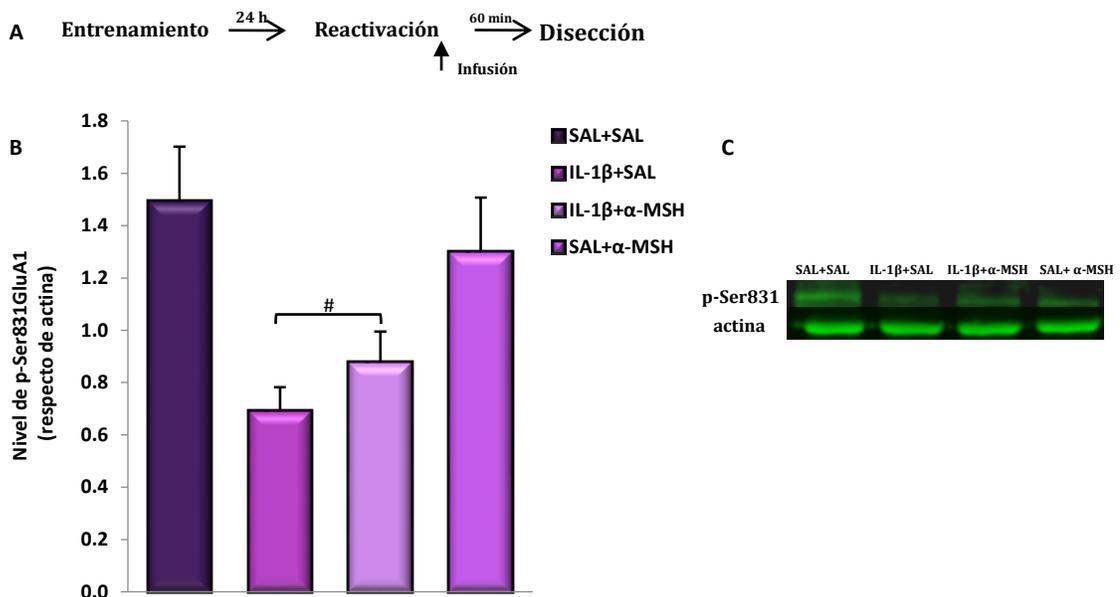


Figura 24. Efecto de α -MSH sobre la disminución de p-Ser831 GluA1 inducido por IL-1 β luego de la reactivación de la memoria contextual. A. Esquema experimental. **B.** Después de la reactivación de una memoria de miedo contextual los animales recibieron los distintos tratamientos y fueron sacrificados 60 min después. Los valores se expresan como la media de la relación p-Ser831GluA1/actina \pm EEM, # $p < 0,05$ respecto de los otros grupos, (n=5-8). **C.** Western blot representativo de los niveles de p-Ser831GluA1 y de actina.

I- b) Efecto de los distintos tratamientos sobre la fosforilación de la subunidad GluA1 en serina 845

El esquema experimental fue similar al descrito anteriormente para determinar la fosforilación de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en la serina 831. En el grupo control se observó un incremento marcado en los niveles de p-Ser845 GluA1 60 min luego de la reactivación, el cual

no se observó en el grupo tratado con IL-1 β (**Fig. 25**). El ANOVA de dos vías determinó que existe un efecto significativo del tratamiento [$F(1,36) = 5,15$; $p < 0,05$], tiempo [$F(2,36) = 6,03$; $p < 0,01$] e interacción entre las variables [$F(2,36) = 8,14$; $p < 0,001$]. El test Newman Keuls reveló una diferencia significativa entre el grupo SAL 60 min y los grupos SAL 0 min y SAL 30 min. El grupo tratado con IL-1 β y sacrificado 60 min después de la reactivación es estadísticamente diferente del grupo control a ese tiempo (**Fig. 25**).

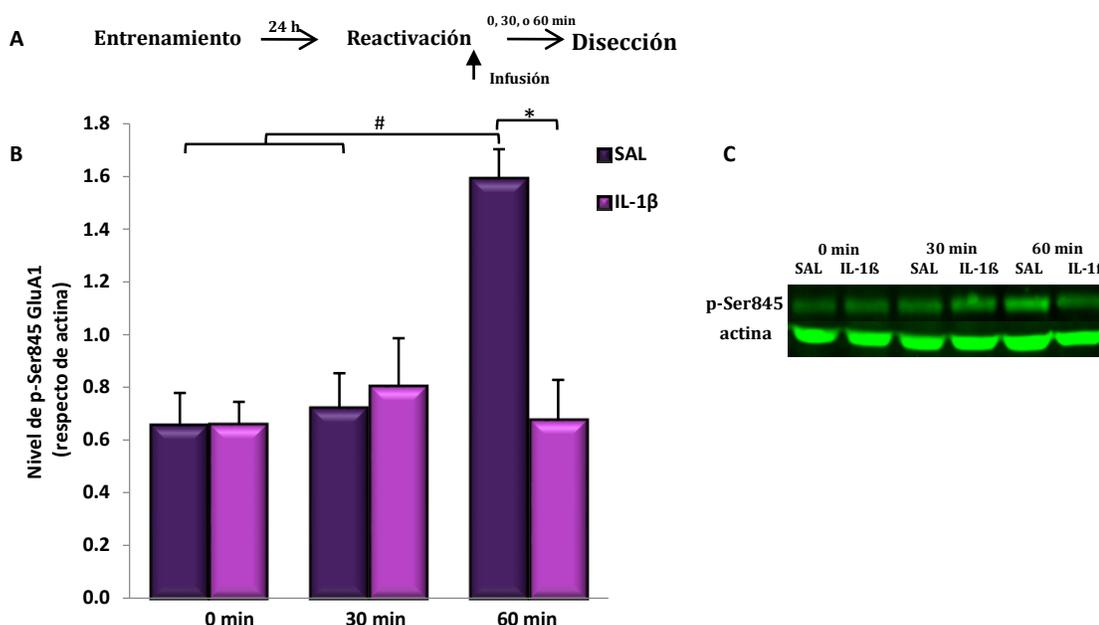


Figura 25. Efecto de IL-1 β sobre la fosforilación de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en serina 845 luego de la reactivación de la memoria. **A.** Esquema experimental. **B.** Después de la reactivación de una memoria de miedo contextual los animales fueron tratados con salina (SAL) o IL-1 β y sacrificados inmediatamente, 30 o 60 min después. Los valores se expresan como la media de la relación p-Ser845 GluA1/actina \pm EEM, # $p < 0,001$ respecto de SAL 0 min y SAL 30 min, * $p < 0,001$ ($n = 4-9$ por grupo). **C.** Western blot representativo de los niveles de p-Ser845 GluA1 y de actina.

El tratamiento con α -MSH revirtió el efecto de la citocina sobre la fosforilación de GluA1 en la serina 845, 60 min luego de la reactivación (**Fig 26**). El ANOVA de una vía demostró una diferencia significativa del tratamiento [$F(3,22) = 8,43$; $p < 0,001$]. El test post hoc indicó que IL-

IL-1 β redujo de manera significativa la fosforilación de GluA1 en serina 845 en comparación a los otros grupos analizados y no se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con SAL+SAL, SAL+ α -MSH e IL-1 β + α -MSH.

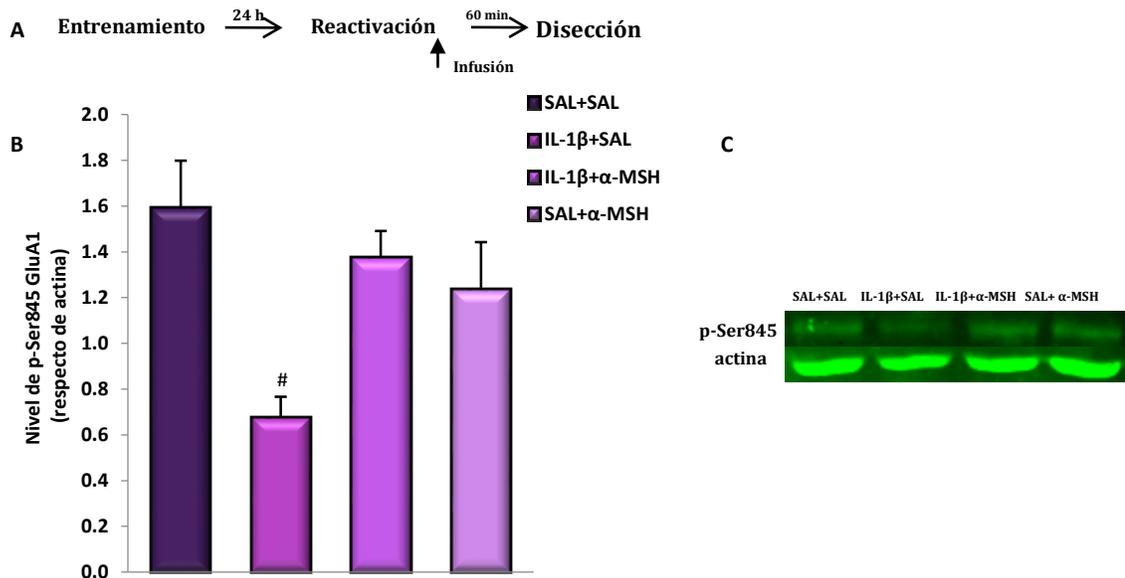


Figura 26. Efecto de α -MSH sobre la disminución de p-Ser845 GluA1 inducida por IL-1 β luego de la reactivación de la memoria contextual. A. Esquema experimental. **B.** Después de la reactivación de una memoria de miedo contextual los animales recibieron los distintos tratamientos y fueron sacrificados 60 min después. Los valores se expresan como la media de la relación p-Ser845GluA1/actina \pm EEM, # $p < 0,05$ respecto de los otros grupos, (n=5-8). **C.** Western blot representativo de los niveles de p-Ser845 GluA1 y de actina.

II- Efecto de los distintos tratamientos sobre la expresión en la superficie celular de la subunidad GluA1 del receptor AMPA.

IL-1 β es capaz de disminuir el incremento observado en la fosforilación de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en la Serina 831 y la Serina 845, 60 min después de la reactivación de la memoria. Este efecto podría inducir una disminución de la inserción del receptor AMPA en la superficie celular. Se determinó la expresión de GluA1 en superficie (GluA1-s) por western blot de muestras biotiniladas. Para estudiar el efecto de IL-1 β sólo o en combinación con α -MSH

sobre GluA1-s, los animales fueron inyectados con salina, IL-1 β , α -MSH o IL-1 β + α -MSH inmediatamente después de la reactivación de la memoria y sacrificados a los 60 min. El ANOVA de una vía reveló diferencias significativas en el tratamiento [F(3,25) = 3,81; p <0,001]. El test Newman-Keuls indicó que el grupo IL-1 β es estadísticamente diferente de los otros grupos y no se observaron diferencias entre los grupos SAL+SAL, SAL+ α -MSH e IL-1 β + α -MSH (Fig. 27).

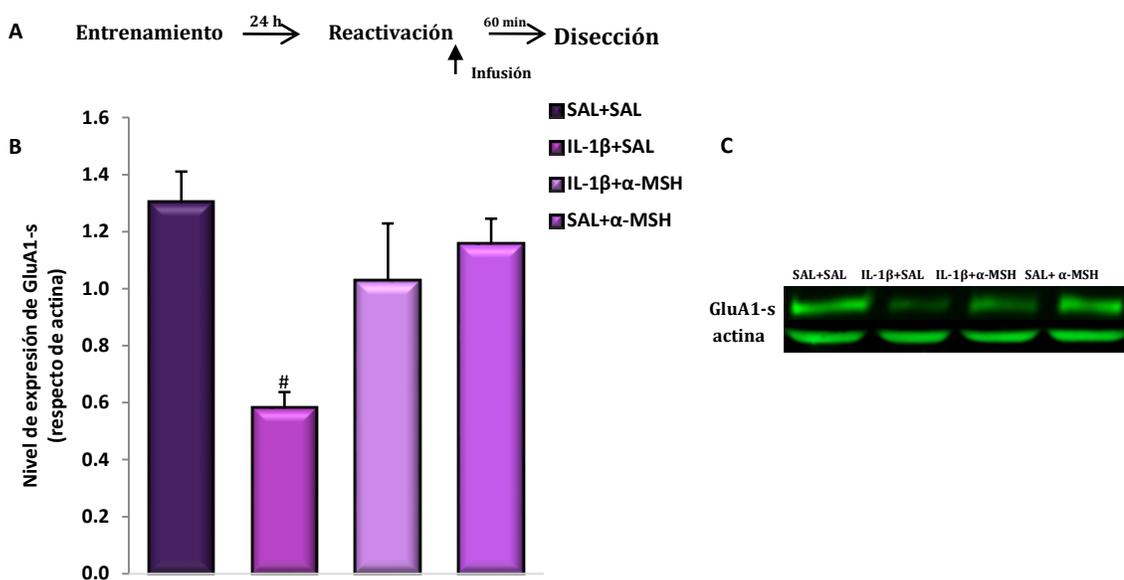


Figura 27. Efecto de los distintos tratamientos sobre los niveles de GluA1-s luego de la reactivación de la memoria contextual. **A.** Esquema experimental. **B.** Después de la reactivación de una memoria de miedo contextual los animales recibieron los distintos tratamientos y fueron sacrificados 60 min después. Los valores se expresan como la media de la relación GluA1-s/actina \pm EEM, # p<0,05 respecto de los otros grupos (n=5-8 por grupo). **C.** Western blot representativo de los niveles de GluA1-s y de actina.

III- Expresión de GluA1 total

Se evaluó el nivel de expresión de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en HD mediante western blot. Diferentes grupos de animales fueron expuestos al contexto de condicionamiento, 24 h después del entrenamiento e inyectados inmediatamente con salina o IL-1 β . Se sacrificaron inmediatamente, 30 o 60 min después. Los resultados mostraron un

incremento en los niveles de GluA1 en el grupo control a los 60 min (**Fig. 28**). El ANOVA de dos vías indicó una diferencia significativa en el tratamiento [$F(1,34) = 6,81$; $p < 0,05$], en el tiempo [$F(2,34) = 4,18$; $p < 0,05$] y en la interacción [$F(2,34) = 5,62$; $p < 0,01$]. El análisis post hoc reveló un incremento significativo en la expresión de GluA1 en el grupo control a los 60 min en relación a los tiempos 0 min y 30 min. La expresión de GluA1 en el grupo tratado con IL-1 β fue significativamente diferente al grupo SAL a los 60 min (**Fig. 28**).

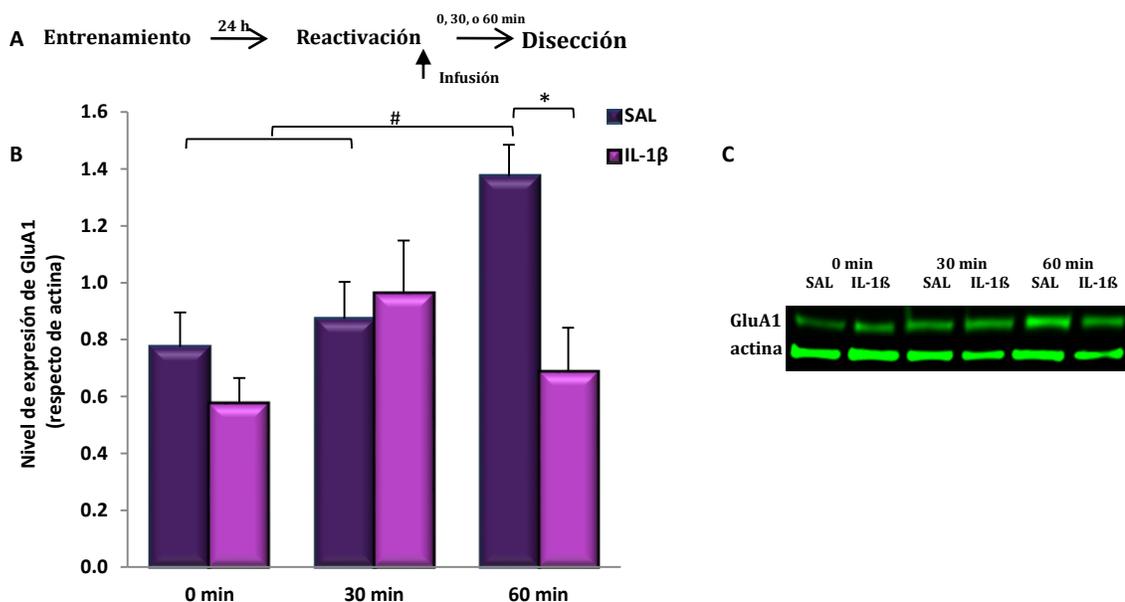


Figura 28. Efecto de IL-1 β sobre los niveles de expresión de GluA1 luego de la reactivación de la memoria. **A.** Esquema experimental. **B.** Después de la reactivación de una memoria de miedo contextual los animales recibieron los distintos tratamientos y fueron sacrificados inmediatamente, 30 o 60 min después. Los valores se expresan como la media de la relación GluA1/actina \pm EEM, # $p < 0,05$ respecto de SAL 0 min y 30 min * $p < 0,01$ ($n = 5-9$ por grupo). **C.** Western blot representativo de los niveles de GluA1 y de actina.

El tratamiento con α -MSH revierte el efecto de IL-1 β sobre la disminución en la expresión de la subunidad GluA1 en HD (**Fig. 29**). El ANOVA de una vía demostró una diferencia significativa en el tratamiento [$F(3,19) = 4,15$; $p < 0,05$]. El test de N-K indicó que el grupo tratado con IL-1 β es estadísticamente diferente de los otros grupos analizados (**Fig. 29**).

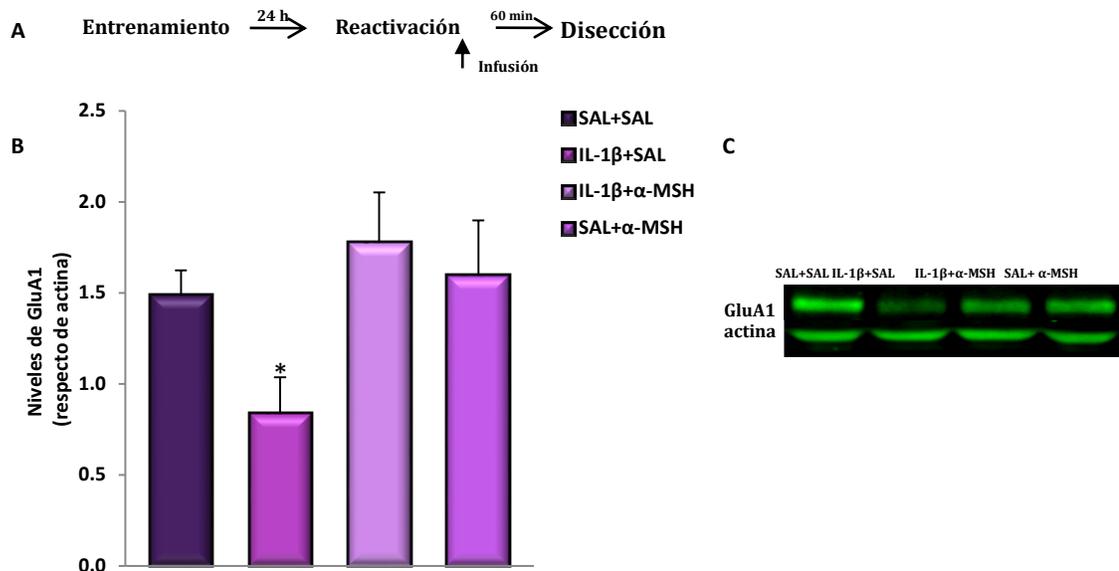


Figura 29. Efecto de α -MSH sobre la disminución en los niveles de GluA1 por IL-1 β después de la reactivación de una memoria de miedo contextual. **A.** Esquema experimental. **B.** Después de la reactivación de una memoria de miedo contextual los animales recibieron los distintos tratamientos y fueron sacrificados 60 min después. Los valores se expresan como la media de la relación GluA1/actina \pm EEM, * $p < 0,05$ respecto de los otros grupos, (n=5-7 por grupo). **C.** Western blot representativo de los niveles de GluA1 y de actina.

Conclusiones del capítulo: durante el proceso de reconsolidación de la memoria se observa un aumento en la fosforilación de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en los sitios Ser-831 y Ser-845, en la expresión en superficie de esta subunidad y en su expresión total. IL-1 β impide estos cambios luego de la reactivación de una memoria contextual de miedo. α -MSH revierte el efecto de la citocina sobre la fosforilación en Ser-845 GluA1 (dependiente de la fosforilación de PKA) pero no sobre la fosforilación en Ser-831GluA1 (dependiente de la fosforilación de CaMKII /PKC). Además revierte el efecto de IL-1 β sobre la expresión en superficie y total de GluA1.



Discusión

Ha sido ampliamente demostrado que el SI modula el funcionamiento del sistema nervioso. Cuando el SI se activa por una infección, lesión o en condiciones inflamatorias crónicas, así como situaciones estresantes crónicas o severas, células de la glía y/o algunas poblaciones de neuronas pueden secretar altos niveles de citocinas pro-inflamatorias y producir efectos perjudiciales sobre la memoria, la plasticidad y la neurogénesis. Además, patologías que cursan con niveles periféricos de citocinas elevados como las enfermedades autoinmunes o la administración con fines terapéuticos, se asocian a alteraciones cognitivas, en particular con déficits en el aprendizaje y la memoria (Yirmiya y Goshen, 2007).

El efecto de IL-1 β durante las etapas de aprendizaje y consolidación de la memoria ha sido ampliamente estudiado (Pugh et al. 1999; Pugh et al. 2001; Gonzalez et al. 2009; Hein et al. 2010). Sin embargo el efecto del tratamiento con IL-1 β sobre el proceso de reconsolidación de la memoria ha sido menos investigado (Machado et al. 2010; Kranjac et al. 2012). El proceso de reconsolidación de la memoria podría tener beneficios adaptativos al incorporar nueva información durante la evocación de la memoria. Además, permite disminuir o fortalecer un recuerdo. La posibilidad de modificar los recuerdos no deseados o traumáticos, convierten a la reconsolidación de la memoria en un proceso con potencial terapéutico para el tratamiento de diversos trastornos psiquiátricos (Soeter & Kindt 2010; Schwabe et al. 2012).

Las MCs son potentes agentes anti-inflamatorios en el SNC, ya que pueden contrarrestar o impedir efectos de las citocinas, actuando sobre su síntesis o mecanismos de acción (Catania et al. 2010; Caruso et al. 2014). En particular α -MSH a través de la activación del receptor melanocortinérgico MC4 es capaz de modular el efecto de IL-1 β sobre el proceso de consolidación de la memoria (Gonzalez et al. 2009).

En primera instancia se determinó el efecto de IL-1 β sobre el proceso de reconsolidación de una memoria de miedo contextual, evaluando los cambios en la expresión de dicha memoria medida como el porcentaje de tiempo de congelamiento. IL-1 β se administró en HD inmediatamente después de la sesión de reactivación. Los resultados demuestran que IL-1 β disminuye la retención de una memoria de miedo contextual respecto del grupo control durante la sesión de test. IL-1 β

incidiría específicamente sobre el proceso de reconsolidación, ya que la administración de la citocina en HD no produce efecto alguno cuando la memoria no es reactivada.

Trabajos anteriores determinaron que IL-1 β afecta la consolidación de memorias dependientes de hipocampo. Barrientos et al. (Barrientos et al. 2002) demostró que la administración de IL-1 β interfiere particularmente en el procesamiento de la representación contextual. El hipocampo es una estructura crítica tanto para la consolidación como así también, para la evocación y la reconsolidación de memorias contextuales (Abel y Lattal, 2001). Si bien no existen evidencias que demuestren que el efecto de IL-1 β sobre la reconsolidación de la memoria se debe a la interferencia en el procesamiento de la representación contextual mediada por el hipocampo, dados los antecedentes citados es probable que esto ocurra.

La reconsolidación de la memoria involucra una serie de procesos que se inician después de la evocación y se considera que estos procesos tienen lugar dentro de una ventana temporal luego de la misma. Se examinó la curva temporal del efecto de IL-1 β en la reconsolidación de la memoria, mediante su administración a diferentes tiempos después de la reactivación de la memoria. Los resultados indicaron que la administración en HD de IL-1 β hasta 60 minutos después de la reactivación interfiere con la reconsolidación de la memoria. El deterioro inducido por IL-1 β en la reconsolidación no es consecuencia de un daño en el hipocampo, ya que la administración de IL-1 β sin la reactivación de la memoria o 120 min después de la reactivación, no afecta la respuesta de miedo condicionado.

Se determinó que el efecto de IL-1 β sobre la retención de la memoria persiste hasta una semana después de la infusión de la citocina en HD.

Estos resultados constituyen la primera evidencia publicada del efecto de IL-1 β sobre la reconsolidación de una memoria de miedo contextual (Machado et al., 2010). Resultados similares fueron observados posteriormente con el tratamiento de LPS i.p.. El tratamiento con LPS induce un aumento en la expresión de IL-1 β en hipocampo (Bilbo et al. 2005) y deteriora tanto la consolidación como la reconsolidación de una memoria de miedo contextual (Kranjac et al., 2012).

Por otro lado, el tratamiento con la melanocortina α -MSH revierte de manera significativa el deterioro causado por IL-1 β sobre la reconsolidación de la memoria. Este claro efecto neuroprotectivo podría estar mediado por receptores MC3 y/o MC4, detectados en numerosas áreas cerebrales, incluyendo el hipocampo (Mountjoy et al. 1994; Schioth 2001). La administración de SHU9119 (antagonista de los receptores MC3 y MC4) o HSO14 (antagonista del receptor MC4) revierte el efecto de α -MSH sobre el deterioro inducido por IL-1 β en la reconsolidación de la memoria, sugiriendo que α -MSH podría ejercer su efecto a través de la activación de estos receptores, en hipocampo. Trabajos anteriores de nuestro grupo demostraron que α -MSH, a través del receptor MC4, revierte el efecto de IL-1 β sobre la consolidación de la memoria (Gonzalez et al., 2009). Aunque las MCs han sido implicadas en procesos de memoria (Mac Lay et al, 2001; Bertolini et al., 2009), la administración en hipocampo de α -MSH en la dosis descrita no produce efecto sobre la consolidación (Gonzalez et al., 2009) o la reconsolidación de una memoria de miedo contextual (Machado et al., 2010).

Los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de reconsolidación han sido estudiados en distintos modelos experimentales (Tronson y Taylor, 2007). En este trabajo nos propusimos evaluar en el paradigma de miedo asociado al contexto el efecto de IL-1 β y α -MSH sobre algunos de los mediadores que participan en la cascada de señalización de la reconsolidación de la memoria.

IL-1 β genera un deterioro en la retención de una memoria de miedo contextual administrada hasta 60 minutos después de la reactivación. Este período abarca desde mecanismos iniciales como la liberación de glutamato a mecanismos posteriores como síntesis proteica y cambios estructurales implicados en la reconsolidación de la memoria. Por lo tanto evaluamos la liberación de glutamato, activación de ERK, expresión del factor de transcripción zif268 y fosforilación, expresión en superficie y total de la subunidad GluA1 del receptor AMPA.

En la reconsolidación de la memoria es fundamental la activación de los receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA, y por ende la liberación de glutamato. Para evaluar la liberación de glutamato se aislaron sinaptosomas de HD luego de la reactivación y además en un grupo sin reactivación de la memoria, ambos infundidos con salina. Se observó un incremento en la liberación de glutamato en el grupo cuya memoria fue reactivada respecto del grupo sin

reactivación, indicando que la reactivación de una memoria de miedo contextual induce un aumento en la liberación de glutamato. Si bien ha sido estudiada la participación de receptores glutamatérgicos en el proceso de reconsolidación de la memoria a través del empleo de antagonistas o evaluando su expresión (Przybylski & Sara 1997; Suzuki et al. 2004), la determinación de la liberación de glutamato en correlación con el proceso de reconsolidación no había sido medida previamente. El tratamiento con IL-1 β impide el incremento en la liberación de glutamato luego de la reactivación de la memoria. Este efecto es específico del proceso de reconsolidación, ya que IL-1 β no produce cambios en la liberación de glutamato si la memoria no ha sido reactivada. En concordancia se ha descrito que IL-1 β es capaz de disminuir la liberación de glutamato en sinaptosomas de hipocampo luego de la LTP (Vereker et al., 2000; Kelly et al., 2003) y durante la consolidación de una memoria de miedo contextual (Gonzalez et al., 2013). El efecto de IL-1 β sobre la liberación de glutamato en sinaptosomas de hipocampo es mediado por el receptor IL-1RI (Murray et al., 1997). El receptor IL-1RI produce la activación de quinasas como p38 y JNK (Rothwell y Luheshi, 2000). La fosforilación p38 media la disminución en la liberación de glutamato inducida por IL-1 β en la LTP (Coogan et al. 1999) y en el proceso de consolidación de la memoria (Gonzalez et al., 2013).

Por otra parte, IL-1 β , mediante la activación del receptor IL-1RI es capaz de modular el influjo intracelular de calcio (Pita et al. 1999). IL-1 β inhibe la apertura de canales de calcio voltaje dependientes en hipocampo y este efecto podría estar relacionado con su capacidad de reducir la liberación de neurotransmisores y en consecuencia la transmisión sináptica (Plata-Salamán & French-Mullen 1994; Murray et al. 1996; MacManus 2000). En particular, se demostró que IL-1 β disminuye la liberación de glutamato inhibiendo el influjo de calcio, en cortes de hipocampo pre-tratados con la citocina por 15 minutos (Murray et al., 1996). Evaluamos si la reactivación de la memoria se correlacionaba con un incremento en el influjo de calcio a los sinaptosomas. Los resultados demuestran que el influjo de calcio es mayor cuando la memoria ha sido reactivada. El tratamiento con IL-1 β redujo el influjo de calcio dentro del terminal sináptico. Por lo tanto, es posible que IL-1 β afecte el proceso de reconsolidación de la memoria disminuyendo el influjo de calcio al terminal y por ende la liberación de glutamato.

Se ha demostrado que las corrientes de calcio podrían ser moduladas por una amplia variedad de hormonas, neuropéptidos y neurotransmisores (Armstrong et al. 1991; Catterall 2000). La activación de receptores melanocortinérgicos por α -MSH puede inducir aumento de AMPc y activación de PKA. Se ha demostrado que el incremento en AMPc y la fosforilación de proteínas por PKA son capaces de modular canales de calcio regulados por voltaje, provocando un aumento en el influjo de calcio (Bean et al., 1984). Luego de la administración de α -MSH en hipocampo después de la reactivación de la memoria no se observa el efecto de IL-1 β sobre la liberación de glutamato, probablemente como consecuencia de la normalización en la concentración de calcio. Adicionalmente, α -MSH disminuye la fosforilación de p38 en modelos experimentales de inflamación (Smalley & Eisen 2000; Yoon et al. 2003). En consecuencia, α -MSH podría inhibir los efectos de IL-1 β actuando directamente sobre los canales de calcio voltaje dependientes, restaurando los niveles de calcio y la liberación de glutamato, aunque también es posible que actúe inhibiendo las vías moleculares activadas por IL-1 β .

La activación de receptores MC3 y MC4 a nivel central puede modular las corrientes de calcio actuando sobre canales de calcio dependientes de voltaje (Konda et al., 1994; Mountjoy et al., 2001). El tratamiento con SHU9119 (antagonista MC3/MC4) produce niveles de influjo de calcio significativamente diferentes del grupo IL-1 β y del grupo control, es decir una reversión parcial del efecto de la citocina, mientras que el empleo de HS014 (antagonista del receptor MC4) no afecta la reversión del efecto de IL-1 β por α -MSH. Estos resultados indican que α -MSH ejerce su efecto sobre la entrada de calcio y sobre la liberación de glutamato posiblemente a través de la activación del receptor MC3.

La liberación de glutamato y la consecuente activación de receptores NMDA generalmente produce un aumento de la proteína quinasa ERK fosforilada. Particularmente, se ha demostrado que el proceso de consolidación induce un aumento en la fosforilación de ERK en hipocampo de manera dependiente de la activación del receptor NMDA (Athos et al. 2002; Chwang et al. 2006). En el proceso de reconsolidación de la memoria también se evidencia un aumento en la fosforilación de ERK en hipocampo (Chen et al., 2005; Besnard et al., 2013) posiblemente por un mecanismo similar. Por lo tanto, la reducción en la liberación de glutamato inducida por IL-1 β

podría interferir en la fosforilación de ERK durante la reconsolidación de la memoria. Los resultados indican que IL-1 β produce una disminución en la fosforilación de ERK2 30 minutos después de la reactivación de la memoria. En concordancia, trabajos previos demostraron que el tratamiento con IL-1 β disminuye la fosforilación de ERK en cultivos celulares (Saud et al., 2005) y durante la consolidación de una memoria de miedo contextual (Gonzalez et al., 2009).

La activación de ERK puede inducir la expresión del factor de transcripción zif268, a través de la proteína CREB y el factor Elk-1 (Davis et al. 2000; Tronson & Taylor 2007). Zif268 es una de las proteínas específicamente involucradas en la reconsolidación y su expresión aumenta durante este proceso en memorias de reconocimiento de objetos y memorias de miedo asociadas al contexto (Bozon et al., 2003; Lee et al., 2004; Besnard et al., 2013). Los resultados demuestran un incremento en la expresión de zif268 a los 30 min que se mantuvo hasta los 60 min luego de la reactivación de la memoria en HD, en el grupo control. La administración de IL-1 β disminuye el incremento en la expresión de zif268 60 minutos después de la sesión de reactivación de la memoria. Ha sido publicado, que la inyección i.p. de LPS en ratones produce un déficit en la reconsolidación de la memoria, inducido por un mecanismo independiente de zif268 (Kranjac et al., 2012) ya que no se encontraron cambios en la expresión del ARNm de zif268 en hipocampo 4 h después de la administración periférica de LPS. Las principales diferencias entre ambos modelos son la vía de administración y el tratamiento empleado, ya que, si bien LPS incrementa los niveles de IL-1 β y de otras citocinas en hipocampo, es difícil determinar la concentración alcanzada. Finalmente, quizás el factor más importante es el tiempo después de la reactivación en el que se determina el factor de transcripción zif268. Este es un factor de transcripción temprana (Tronson y Taylor, 2007), y en coincidencia, observamos una disminución en la proteína zif268 60 minutos luego de la reactivación de la memoria, mientras que en el trabajo de Kranjac evalúan el transcrito a las 4 horas y no encuentran diferencias respecto de los controles. Se ha determinado además que la administración de LPS por vía i.c.v. en ratones disminuye la expresión de zif268 en corteza, pero no en hipocampo (Bonow et al., 2009). En esta publicación los ratones no fueron sujetos a ningún tipo de paradigma de condicionamiento, a diferencia de nuestro

modelo en que la administración de IL-1 β se realiza inmediatamente después de la reactivación de la memoria.

Se evaluó el efecto de α -MSH sobre la activación de ERK2 y la expresión de zif268 luego de la administración de IL-1 β , durante la reconsolidación de la memoria. La administración de α -MSH en HD después del tratamiento con IL-1 β restaura los niveles de p-ERK2. En concordancia, ha sido publicado que esta melanocortina produce la activación de la vía de ERK en diferentes modelos experimentales. La administración de Melanotan II, agonista del receptor MC4, produce un aumento en la activación de ERK1/2 y en la fosforilación de CREB en un modelo de ingesta (Sutton et al., 2005). Además, NDP- α -MSH, un análogo sintético de la melanocortina con actividad biológica de larga duración, induce un aumento dosis dependiente en la activación de ERK en células CHO-K1 y GT1-1 (Vongs et al., 2004).

La reducción en la expresión de zif268 en HD inducida por IL-1 β no se observa luego del tratamiento con α -MSH. Se ha demostrado que las MCs son capaces de aumentar la expresión de zif268 en diferentes modelos experimentales asociados a inflamación. La isquemia a nivel central produce daño cerebral mediado por mecanismos excitotóxicos, apoptosis y respuesta inflamatoria exacerbada por citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β . Las MCs promueven la recuperación funcional de tejido cerebral luego de una isquemia a nivel central y el factor de transcripción zif268 está involucrado en este efecto (Giuliani et al., 2006; Giuliani et al., 2009). NDP- α -MSH también puede inducir neurogénesis después de un infarto cerebral, incrementando zif268 en hipocampo (Giuliani et al., 2011). La enfermedad de Alzheimer cursa con una serie de mecanismos que conducen al daño y muerte neuronal; entre las posibles causas se encuentra una respuesta inflamatoria aumentada (Giuliani et al., 2012). Las MCs protegen contra la progresión de la enfermedad de Alzheimer, a través de un efecto asociado con la sobre-expresión de zif268 en hipocampo (Giuliani et al., 2014).

Estos resultados sugieren que IL-1 β interfiere en el proceso de reconsolidación de una memoria de miedo contextual, a través de un mecanismo pre-sináptico que involucra la liberación de glutamato dependiente de calcio en HD. Como consecuencia de la disminución en la liberación de glutamato, y/o por un efecto a nivel post-sináptico, se observó un retraso temporal en la

activación de ERK2 y una reducción en la expresión zif268 durante el proceso de reconsolidación. α -MSH impide el efecto de la citocina sobre la reconsolidación de la memoria a través de un mecanismo que involucra la reversión en el influjo de calcio y la liberación de glutamato, restableciendo los niveles de p-ERK2 y zif268.

La activación de receptores NMDA permite el influjo de calcio al terminal post-sináptico, lo cual es crítico en activar proteínas quinasas como CaMKII, PKC y PKA, involucradas en la fosforilación de la subunidad GluA1 del receptor AMPA. El estado de fosforilación de GluA1 influencia la inserción del receptor AMPA en la membrana post-sináptica. Entre los sitios de fosforilación más estudiados se encuentran los aminoácidos serina 831 (fosforilado por CaMKII y PKC) y serina 845 (fosforilado por PKA). Los eventos mencionados han sido estudiados en correlación a la LTP (Bassani et al. 2013). Con respecto a la reconsolidación de la memoria existen evidencias similares. El proceso de reconsolidación de la memoria requiere del tráfico de receptores AMPA, evaluado tanto en memorias apetitivas como aversivas (Rao-ruiz et al. 2011; Yu et al. 2013; Jarome et al. 2012; Lopez et al. 2015). Este mecanismo es dependiente de la actividad del receptor NMDA, ya que el tratamiento con un antagonista luego de la evocación de la memoria lo afecta (Hong et al. 2013). Respecto de la fosforilación de la subunidad GluA1, diversos autores informaron un aumento en la fosforilación de GluA1 en serina 845 (Monfils et al., 2009; Jarome et al., 2012) y en la fosforilación en serina 831 (Fukushima et al., 2014) en relación a la reconsolidación de la memoria.

Hemos demostrado que, IL-1 β afecta el influjo de calcio y la liberación de glutamato a nivel pre-sináptico. Este efecto podría incidir sobre la activación de los receptores NMDA y fosforilación de los receptores AMPA. Por lo tanto, se evaluó la fosforilación de la subunidad GluA1 en serina 845 (p-Ser845 GluA1) y serina 831 (p-Ser831 GluA1) del receptor glutamatérgico AMPA durante la reconsolidación de la memoria. Observamos un incremento en la fosforilación de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en ambas serinas 60 minutos después de la reactivación de una memoria de miedo contextual. En concordancia con estos resultados, ha sido demostrado que la reactivación de una memoria de miedo asociada a una clave auditiva también induce un aumento en p-Ser845 GluA1 a los 60 minutos (Jarome et al. 2012). Otros autores describen un incremento

en p-Ser845 GluA1 a los 3 minutos y hasta 60 minutos luego de la reactivación de una memoria de miedo contextual, en amígdala lateral (Monfils et al., 2009); y en la fosforilación de ambas serinas 30 minutos después de la reactivación de una memoria de evitación inhibitoria, en hipocampo, amígdala y corteza (Fukushima et al., 2014). Las diferencias observadas pueden deberse tanto a las estructuras anatómicas analizadas como a los diferentes paradigmas conductuales.

A continuación, evaluamos el efecto de IL-1 β sobre la fosforilación de la subunidad GluA1 del receptor AMPA. IL-1 β redujo los niveles de fosforilación de esta subunidad en las serinas 831 y 845, 60 minutos después de la reactivación de la memoria. En concordancia, otros autores demostraron que IL-1 β es capaz de afectar la fosforilación y expresión en superficie de receptores AMPA en un cultivo primario de neuronas de hipocampo (Lai et al., 2006).

La fosforilación de la subunidad GluA1 se asocia con la inserción en la membrana celular del receptor AMPA (Blackstone et al. 1994; Esteban et al. 2003; Shepherd & Huganir 2007). Evaluamos entonces, si la disminución observada en la fosforilación de la subunidad GluA1 inducida por IL-1 β se reflejaba en un cambio en la expresión en la superficie celular de esta subunidad. Acorde a la hipótesis planteada, demostramos que en el grupo tratado con IL-1 β se produjo una disminución en la expresión en superficie de la subunidad GluA1, en relación al grupo control. La fosforilación de la subunidad GluA1 es indispensable para la inserción en superficie del receptor AMPA y dado que IL-1 β la altera, disminuye dicha inserción.

Además, la expresión del receptor AMPA en la membrana celular se encuentra regulada por la actividad de proteínas quinasas como ERK2 y p38 (Seger & Krebs 1995; Zhu et al. 2002; Man et al. 2003; Corrêa & Eales 2012). La fosforilación de la proteína ERK induce la expresión en superficie del receptor AMPA por un mecanismo mediado por Ras, una GTPasa pequeña involucrada en la transducción de señales intracelulares (Zhu et al., 2002; Esteban, 2003). En relación a estos antecedentes, IL-1 β a través de la disminución en la fosforilación de ERK2 durante la reconsolidación de la memoria podría afectar la expresión en superficie de los receptores AMPA. Por otro lado otra GTPasa pequeña, la proteína Rap, media la remoción o endocitosis de AMPA de manera dependiente de la activación de p38 (Zhu et al., 2002, Esteban, 2003). Cuando el

receptor para IL-1 β se activa aumenta la fosforilación de p38. IL-1 β podría estar afectando la expresión en la superficie celular de la subunidad GluA1 del receptor AMPA como consecuencia de una disminución en la fosforilación de ERK2 y/o activación de p38. Resultados previos de nuestro grupo demuestran que la administración de IL-1 β en hipocampo aumenta la fosforilación de p38 y que el tratamiento con un inhibidor de p38 revierte parcialmente el efecto de IL-1 β sobre la consolidación de una memoria contextual de miedo (Gonzalez et al, 2013). No hemos determinado la activación de la proteína p38 luego del tratamiento con IL-1 β en relación al deterioro observado en la reconsolidación de la memoria. Sin embargo, es probable que la citocina actué también por esta vía.

Se evaluó el efecto de α -MSH sobre la disminución en las fosforilaciones de la subunidad GluA1 inducida por IL-1 β durante el proceso de reconsolidación. α -MSH fue capaz de revertir el efecto de IL-1 β sobre la fosforilación de GluA1 en la serina 845 pero no tuvo efecto sobre la fosforilación de la subunidad en la serina 831. Por otro lado, el tratamiento con α -MSH revirtió el efecto de la citocina sobre la disminución en la expresión en la superficie celular de GluA1 luego de la reactivación de la memoria. La activación del receptor MC4 se asocia a la vía de señalización proteína G-AMP_c-PKA. En neuronas de hipocampo en cultivo se observó que la activación del receptor MC4 estimula la fosforilación de GluA1 en serina 845 y la expresión en superficie de esta subunidad de manera dependiente de PKA; no se observaron cambios sobre la fosforilación de GluA1 en la serina 831 (Abel & Nguyen 2008; Shen et al. 2013). De modo que, el efecto de α -MSH sobre p-Ser845 GluA1 y la inserción en membrana del receptor parece estar relacionado con la activación del receptor MC4 a nivel post-sináptico.

Trabajos previos establecieron que la activación de CaMKII y la fosforilación de la subunidad GluA1 en serina 845, pero no así fosforilación de la subunidad GluA1 en serina 831, son necesarios para lograr la expresión en superficie de receptores AMPA que contienen esta subunidad (Hayashi et al. 2000; Esteban et al. 2003). Estos antecedentes avalan los resultados presentados; α -MSH revierte la disminución en la expresión en superficie de GluA1 debido a que revierte el efecto sobre la fosforilación en serina 845, sin modificar la disminución en la fosforilación de GluA1 en serina 831.

IL-1 β disminuye la liberación de glutamato a nivel pre-sináptico y en consecuencia podría afectar a nivel post-sináptico la activación de proteínas quinasas involucradas en la fosforilación de la subunidad GluA1 del receptor AMPA y de esta manera disminuir la inserción de este receptor en la membrana. Adicionalmente, también podría afectar la expresión en superficie de AMPA mediante un mecanismo post-sináptico a través de p38. α -MSH revierte el efecto de la citocina sobre la liberación de glutamato probablemente a través de la activación del receptor MC3; además incide sobre la fosforilación de GluA1 en serina 845 y sobre la expresión en superficie de AMPA posiblemente a través de la activación del receptor MC4.

Generalmente cuando se determina la fosforilación de la subunidad GluA1 se utiliza como proteína control la expresión de dicha subunidad (total) considerando que no varía (Shen et al., 2013; Fukushima et al, 2014). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la expresión de la subunidad GluA1 aumentó 60 minutos después de la sesión de reactivación de la memoria, en el grupo control. Estos resultados constituyen la primera evidencia de cambios en la expresión de la subunidad GluA1 durante el proceso de reconsolidación de la memoria. El aumento observado 60 minutos después de la reactivación de la memoria sería posible debido a que ha sido descrita la síntesis local del receptor AMPA en dendritas. El ARN se moviliza a través del citoesqueleto mediante un complejo proteína-ARN y puede ser traducido localmente por polirribosomas en respuesta a la actividad neuronal (Shepherd & Huganir 2007; Anggono & Huganir 2012). El tratamiento con IL-1 β impide el aumento en la expresión de la subunidad GluA1 a los 60 minutos y el tratamiento con α -MSH revierte este efecto. Por el momento, no es posible establecer los mecanismos de acción de IL-1 β y α -MSH responsables del efecto observado. Estas evidencias constituyen información novedosa sobre la modulación en la síntesis de GluA1 del receptor AMPA durante la reconsolidación de la memoria.

En conjunto, podemos concluir que IL-1 β deteriora la reconsolidación de la memoria de miedo contextual activando mecanismos neuronales a nivel pre-sináptico que implican una disminución en el flujo de calcio y en la liberación de glutamato. La disminución en la liberación de glutamato, y probablemente la activación del receptor IL-1RI a nivel post-sináptico, resulta en un desfase temporal en la activación de ERK y reducción en los niveles de zif268. Adicionalmente,

IL-1 β afecta la fosforilación, expresión en superficie y expresión total de la subunidad GluA1 del receptor AMPA durante la reconsolidación de la memoria. Por otra parte, la melanocortina α -MSH actúa a nivel pre-sináptico a través del receptor MC3 revirtiendo el efecto de IL-1 β a través de un mecanismo que involucra cambios en el influjo de calcio y en consecuencia la liberación de glutamato. Además, α -MSH actúa a nivel post-sináptico posiblemente mediante la activación del receptor MC4 revirtiendo el desfasaje en la activación de ERK y disminución de zif268, y los efectos sobre la subunidad GluA1 del receptor AMPA. El siguiente esquema representa los hallazgos encontrados en relación a este trabajo de tesis (**Fig. 30**).

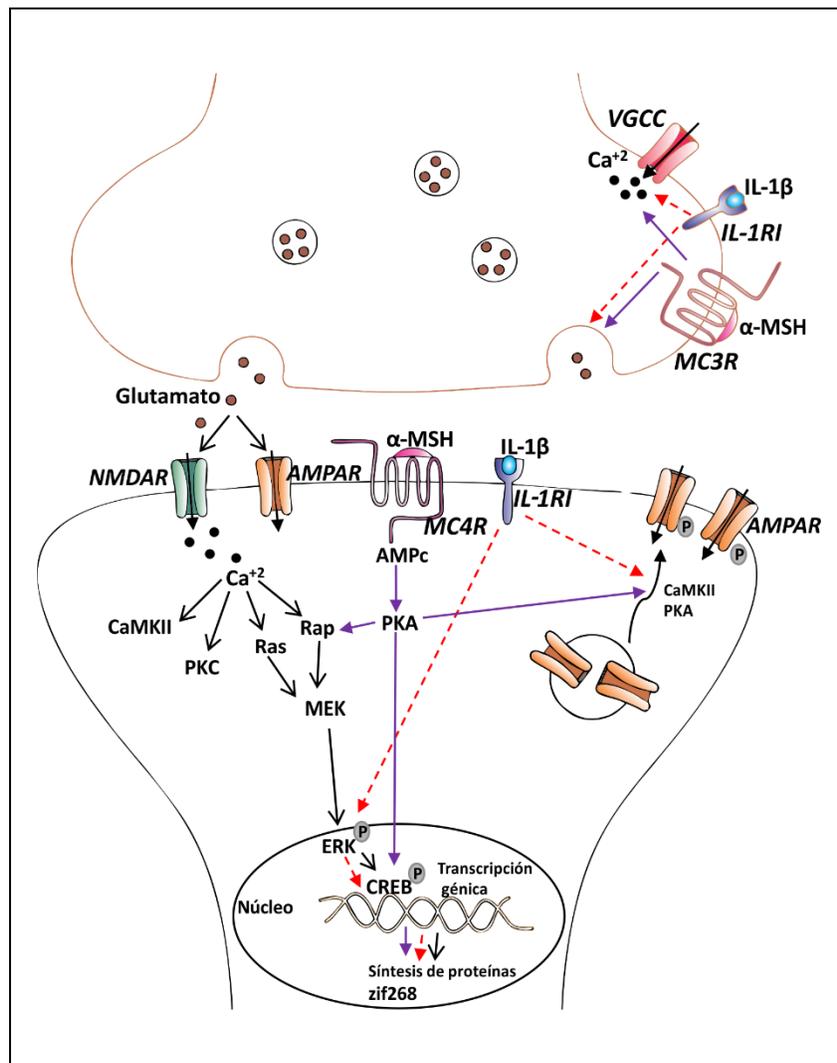
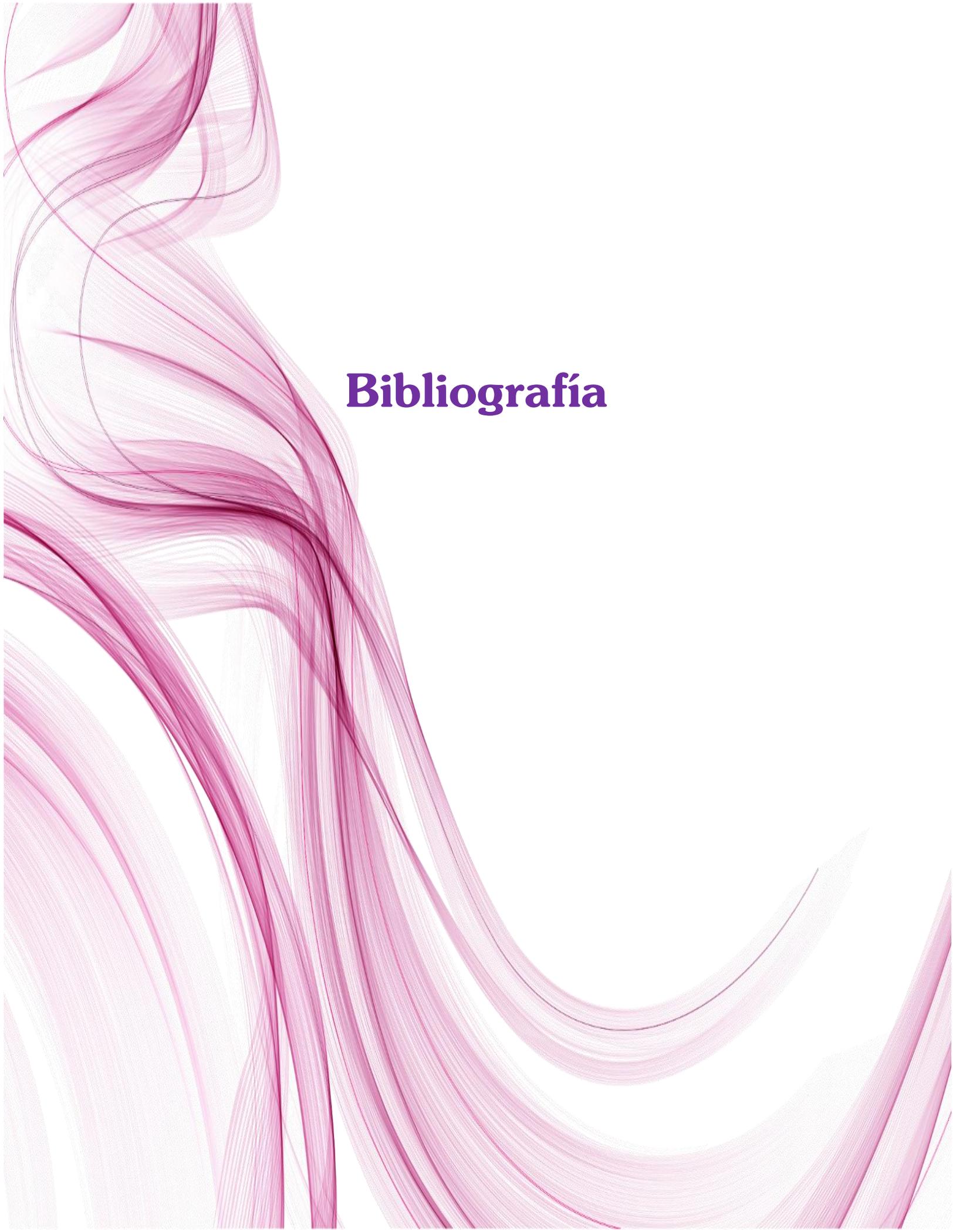


Figura 30. Posibles mecanismos moleculares afectados por IL-1 β sobre el proceso de reconsolidación de una memoria de miedo contextual y su modulación por α -MSH. Para mayor detalle ver texto. Figura adaptada de Caruso et al., 2014.

Los eventos bioquímicos estudiados forman parte de los sustratos neurobiológicos implicados en el deterioro de la reconsolidación de una memoria de miedo contextual por acción de IL-1 β . El estudio de los mecanismos moleculares implicados en el efecto de la IL-1 β sobre la reconsolidación de la memoria podría proporcionar nuevos conocimientos sobre la participación de esta citocina en la función cognitiva normal y en los trastornos neurodegenerativos

caracterizados por niveles elevados de citocinas en áreas específicas del SNC. Por otra parte, α -MSH ejerce un rol modulador beneficioso al revertir los efectos de IL-1 β sobre la reconsolidación. Este efecto, junto a su baja toxicidad, plantea la posibilidad a futuro de emplearse en el tratamiento de los efectos perjudiciales de las citocinas a nivel central durante procesos inflamatorios.



Bibliografía

- Abdel-Malek, Z.A., 2001. Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 434-41.
- Abel, T., Lattal, K.M., 2001. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 180-7.
- Abel, T., Nguyen, P. V., 2008. Regulation of hippocampus-dependent memory by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Prog. Brain Res.* 169, 97-115. doi:10.1016/S0079-6123(07)00006-4
- Abu Faddan, N.H., Shehata, G.A., Abd Elhafeez, H.A., Mohamed, A.O., Hassan, H.S., Abd El Sameea, F., 2015. Cognitive function and endogenous cytokine levels in children with chronic hepatitis C. *J. Viral Hepat.* 22, 665-70. doi:10.1111/jvh.12373
- Alberini, C.M., 2009. Transcription Factors in Long-Term Memory and Synaptic Plasticity. *Physiol Rev* 89, 121-145. doi:10.1152/physrev.00017.2008.
- Anggono, V., Huganir, R.L., 2012. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 461-9. doi:10.1016/j.conb.2011.12.006
- Armstrong, D.L., Rossier, M.F., Shcherbatko, A.D., White, R.E., 1991. Enzymatic Gating of Voltage-Activated Calcium Channels. *Ann NY Acad Sci* 635, 26-34. doi:10.1111/j.1749-6632.1991.tb36478.x
- Athos, J., Impey, S., Pineda, V. V., Chen, X., Storm, D.R., 2002. Hippocampal CRE-mediated gene expression is required for contextual memory formation. *Nat. Neurosci.* 5, 1119-20. doi:10.1038/nn951
- Avital, A., Goshen, I., Kamsler, A., Segal, M., Iverfeldt, K., Richter-Levin, G., Yirmiya, R., 2003. Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity. *Hippocampus* 13, 826-34. doi:10.1002/hipo.10135
- Balschun, D., Randolph, A., Pitossi, F., Schneider, H., Del Rey, A., Besedovsky, H.O., 2003. Hippocampal interleukin-1 beta gene expression during long-term potentiation decays with age. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 992, 1-8.
- Banks, W.A., Ortiz, L., Plotkin, S.R., Kastin, A.J., 1991. Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259, 988-96.
- Barnes, P., Kirtley, A., Thomas, K.L., 2012. Quantitatively and qualitatively different cellular processes are engaged in CA1 during the consolidation and reconsolidation of contextual fear memory. *Hippocampus* 22, 149-171. doi:10.1002/hipo.20879
- Barreiro, K.A., Suárez, L.D., Lynch, V.M., Molina, V.A., Delorenzi, A., 2013. Memory expression is independent of memory labilization/reconsolidation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 106, 283-291. doi:10.1016/j.nlm.2013.10.006

- Barrientos, R.M., Higgins, E. a, Sprunger, D.B., Watkins, L.R., Rudy, J.W., Maier, S.F., 2002. Memory for context is impaired by a post context exposure injection of interleukin-1 beta into dorsal hippocampus. *Behav. Brain Res.* 134, 291-8.
- Barrientos, R.M., Sprunger, D.B., Campeau, S., Watkins, L.R., Rudy, J.W., Maier, S.F., 2004. BDNF mRNA expression in rat hippocampus following contextual learning is blocked by intrahippocampal IL-1beta administration. *J. Neuroimmunol.* 155, 119-26. doi:10.1016/j.jneuroim.2004.06.009
- Bassani, S., Folci, A., Zapata, J., Passafaro, M., 2013. AMPAR trafficking in synapse maturation and plasticity. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 4411-30. doi:10.1007/s00018-013-1309-1
- Bean, B.P., Nowycky, M.C., Tsien, R.W., 1984. Beta-adrenergic modulation of calcium channels in frog ventricular heart cells. *Nature* 307, 371-375. doi:10.1038/307371a0
- Bear, M., Connors, B., Paradiso, M., 2001. *Neuroscience: Exploring the Brain.*
- Beckwith, B.E., Sandman, C.A., Hothersall, D., Kastin, A.J., 1977. Influence of neonatal injections of α -MSH on learning, memory and attention in rats. *Physiol. Behav.* 18, 63-71. doi:10.1016/0031-9384(77)90095-6
- Benfenati, F., 2007. Synaptic plasticity and the neurobiology of learning and memory. *Acta Biomed.* 78 Suppl 1, 58-66.
- Bernardi, R.E., Lattal, K.M., Berger, S.P., 2006. Postretrieval propranolol disrupts a cocaine conditioned place preference. *Neuroreport* 17, 1443-7. doi:10.1097/01.wnr.0000233098.20655.26
- Bertolini, A., Tacchi, R., Vergoni, A.V., 2009. Brain effects of melanocortins. *Pharmacol. Res.* 59, 13-47. doi:10.1016/j.phrs.2008.10.005
- Besnard, A., Caboche, J., Laroche, S., 2013. Recall and Reconsolidation of Contextual Fear Memory: Differential Control by ERK and Zif268 Expression Dosage. *PLoS One* 8, 1-8. doi:10.1371/journal.pone.0072006
- Bilbo, S.D., Biedenkapp, J.C., Der-Avakian, A., Watkins, L.R., Rudy, J.W., Maier, S.F., 2005. Neonatal infection-induced memory impairment after lipopolysaccharide in adulthood is prevented via caspase-1 inhibition. *J. Neurosci.* 25, 8000-9. doi:10.1523/JNEUROSCI.1748-05.2005
- Blackstone, C., Murphy, H., Moss, J., Baraban, J.M., 1994. Cyclic AMP and Synaptic Activity-Dependent Glutamate Receptors Phosphorylation of.
- Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., 1989. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 13 Suppl, S3-14.

- Blasi, F., Riccio, M., Brogi, A., Strazza, M., Taddei, M.L., Romagnoli, S., Luddi, A., D'Angelo, R., Santi, S., Costantino-Ceccarini, E., Melli, M., 1999. Constitutive expression of interleukin-1beta (IL-1beta) in rat oligodendrocytes. *Biol. Chem.* 380, 259-64. doi:10.1515/BC.1999.034
- Böhm, M., Metze, D., Schulte, U., Becher, E., Luger, T.A., Brzoska, T., 1999a. Detection of melanocortin-1 receptor antigenicity on human skin cells in culture and in situ. *Exp. Dermatol.* 8, 453-61.
- Böhm, M., Schulte, U., Kalden, H., Luger, T.A., 1999b. Alpha-melanocyte-stimulating hormone modulates activation of NF-kappa B and AP-1 and secretion of interleukin-8 in human dermal fibroblasts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 885, 277-86.
- Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., Tracey, K.J., 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405, 458-62. doi:10.1038/35013070
- Bozon, B., Davis, S., Laroche, S., 2003. A requirement for the immediate early gene zif268 in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron* 40, 695-701. doi:10.1016/S0896-6273(03)00674-3
- Brennan, F.X., Beck, K.D., Servatius, R.J., 2004. Proinflammatory cytokines differentially affect leverpress avoidance acquisition in rats. *Behav. Brain Res.* 153, 351-5. doi:10.1016/j.bbr.2003.12.025
- Brzoska, T., Böhm, M., Lügering, A., Loser, K., Luger, T.A., 2010. Terminal Signal : Anti-Inflammatory Effects of α -Melanocyte-Stimulating Hormone Related Peptides Beyond the Pharmacophore. *Bioscience*.
- Burgess, N., Maguire, E.A., Keefe, J.O., 2002. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *New York Oxford Univ. Press.* doi:10.1016/S0896-6273(02)00830-9
- Bustos, S.G., Maldonado, H., Molina, V.A., 2009. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology* 34, 446-57. doi:10.1038/npp.2008.75
- Cacquevel, M., Lebourrier, N., Chéenne, S., Vivien, D., 2004. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Curr. Drug Targets* 5, 529-34.
- Cao, Z., Henzel, W.J., Gao, X., 1996. IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 271, 1128-1131. doi:10.1126/science.271.5252.1128
- Caruso, V., Lagerström, M.C., Olszewski, P.K., Fredriksson, R., Schiöth, H.B., 2014. Synaptic changes induced by melanocortin signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 98-110. doi:10.1038/nrn3657
- Catania, A., 2010. *Melanocortins: Multiple Actions and Therapeutic Potential.*

- Catania, A., Lipton, J.M., 1993. Alpha-melanocyte stimulating Hormone in the modulation of host reactions. *Endocr. Rev.* 14, 576.
- Catania, A., Lonati, C., Sordi, A., Carlin, A., Leonardi, P., Gatti, S., 2010. The melanocortin system in control of inflammation. *ScientificWorldJournal*. 10, 1840-1853. doi:10.1100/tsw.2010.173
- Catterall, W.A., 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 521-55. doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.521
- Ceriani, G., Macaluso, A., Catania, A., Lipton, J.M., 1994. Central neurogenic antiinflammatory action of α -MSH: Modulation of peripheral inflammation induced by cytokines and other mediators of inflammation. *Neuroendocrinology* 59, 138-143. doi:10.1159/000126650
- Chen, A.S., Marsh, D.J., Trumbauer, M.E., Frazier, E.G., Guan, X.M., Yu, H., Rosenblum, C.I., Vongs, A., Feng, Y., Cao, L., Metzger, J.M., Strack, A.M., Camacho, R.E., Mellin, T.N., Nunes, C.N., Min, W., Fisher, J., Gopal-Truter, S., MacIntyre, D.E., Chen, H.Y., Van der Ploeg, L.H., 2000. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat. Genet.* 26, 97-102. doi:10.1038/79254
- Chen, X., Garelick, M.G., Wang, H., Lil, V., Athos, J., Storm, D.R., 2005. PI3 kinase signaling is required for retrieval and extinction of contextual memory. *Nat. Neurosci.* 8, 925-931. doi:10.1038/nn1482
- Chwang, W.B., Arthur, J.S., Schumacher, A., Sweatt, J.D., 2007. The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation. *J. Neurosci.* 27, 12732-42. doi:10.1523/JNEUROSCI.2522-07.2007
- Chwang, W.B., Riordan, K.J.O., Levenson, J.M., Sweatt, J.D., 2006. ERK / MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning 322-328. doi:10.1101/lm.152906.chromatin
- Cohen, H.E.N.J., 2001. From Conditioning to Conscious Recollection: Memory Systems of the Brain [WWW Document]. URL <http://www.amazon.com/From-Conditioning-Conscious-Recollection-Psychology/dp/0195178041> (accedido 8.25.15).
- Cole, A.J., Saffen, D.W., Baraban, J.M., Worley, P.F., 1989. Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature* 340, 474-6. doi:10.1038/340474a0
- Cone, R.D., 2006. Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr. Rev.* 27, 736-49. doi:10.1210/er.2006-0034
- Coogan, A.N., O'Neill, L.A., O'Connor, J.J., 1999. The P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 antagonizes the inhibitory effects of interleukin-1beta on long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neuroscience* 93, 57-69.
- Cooke, S.F., Bliss, T.V.P., 2006. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 129, 1659-73. doi:10.1093/brain/awl082

- Corrêa, S.A.L., Eales, K.L., 2012. The Role of p38 MAPK and Its Substrates in Neuronal Plasticity and Neurodegenerative Disease. *J. Signal Transduct.* 2012, 649079. doi:10.1155/2012/649079
- Cragolini, A.B., Perello, M., Schiöth, H.B., Scimonelli, T.N., 2004. alpha-MSH and gamma-MSH inhibit IL-1beta induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis through central melanocortin receptors. *Regul. Pept.* 122, 185-90. doi:10.1016/j.regpep.2004.06.011
- Cragolini, A.B., Schiöth, H.B., Scimonelli, T.N., 2006. Anxiety-like behavior induced by IL-1beta is modulated by alpha-MSH through central melanocortin-4 receptors. *Peptides* 27, 1451-6. doi:10.1016/j.peptides.2005.10.020
- Cui, H., Mason, B.L., Lee, C., Nishi, A., Elmquist, J.K., Lutter, M., 2012. Melanocortin 4 receptor signaling in dopamine 1 receptor neurons is required for procedural memory learning. *Physiol. Behav.* 106, 201-10. doi:10.1016/j.physbeh.2012.01.025
- Cunningham, A.J., Murray, C.A., O'Neill, L.A.J., Lynch, M.A., O'Connor, J.J., 1996. Interleukin-1 β (IL-1 β) and tumour necrosis factor (TNF) inhibit long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neurosci. Lett.* 203, 17-20. doi:10.1016/0304-3940(95)12252-4
- Dalgleish, T., 2004. The emotional brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 583-589. doi:10.1038/nrn1432
- Dantzer, R., Aubert, A., Bluthé, R.M., Gheusi, G., Cremona, S., Layé, S., Konsman, J.P., Parnet, P., Kelley, K.W., 1999. Mechanisms of the behavioural effects of cytokines. *Adv. Exp. Med. Biol.* 461, 83-105. doi:10.1097/00008877-199605001-00052
- Dantzer, R., Connor, J.C.O., Freund, G.G., Johnson, R.W., Kelley, K.W., Barrientos, R.M., Frank, M.G., Hein, A.M., Higgins, E.A., Watkins, L.R., Rudy, J.W., Maier, S.F., 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 46-56. doi:10.1016/j.bbi.2008.07.002.Time
- Dantzer, R., Kelley, K.W., 2007. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain. Behav. Immun.* 21, 153-160. doi:10.1016/j.bbi.2006.09.006
- Datta, P.C., King, M.G., 1982. α -Melanocyte-stimulating hormone and behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 6, 297-310. doi:10.1016/0149-7634(82)90042-2
- Davis, S., Vanhoutte, P., Pages, C., Caboche, J., Laroche, S., 2000. The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J. Neurosci.* 20, 4563-72.
- Debiec, J., Ledoux, J.E., Debiec, J., Ledoux, J.E., 2004. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. *Neuroscience* 129, 267-272. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.08.018
- Debiec, J., LeDoux, J.E., Nader, K., 2002. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36, 527-38.

- del Rey, A., Balschun, D., Wetzell, W., Randolph, A., Besedovsky, H.O., 2013. A cytokine network involving brain-borne IL-1 β , IL-1ra, IL-18, IL-6, and TNF α operates during long-term potentiation and learning. *Brain. Behav. Immun.* 33, 15-23. doi:10.1016/j.bbi.2013.05.011
- Delgado, R., Carlin, A., Airaghi, L., Demitri, M.T., Meda, L., Galimberti, D., Baron, P., Lipton, J.M., Catania, A., 1998. Melanocortin peptides inhibit production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by activated microglia. *J. Leukoc. Biol.* 63, 740-745.
- Dempsey, G., 1972. The effects of MSH on a restricted passive avoidance response*1. *Horm. Behav.* 3, 333-337. doi:10.1016/0018-506X(72)90022-0
- Depino, A.M., Alonso, M., Ferrari, C., del Rey, A., Anthony, D., Besedovsky, H., Medina, J.H., Pitossi, F., 2004. Learning modulation by endogenous hippocampal IL-1: Blockade of endogenous IL-1 facilitates memory formation. *Hippocampus* 14, 526-535. doi:10.1002/hipo.10164
- Derkach, V.A., Oh, M.C., Guire, E.S., Soderling, T.R., 2007. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 101-13. doi:10.1038/nrn2055
- Dinarello, C.A., 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095-147.
- Dinarello, C.A., 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 519-550. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132612
- Dudai, Y., 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol.* 55, 51-86. doi:10.1146/annurev.psych.55.090902.142050
- Dudai, Y., 2006. Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 174-8. doi:10.1016/j.conb.2006.03.010
- Dunne, A., O'Neill, L.A.J., 2003. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci. STKE* 2003, re3. doi:10.1126/stke.2003.171.re3
- Duvarci, S., Nader, K., LeDoux, J.E., 2005. Activation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning. *Eur. J. Neurosci.* 21, 283-9. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03824.x
- Eichenbaum, H., 2000. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 41-50. doi:10.1038/35036213
- Eisenberg, M., Dudai, Y., 2004. Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in medaka: Old fears don't die. *Eur. J. Neurosci.* 20, 3397-3403. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03818.x

- Eisenberg, S.P., Evans, R.J., Arend, W.P., Verderber, E., Brewer, M.T., Hannum, C.H., Thompson, R.C., 1990. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* 343, 341-6. doi:10.1038/343341a0
- Ericsson, A., Liu, C., Hart, R.P., Sawchenko, P.E., 1995. Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. *J. Comp. Neurol.* 361, 681-98. doi:10.1002/cne.903610410
- Esteban, J.A., Shi, S.-H., Wilson, C., Nuriya, M., Haganir, R.L., Malinow, R., 2003. PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat. Neurosci.* 6, 136-43. doi:10.1038/nn997
- Eves, P.C., Haycock, J.W., 2010. Melanocortin signalling mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* 681, 19-28. doi:10.1007/978-1-4419-6354-3_2
- Forcato, C., Argibay, P.F., Pedreira, M.E., Maldonado, H., 2009. Human reconsolidation does not always occur when a memory is retrieved: The relevance of the reminder structure. *Neurobiol. Learn. Mem.* 91, 50-57. doi:10.1016/j.nlm.2008.09.011
- Forcato, C., Rodríguez, M.L.C., Pedreira, M.E., Maldonado, H., 2010. Reconsolidation in humans opens up declarative memory to the entrance of new information. *Neurobiol. Learn. Mem.* 93, 77-84. doi:10.1016/j.nlm.2009.08.006
- Frank, D.A., Greenberg, M.E., 1994. CREB: a mediator of long-term memory from mollusks to mammals. *Cell* 79, 5-8.
- Frankland, P.W., Ding, H., Takahashi, E., Suzuki, A., Kida, S., Silva, A.J., 2006. Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learn. Mem.* 13, 451-7. doi:10.1101/lm.183406
- Friedman, W.J., 2001. Cytokines regulate expression of the type 1 interleukin-1 receptor in rat hippocampal neurons and glia. *Exp. Neurol.* 168, 23-31. doi:10.1006/exnr.2000.7595
- Fukushima, H., Zhang, Y., Archbold, G., Ishikawa, R., Nader, K., Kida, S., 2014. Enhancement of fear memory by retrieval through reconsolidation. *Elife* 3, e02736. doi:10.7554/eLife.02736
- Garlanda, C., Dinarello, C.A., Mantovani, A., 2013. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity* 39, 1003-1018. doi:10.1016/j.immuni.2013.11.010
- Getting, S.J., 2002. Melanocortin peptides and their receptors: New targets for anti-inflammatory therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 447-449. doi:10.1016/S0165-6147(02)02103-X
- Getting, S.J., Perretti, M., 2000. MC3-R as a novel target for antiinflammatory therapy. *Drug News Perspect.* 13, 19-27.
- Gibertini, M., 1998. Cytokines and cognitive behavior. *Neuroimmunomodulation* 5, 160-5.
- Giese, K.P., Mizuno, K., 2013. The roles of protein kinases in learning and memory. *Learn. Mem.* 20, 540-52. doi:10.1101/lm.028449.112

- Giuliani, D., Bitto, A., Galantucci, M., Zaffe, D., Ottani, A., Irrera, N., Neri, L., Cavallini, G.M., Altavilla, D., Botticelli, A.R., Squadrito, F., Guarini, S., 2014. Melanocortins protect against progression of Alzheimer's disease in triple-transgenic mice by targeting multiple pathophysiological pathways. *Neurobiol. Aging* 35, 537-47. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.08.030
- Giuliani, D., Leone, S., Mioni, C., Bazzani, C., Zaffe, D., Botticelli, A.R., Altavilla, D., Galantucci, M., Minutoli, L., Bitto, A., Squadrito, F., Guarini, S., 2006. Broad therapeutic treatment window of [Nle4, D-Phe7] α -melanocyte-stimulating hormone for long-lasting protection against ischemic stroke, in Mongolian gerbils. *Eur. J. Pharmacol.* 538, 48-56. doi:10.1016/j.ejphar.2006.03.038
- Giuliani, D., Ottani, A., Minutoli, L., Stefano, V. Di, Galantucci, M., Bitto, A., Zaffe, D., Altavilla, D., Botticelli, A.R., Squadrito, F., Guarini, S., 2009. Functional recovery after delayed treatment of ischemic stroke with melanocortins is associated with overexpression of the activity-dependent gene Zif268. *Brain. Behav. Immun.* 23, 844-50. doi:10.1016/j.bbi.2009.03.009
- Giuliani, D., Zaffe, D., Ottani, A., Spaccapelo, L., Galantucci, M., Minutoli, L., Bitto, A., Irrera, N., Contri, M., Altavilla, D., Botticelli, A.R., Squadrito, F., Guarini, S., 2011. Treatment of cerebral ischemia with melanocortins acting at MC4 receptors induces marked neurogenesis and long-lasting functional recovery. *Acta Neuropathol.* 122, 443-53. doi:10.1007/s00401-011-0873-4
- Gonzalez, P., Machado, I., Vilcaes, a, Caruso, C., Roth, G. a, Schiöth, H., Lasaga, M., Scimonelli, T., 2013. Molecular mechanisms involved in interleukin 1-beta (IL-1 β)-induced memory impairment. Modulation by alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH). *Brain. Behav. Immun.* 34, 141-50. doi:10.1016/j.bbi.2013.08.007
- Gonzalez, P.V., Schiöth, H.B., Lasaga, M., Scimonelli, T.N., 2009. Memory impairment induced by IL-1beta is reversed by alpha-MSH through central melanocortin-4 receptors. *Brain. Behav. Immun.* 23, 817-22. doi:10.1016/j.bbi.2009.03.001
- Goshen, I., Kreisel, T., Ounallah-Saad, H., Renbaum, P., Zalstein, Y., Ben-Hur, T., Levy-Lahad, E., Yirmiya, R., 2007. A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology* 32, 1106-15. doi:10.1016/j.psyneuen.2007.09.004
- Goshen, I., Yirmiya, R., 2007. The role of pro-inflammatory cytokines in memory processes and neural plasticity. *Psychoneuroimmunology, Two-Volume Set 1*, 337-377. doi:10.1016/B978-012088576-3/50021-6
- Greenfeder, S.A., Nunes, P., Kwee, L., Labow, M., Chizzonite, R.A., Ju, G., 1995. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J. Biol. Chem.* 270, 13757-65.
- Hall, J., Thomas, K.L., Everitt, B.J., 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, 2186-93.

- Hannum, C.H., Wilcox, C.J., Arend, W.P., Joslin, F.G., Dripps, D.J., Heimdal, P.L., Armes, L.G., Sommer, A., Eisenberg, S.P., Thompson, R.C., 1990. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 343, 336-40. doi:10.1038/343336a0
- Hayashi, Y., Shi, S.H., Esteban, J.A., Piccini, A., Poncer, J.C., Malinow, R., 2000. Driving AMPA Receptors into Synapses by LTP and CaMKII: Requirement for GluR1 and PDZ Domain Interaction. *Science* (80-.). 287, 2262-2267. doi:10.1126/science.287.5461.2262
- Hein, A.M., Stasko, M.R., Matousek, S.B., Scott-McKean, J.J., Maier, S.F., Olschowka, J.A., Costa, A.C.S., O'Banion, M.K., 2010. Sustained hippocampal IL-1beta overexpression impairs contextual and spatial memory in transgenic mice. *Brain. Behav. Immun.* 24, 243-53. doi:10.1016/j.bbi.2009.10.002
- Holland, P.C., Bouton, M.E., 1999. Hippocampus and context in classical conditioning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 195-202. doi:10.1016/S0959-4388(99)80027-0
- Hong, I., Kim, J., Kim, J., Lee, S., Ko, H.-G., Nader, K., Kaang, B.-K., Tsien, R.W., Choi, S., 2013. AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 8218-23. doi:10.1073/pnas.1305235110
- Huang, Y., Smith, D.E., Ibáñez-Sandoval, O., Sims, J.E., Friedman, W.J., 2011. Neuron-specific effects of interleukin-1 β are mediated by a novel isoform of the IL-1 receptor accessory protein. *J. Neurosci.* 31, 18048-59. doi:10.1523/JNEUROSCI.4067-11.2011
- Hunt, G., Todd, C., Kyne, S., Thody, A.J., 1994. ACTH stimulates melanogenesis in cultured human melanocytes. *J. Endocrinol.* 140, R1-3.
- Ichiyama, T., Sakai, T., Catania, A., Barsh, G.S., Furukawa, S., Lipton, J.M., 1999. Inhibition of peripheral NF-kappaB activation by central action of alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J. Neuroimmunol.* 99, 211-217.
- Ivanov, A., Pellegrino, C., Rama, S., Dumalska, I., Salyha, Y., Ben-Ari, Y., Medina, I., 2006. Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* 572, 789-98. doi:10.1113/jphysiol.2006.105510
- Jarome, T.J., Kwapis, J.L., Werner, C.T., Parsons, R.G., Gafford, G.M., Helmstetter, F.J., 2012. The timing of multiple retrieval events can alter GluR1 phosphorylation and the requirement for protein synthesis in fear memory reconsolidation. *Learn. Mem.* 19, 300-6. doi:10.1101/lm.024901.111
- Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., 2009. NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a001271. doi:10.1101/cshperspect.a001271
- Kandel, E.R., 2012. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol. Brain* 5, 14. doi:10.1186/1756-6606-5-14

- Kelly, A., Vereker, E., Nolan, Y., Brady, M., Barry, C., Loscher, C.E., Mills, K.H.G., Lynch, M. a, 2003. Activation of p38 plays a pivotal role in the inhibitory effect of lipopolysaccharide and interleukin-1 beta on long term potentiation in rat dentate gyrus. *J. Biol. Chem.* 278, 19453-62. doi:10.1074/jbc.M301938200
- Kida, S., Josselyn, S.A., Peña de Ortiz, S., Kogan, J.H., Chevere, I., Masushige, S., Silva, A.J., 2002. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat. Neurosci.* 5, 348-55. doi:10.1038/nn819
- Kim, M.J., Dunah, A.W., Wang, Y.T., Sheng, M., 2005. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron* 46, 745-60. doi:10.1016/j.neuron.2005.04.031
- Kishi, T., Aschkenasi, C.J., Lee, C.E., Mountjoy, K.G., Saper, C.B., Elmquist, J.K., 2003. Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 457, 213-35. doi:10.1002/cne.10454
- Konda, Y., Gantz, I., DelValle, J., Shimoto, Y., Miwa, H., Yamada, T., 1994. Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3 receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 13162-13166.
- Kopec, C.D., Real, E., Kessels, H.W., Malinow, R., 2007. GluR1 links structural and functional plasticity at excitatory synapses. *J. Neurosci.* 27, 13706-13718. doi:10.1523/JNEUROSCI.3503-07.2007
- Kranjac, D., McLinden, K.A., Deodati, L.E., Papini, M.R., Chumley, M.J., Boehm, G.W., 2012. Peripheral bacterial endotoxin administration triggers both memory consolidation and reconsolidation deficits in mice. *Brain. Behav. Immun.* 26, 109-21. doi:10.1016/j.bbi.2011.08.005
- Kunsch, C., Lang, R.K., Rosen, C.A., Shannon, M.F., 1994. Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J. Immunol.* 153, 153-64.
- Lai, A.Y., Swayze, R.D., El-Husseini, A., Song, C., 2006. Interleukin-1 beta modulates AMPA receptor expression and phosphorylation in hippocampal neurons. *J. Neuroimmunol.* 175, 97-106. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.03.001
- Lasaga, M., Debeljuk, L., Durand, D., Scimonelli, T.N., Caruso, C., 2008. Role of alpha-melanocyte stimulating hormone and melanocortin 4 receptor in brain inflammation. *Peptides* 29, 1825-35. doi:10.1016/j.peptides.2008.06.009
- LeDoux, J.E., 2000. EMOTION CIRCUITS IN THE BRAIN. *New York* 23, 155-184. doi:10.1146/annurev.neuro.23.1.155
- Ledoux, J.E., 2002. Emotion, Memory and the Brain.

- Lee, J.L.C., Everitt, B.J., Thomas, K.L., 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304, 839-43. doi:10.1126/science.1095760
- Lee, J.L.C., Milton, A.L., Everitt, B.J., 2006. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *J. Neurosci.* 26, 10051-6. doi:10.1523/JNEUROSCI.2466-06.2006
- Lewis, D.J., Misanin, J.R., Miller, R.R., 1968. Recovery of memory following amnesia. *Nature* 220, 704-705. doi:10.1038/220704a0
- Libermann, T.A., Baltimore, D., 1990. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 10, 2327-34.
- Lombroso, P., 2009. Learning and Memory , Part II : Molecular Mechanisms of Synaptic Plasticity. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 48, 5-9. doi:10.1097/CHI.0b013e318190c4b3
- Lopez, J., Gamache, K., Schneider, R., Nader, K., 2015. Memory Retrieval Requires Ongoing Protein Synthesis and NMDA Receptor Activity-Mediated AMPA Receptor Trafficking. *J. Neurosci.* 35, 2465-75. doi:10.1523/JNEUROSCI.0735-14.2015
- Lu, W., Shi, Y., Jackson, A.C., Bjorgan, K., During, M.J., Sprengel, R., Seeburg, P.H., Nicoll, R. a., 2009. Subunit Composition of Synaptic AMPA Receptors Revealed by a Single-Cell Genetic Approach. *Neuron* 62, 254-268. doi:10.1016/j.neuron.2009.02.027
- Luger, T. a, Brzoska, T., 2007. alpha-MSH related peptides: a new class of anti-inflammatory and immunomodulating drugs. *Ann. Rheum. Dis.* 66 Suppl 3, iii52-5. doi:10.1136/ard.2007.079780
- Luger, T.A., Scholzen, T.E., Brzoska, T., Böhm, M., 2003. New insights into the functions of alpha-MSH and related peptides in the immune system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 994, 133-40.
- Lukiw, W.J., Pelaez, R.P., Martinez, J., Bazan, N.G., 1998. Budesonide epimer R or dexamethasone selectively inhibit platelet-activating factor-induced or interleukin 1beta-induced DNA binding activity of cis-acting transcription factors and cyclooxygenase-2 gene expression in human epidermal keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3914-9.
- Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G., Schottler, F., 1983. Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* 305, 719-721. doi:10.1038/305719a0
- Lynch, M.A., 1998. Age-related impairment in long-term potentiation in hippocampus: a role for the cytokine, interleukin-1 beta? *Prog. Neurobiol.* 56, 571-89.
- Lynch, M.A., Introduction, I., Erk, B., Potentiation, L., Age, D., Cognition, E., 2004. Long-Term Potentiation and Memory 87-136.
- Machado, I., González, P., Schiöth, H.B., Lasaga, M., Scimonelli, T.N., 2010. α -Melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) reverses impairment of memory reconsolidation induced by

- interleukin-1 beta (IL-1 beta) hippocampal infusions. *Peptides* 31, 2141-4. doi:10.1016/j.peptides.2010.07.018
- MacManus, A., Ramsden, M., Murray, M., Henderson, Z., Pearson, H.A., Campbell, V.A., 2000. Enhancement of (45)Ca(2+) influx and voltage-dependent Ca(2+) channel activity by beta-amyloid-(1-40) in rat cortical synaptosomes and cultured cortical neurons. Modulation by the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *J. Biol. Chem.* 275, 4713-4718.
- Maldonado, H., 2008. La memoria animal: adquisición, persistencia y olvido [WWW Document].
- Malenka, R.C., Kauer, J.A., Zucker, R.S., Nicoll, R.A., 1988. Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science* 242, 81-4.
- Malinow, R., Malenka, R.C., 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 103-26. doi:10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758
- Man, H.-Y., Sekine-Aizawa, Y., Haganir, R.L., 2007. Regulation of {alpha}-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor trafficking through PKA phosphorylation of the Glu receptor 1 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3579-84. doi:10.1073/pnas.0611698104
- Man, H.-Y., Wang, Q., Lu, W.-Y., Ju, W., Ahmadian, G., Liu, L., D'Souza, S., Wong, T., Taghibiglou, C., Lu, J., Becker, L.E., Pei, L., Liu, F., Wymann, M.P., MacDonald, J.F., Wang, Y.T., 2003. Activation of PI3-Kinase Is Required for AMPA Receptor Insertion during LTP of mEPSCs in Cultured Hippocampal Neurons. *Neuron* 38, 611-624. doi:10.1016/S0896-6273(03)00228-9
- Manna, S.K., Aggarwal, B.B., 1998. a-Melanocyte-Stimulating Hormone Inhibits the Nuclear Transcription Factor NF- k B Activation Induced by Various Inflammatory Agents. *Am. Assoc. Immunol.* 161, 2873-2880.
- Martin, L.W., Lipton, J.M., 1990. Acute phase response to endotoxin: rise in plasma alpha-MSH and effects of alpha-MSH injection. *Am. J. Physiol.* 259, R768-72.
- Martin, S.J., Grimwood, P.D., Morris, R.G., 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 649-711. doi:10.1146/annurev.neuro.23.1.649
- McKenzie, S., Eichenbaum, H., 2011. Consolidation and reconsolidation: two lives of memories? *Neuron* 71, 224-33. doi:10.1016/j.neuron.2011.06.037
- McKinney, R.A., Capogna, M., Dürr, R., Gähwiler, B.H., Thompson, S.M., 1999. Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation. *Nat. Neurosci.* 2, 44-9. doi:10.1038/4548
- McLay, R.N., Pan, W., Kastin, A.J., 2001. Effects of peptides on animal and human behavior: a review of studies published in the first twenty years of the journal *Peptides*. *Peptides* 22, 2181-2255. doi:10.1016/S0196-9781(01)00550-2

- Meis, S., Endres, T., Lessmann, V., 2012. Postsynaptic BDNF signalling regulates long-term potentiation at thalamo-amygdala afferents. *J. Physiol.* 590, 193-208. doi:10.1113/jphysiol.2011.220434
- Milekic, M.H., Alberini, C.M., 2002. Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron* 36, 521-525. doi:10.1016/S0896-6273(02)00976-5
- Miller, C.A., Marshall, J.F., 2005. Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron* 47, 873-84. doi:10.1016/j.neuron.2005.08.006
- Milton, A.L., Everitt, B.J., 2010. The psychological and neurochemical mechanisms of drug memory reconsolidation: Implications for the treatment of addiction. *Eur. J. Neurosci.* 31, 2308-2319. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07249.x
- Monfils, M.-H., Cowansage, K.K., Klann, E., LeDoux, J.E., 2009. Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. *Science* 324, 951-5. doi:10.1126/science.1167975
- Montgomery, D., 2001. Design and Analysis of Experiments. John Wiley Sons 18, 163-163. doi:10.1002/qre.458
- Mountjoy, K.G., Kong, P.L., Taylor, J.A., Willard, H., Wilkison, W.O., Wu, C.J., Greenwood, D.R., Cooney, J.M., Jensen, D.J., Michele, A., Cooper, G.J.S., Willard, D.H., Kathleen, G., Tay-, J.A., Melano-, W.O.W., 2001. Melanocortin receptor-mediated mobilization of intracellular free calcium in HEK293 cells Melanocortin receptor-mediated mobilization of intracellular free calcium in HEK293 cells 11-19.
- Mountjoy, K.G., Mortrud, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B., Cone, R.D., 1994. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol.* 8, 1298-308.
- Muceniece, R., Dambrova, M., 2010. Melanocortins in brain inflammation: the role of melanocortin receptor subtypes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 681, 61-70. doi:10.1007/978-1-4419-6354-3_5
- Murchison, C.F., Zhang, X.-Y., Zhang, W.-P., Ouyang, M., Lee, A., Thomas, S.A., 2004. A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell* 117, 131-142.
- Murray, C.A., McGahon, B., McBennett, S., Lynch, M.A., 1996. Interleukin-1 beta inhibits glutamate release in hippocampus of young, but not aged, rats. *Neurobiol. Aging* 18, 343-8.
- Myers, K.M., Davis, M., 2002. Behavioral and Neural Analysis of Extinction. *Neuron* 36, 567-584. doi:10.1016/S0896-6273(02)01064-4
- Nader, K., Schafe, G.E., LeDoux, J.E., 2000. The labile nature of consolidation theory. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 216-219. doi:10.1038/35044580
- Nagatsu, T., Sawada, M., 2005. Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. *Curr. Pharm. Des.* 11, 999-1016.

- Neves, G., Cooke, S.F., Bliss, T.V.P., 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 65-75. doi:10.1038/nrn2303
- O'Neill, L.A., Dinarello, C.A., 2000. The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol. Today* 21, 206-9.
- Oitzl, M.S., van Oers, H., Schöbitz, B., de Kloet, E.R., 1993. Interleukin-1 beta, but not interleukin-6, impairs spatial navigation learning. *Brain Res.* 613, 160-3.
- Oosterom, J., Garner, K.M., Den Dekker, W.K., Nijenhuis, W. a J., Gispen, W.H., Burbach, J.P.H., Barsh, G.S., Adan, R. a H., 2001. Common requirements for melanocortin-4 receptor selectivity of structurally unrelated melanocortin agonist and endogenous antagonist, Agouti protein. *J. Biol. Chem.* 276, 931-936. doi:10.1074/jbc.M007261200
- Opp, M.R., Obál, F., Krueger, J.M., 1988. Effects of alpha-MSH on sleep, behavior, and brain temperature: interactions with IL 1. *Am. J. Physiol.* 255, R914-22.
- Pedreira, M.E., Maldonado, H., 2003. Protein Synthesis Subverts Reconsolidation or Extinction Depending on Reminder Duration. *Neuron* 38, 863-869. doi:10.1016/S0896-6273(03)00352-0
- Pedreira, M.E., Perez-Cuesta, L.M., 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.
- Pedreira, M.E., Pérez-Cuesta, L.M., Maldonado, H., 2004. Mismatch Between What Is Expected and What Actually Occurs Triggers Memory Reconsolidation or Extinction. *Learn. Mem.* 11, 579-585. doi:10.1101/lm.76904
- Phillips, R.G., LeDoux, J.E., 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 106, 274-85.
- Pita, I., Jelaso, A.M., Ide, C.F., 1999. IL-1beta increases intracellular calcium through an IL-1 type 1 receptor mediated mechanism in C6 astrocytic cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* 17, 813-20.
- Plata-Salamán, C., Turrin, N., 1999. Cytokine interactions and cytokine balance in the brain: relevance to neurology and psychiatry. *Mol. Psychiatry* 4, 302-6.
- Plata-Salamán, C.R., Ffrench-Mullen, J.M.H., 1992. Interleukin-1 β depresses calcium currents in CA1 hippocampal neurons at pathophysiological concentrations. *Brain Res. Bull.* 29, 221-223. doi:10.1016/0361-9230(92)90029-W
- Plata-Salamán, C.R., Ffrench-Mullen, J.M.H., 1994. Interleukin-1 β inhibits Ca²⁺ channel currents in hippocampal neurons through protein kinase C. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.* 266, 1-10. doi:10.1016/0922-4106(94)90202-X
- Przybylski, J., Sara, S.J., 1997. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav. Brain Res.* 84, 241-246. doi:10.1016/S0166-4328(96)00153-2

- Pugh, C.R., Fleshner, M., Watkins, L.R., Maier, S.F., Rudy, J.W., 2001. The immune system and memory consolidation : a role for the cytokine IL-1b 25, 29-41.
- Pugh, C.R., Nguyen, K.T., Gonyea, J.L., Fleshner, M., Wakins, L.R., Maier, S.F., Rudy, J.W., 1999. Role of interleukin-1 beta in impairment of contextual fear conditioning caused by social isolation. *Behav. Brain Res.* 106, 109-18.
- Purves, D., George, A., Fitzpatrick, D., William, H., Leonard, L.A.-S.W., 2012. *Neuroscience* [WWW Document]. Sinauer Assoc. Inc.
- Quillfeldt, J.A., 2006. *Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats.*
- Rao-ruiz, P., Rotaru, D.C., van der Loo, R.J., Mansvelder, H.D., Stiedl, O., Smit, A.B., Spijker, S., Loo, R.J. Van Der, Mansvelder, H.D., Stiedl, O., Smit, A.B., Spijker, S., 2011. Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. *Nat. Neurosci.* 14, 1302-8. doi:10.1038/nn.2907
- Romanski, L.M., Clugnet, M.C., Bordi, F., LeDoux, J.E., 1993. Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. *Behav. Neurosci.* 107, 444-50.
- Romeo, H.E., Tio, D.L., Rahman, S.U., Chiappelli, F., Taylor, A.N., 2001. The glossopharyngeal nerve as a novel pathway in immune-to-brain communication: relevance to neuroimmune surveillance of the oral cavity. *J. Neuroimmunol.* 115, 91-100.
- Ross, F.M., Allan, S.M., Rothwell, N.J., Verkhratsky, A., 2003. A dual role for interleukin-1 in LTP in mouse hippocampal slices. *J. Neuroimmunol.* 144, 61-67. doi:10.1016/j.jneuroim.2003.08.030
- Rothwell, N.J., Luheshi, G., 1994. Pharmacology of interleukin-1 actions in the brain. *Adv. Pharmacol.* 25, 1-20.
- Roullet, P., Sara, S., 1998. Consolidation of memory after its reactivation: involvement of beta noradrenergic receptors in the late phase. *Neural Plast.* 6, 63-8. doi:10.1155/NP.1998.63
- Roulston, A., Lin, R., Beauparlant, P., Wainberg, M.A., Hiscott, J., 1995. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 and cytokine gene expression in myeloid cells by NF-kappa B/Rel transcription factors. *Microbiol. Rev.* 59, 481-505.
- Rubin, R., Franks, C., 1968. *Advances in Behavior Therapy.* Acad. Press 396.
- Rudy, J.W., O'Reilly, R.C., 2001. Conjunctive representations, the hippocampus, and contextual fear conditioning. *Cogn. Affect. Behav. Neurosci.* 1, 66-82.
- Sandman, C.A., Kastinc., A.J., Sandman, A., Schally, A.V., 1969. Melanocyte-Stimulating Hormone and Learned Appetitive Behavior Melanocyte-stimulating. *Specialia* 28, 1967-1968.

- Saud, K., Herrera-Molina, R., Von Bernhardi, R., 2005. Pro- and anti-inflammatory cytokines regulate the ERK pathway: implication of the timing for the activation of microglial cells. *Neurotox. Res.* 8, 277-87.
- Schafe, G.E., Atkins, C.M., Swank, M.W., Bauer, E.P., Sweatt, J.D., LeDoux, J.E., 2000. Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J. Neurosci.* 20, 8177-87.
- Schioth, H.B., 2001. The physiological role of melanocortin receptors. *Vitam. Horm.* 63, 195-232.
- Schneider, H.S., Pitossi, F.P., Balschun, D.B., Wagner, A.W., Del Rey, A., Besedovsky, H.O., 1998. A neuromodulatory role of interleukin-1 β in the hippocampus 95, 7778-7783.
- Schöbitz, B., De Kloet, E.R., Holsboer, F., 1994. Gene expression and function of interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in the brain. *Prog. Neurobiol.* 44, 397-432.
- Schwabe, L., Nader, K., Pruessner, J.C., 2014. Reconsolidation of human memory: brain mechanisms and clinical relevance. *Biol. Psychiatry* 76, 274-280. doi:10.1016/j.biopsych.2014.03.008
- Schwabe, L., Nader, K., Wolf, O.T., Beaudry, T., Pruessner, J.C., 2012. Neural signature of reconsolidation impairments by propranolol in humans. *Biol. Psychiatry* 71, 380-386. doi:10.1016/j.biopsych.2011.10.028
- Scoville, W.B., Milner, B., 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 12, 103-113. doi:10.1136/jnnp.20.1.11
- Segal, M., Murphy, D.D., 1998. CREB Activation Mediates Plasticity in Cultured Hippocampal Neurons. *Neural Plast.* 6, 1-7. doi:10.1155/NP.1998.1
- Seger, R., Krebs, E., 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9, 726-735.
- Selnes, O.A., Grega, M.A., Borowicz, L.M., Royall, R.M., McKhann, G.M., Baumgartner, W.A., 2003. Cognitive changes with coronary artery disease: a prospective study of coronary artery bypass graft patients and nonsurgical controls. *Ann. Thorac. Surg.* 75, 1377-84; discussion 1384-6.
- Sevenster, D., Beckers, T., Kindt, M., 2012. Retrieval per se is not sufficient to trigger reconsolidation of human fear memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 97, 338-345. doi:10.1016/j.nlm.2012.01.009
- Shapira-Lichter, I., Beilin, B., Ofek, K., Bessler, H., Gruberger, M., Shavit, Y., Seror, D., Grinevich, G., Posner, E., Reichenberg, A., Soreq, H., Yirmiya, R., 2008. Cytokines and cholinergic signals co-modulate surgical stress-induced changes in mood and memory. *Brain. Behav. Immun.* 22, 388-98. doi:10.1016/j.bbi.2007.09.006

- Shaywitz, A.J., Greenberg, M.E., 1999. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 821-61. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.821
- Shen, Y., Fu, W.-Y., Cheng, E.Y.L., Fu, A.K.Y., Ip, N.Y., 2013. Melanocortin-4 receptor regulates hippocampal synaptic plasticity through a protein kinase A-dependent mechanism. *J. Neurosci.* 33, 464-72. doi:10.1523/JNEUROSCI.3282-12.2013
- Shepherd, J.D., Huganir, R.L., 2007. The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 613-643. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123516
- Sims, J.E., 2002. IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 117-22.
- Sims, J.E., Smith, D.E., 2010. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 89-102. doi:10.1038/nri2691
- Smalley, K., Eisen, T., 2000. The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells. *FEBS Lett.* 476, 198-202. doi:10.1016/S0014-5793(00)01726-9
- Smith, D.E., Lipsky, B.P., Russell, C., Ketchum, R.R., Kirchner, J., Hensley, K., Huang, Y., Friedman, W.J., Boissonneault, V., Plante, M.M., Rivest, S., Sims, J.E., 2009. A Central Nervous System-Restricted Isoform of the Interleukin-1 Receptor Accessory Protein Modulates Neuronal Responses to Interleukin-1. *Immunity* 30, 817-831. doi:10.1016/j.immuni.2009.03.020
- Smith, M.L., Milner, B., 1981. The role of the right hippocampus in the recall of spatial location. *Neuropsychologia* 19, 781-93.
- Soeter, M., Kindt, M., 2010. Dissociating response systems: erasing fear from memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 94, 30-41. doi:10.1016/j.nlm.2010.03.004
- Song, C., Phillips, A.G., Leonard, B., 2003. Interleukin 1 beta enhances conditioned fear memory in rats: possible involvement of glucocorticoids. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1739-1743. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02886.x
- Squire, L.R., 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol. Rev.* 99, 195-231. doi:10.1037/0033-295X.99.3.582
- Squire, L.R., Zola, S.M., 1996. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13515-13522. doi:10.1073/pnas.93.24.13515
- Squire, L.R., Zola-Morgan, S., 1991. The medial temporal lobe memory system. *Science* 253, 1380-1386. doi:10.1126/science.1896849

- Srinivasan, D., Yen, J.-H., Joseph, D.J., Friedman, W., 2004. Cell type-specific interleukin-1beta signaling in the CNS. *J. Neurosci.* 24, 6482-8. doi:10.1523/JNEUROSCI.5712-03.2004
- Stefaniak, J., O'Brien, J., 2015. Imaging of neuroinflammation in dementia: a review. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1-8. doi:10.1136/jnnp-2015-311336
- Sutton, G.M., Duos, B., Patterson, L.M., Berthoud, H.-R., 2005. Melanocortinergic modulation of cholecystokinin-induced suppression of feeding through extracellular signal-regulated kinase signaling in rat solitary nucleus. *Endocrinology* 146, 3739-47. doi:10.1210/en.2005-0562
- Suzuki, A., Josselyn, S. a, Frankland, P.W., Masushige, S., Silva, A.J., Kida, S., 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J. Neurosci.* 24, 4787-95. doi:10.1523/JNEUROSCI.5491-03.2004
- Thomas, K.L., Hall, J., Everitt, B.J., 2002. Cellular imaging with zif268 expression in the rat nucleus accumbens and frontal cortex further dissociates the neural pathways activated following the retrieval of contextual and cued fear memory. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1789-96.
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768-74. doi:10.1038/356768a0
- Thornton, P., Pinteaux, E., Gibson, R.M., Allan, S.M., Rothwell, N.J., 2006. Interleukin-1-induced neurotoxicity is mediated by glia and requires caspase activation and free radical release. *J. Neurochem.* 98, 258-266. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03872.x
- Torrás-García, M., Lelong, J., Tronel, S., Sara, S.J., 2005. Reconsolidation after remembering an odor-reward association requires NMDA receptors. *Learn. Mem.* 12, 18-22. doi:10.1101/lm.80905
- Treves, A., Tashiro, A., Witter, M.P., Moser, E.I., 2008. What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience* 154, 1155-72. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.04.073
- Tronson, N.C., Taylor, J.R., 2007. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 262-75. doi:10.1038/nrn2090
- Tronson, N.C., Wiseman, S.L., Olausson, P., Taylor, J.R., 2006. Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. *Nat. Neurosci.* 9, 167-9. doi:10.1038/nn1628
- Tulving, E., 1972. Episodic and semantic memory. *Organ. Mem.* doi:10.1017/S0140525X00047257
- Turnbull, A. V, Rivier, C.L., 1999. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* 79, 1-71.

- Tyor, W.R., Glass, J.D., Griffin, J.W., Becker, P.S., McArthur, J.C., Bezman, L., Griffin, D.E., 1992. Cytokine expression in the brain during the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Neurol.* 31, 349-60. doi:10.1002/ana.410310402
- Valjent, E., Corbillé, A.-G., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Girault, J.-A., 2006. Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2932-7. doi:10.1073/pnas.0511030103
- Vereker, E., Donnell, E.O., Lynch, M.A., 2000. The Inhibitory Effect of Interleukin-1 B on Long-Term Potentiation Is Coupled with Increased Activity of Stress-Activated Protein Kinases 20, 6811-6819.
- Viviani, B., Gardoni, F., Marinovich, M., 2007. Cytokines and neuronal ion channels in health and disease. *Int. Rev. Neurobiol.* 82, 247-63. doi:10.1016/S0074-7742(07)82013-7
- Vongs, A., Lynn, N.M., Rosenblum, C.I., 2004. Activation of MAP kinase by MC4-R through PI3 kinase. *Regul. Pept.* 120, 113-8. doi:10.1016/j.regpep.2004.02.018
- Wallenstein, G. V, Eichenbaum, H., Hasselmo, M.E., 1998. The hippocampus as an associator of discontiguous events. *Trends Neurosci.* 21, 317-323.
- Wang, H., Hu, Y., Tsien, J.Z., 2006. Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog. Neurobiol.* 79, 123-35. doi:10.1016/j.pneurobio.2006.06.004
- Weiss, J.M., Sundar, S.K., Cierpial, M.A., Ritchie, J.C., 1991. Effects of interleukin-1 infused into brain are antagonized by alpha-MSH in a dose-dependent manner. *Eur. J. Pharmacol.* 192, 177-179. doi:10.1016/0014-2999(91)90087-7
- Wikberg, J.E., Muceniece, R., Mandrika, I., Prusis, P., Lindblom, J., Post, C., Skottner, A., 2000. New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacol. Res.* 42, 393-420. doi:10.1006/phrs.2000.0725
- Wilensky, a E., Schafe, G.E., LeDoux, J.E., 2000. The amygdala modulates memory consolidation of fear-motivated inhibitory avoidance learning but not classical fear conditioning. *J. Neurosci.* 20, 7059-7066. doi:20/18/7059 [pii]
- Wiltgen, B.J., Tanaka, K.Z., 2013. Systems consolidation and the content of memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 106, 365-371. doi:10.1016/j.nlm.2013.06.001
- Yoon, S.-W., Goh, S.-H., Chun, J.-S., Cho, E.-W., Lee, M.-K., Kim, K.-L., Kim, J.-J., Kim, C.-J., Poo, H., 2003. alpha-Melanocyte-stimulating hormone inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production in leukocytes by modulating protein kinase A, p38 kinase, and nuclear factor kappa B signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 278, 32914-20. doi:10.1074/jbc.M302444200
- Young, J.J., Bruno, D., Pomara, N., 2014. A review of the relationship between proinflammatory cytokines and major depressive disorder. *J. Affect. Disord.* 169, 15-20. doi:10.1016/j.jad.2014.07.032

- Yu, Y.-J., Chang, C.-H., Gean, P.-W., 2013. AMPA receptor endocytosis in the amygdala is involved in the disrupted reconsolidation of Methamphetamine-associated contextual memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 103, 72-81. doi:10.1016/j.nlm.2013.04.004
- Zhang, X.-H., Liu, F., Chen, Q., Zhang, C.-L., Zhuo, M., Xiong, Z.-Q., Li, B.-M., 2008. Conditioning-strength dependent involvement of NMDA NR2B subtype receptor in the basolateral nucleus of amygdala in acquisition of auditory fear memory. *Neuropharmacology* 55, 238-46. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.05.030
- Zhang, Z., Chopp, M., Goussev, A., Powers, C., 1998. Cerebral vessels express interleukin 1beta after focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 784, 210-7.
- Zhu, J.J., Qin, Y., Zhao, M., Van Aelst, L., Malinow, R., 2002. Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 110, 443-455. doi:10.1016/S0092-8674(02)00897-8

Publicaciones científicas

Machado I, González P, Schiöth H, Lasaga M, Scimonelli T. α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) reverses impairment of memory reconsolidation induced by Interleukin-1 beta (IL-1 β) hippocampal infusions. *Peptides* 2010 Nov.; 31(11):2141-4.

Gonzalez PV, Machado I, Vilcaes A, Caruso C, Roth G, Schiöth B. Helgi, Lasaga M, Scimonelli T. Molecular mechanisms involved in interleukin 1-beta (IL-1 β)-induced memory impairment. Modulation by alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH). *Brain Behav Immun.* 2013 Nov.; 34:141-50. 5.

Machado I, Gonzalez PV, Vilcaes A, Carniglia L, Schiöth B. Helgi, Lasaga M, Scimonelli T. Interleukin-1 beta induced memory reconsolidation impairment is mediated by a reduction in glutamate release and zif268 expression and alpha-melanocyte-stimulating hormone reversed these effects. *Brain Behav Immun.* 2015, May; 46:137-46.

Machado I, Gonzalez PV, Lasaga M, Scimonelli T. Interleukin-1 beta induced memory reconsolidation impairment is mediated by a reduced GluA1 AMPA subunit phosphorylation and surface expression. α -melanocyte stimulating hormone prevented these effects. *Manuscrito en preparación.*