

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Lic. En Ciencias Biológicas



Participación de los astrocitos del
complejo basolateral de la amígdala en
diferentes etapas de la formación de la
memoria de miedo contextual

Tesinista: Melisa Riva Gargiulo

Firma: 

Director: Dr. Crhistian Luis Bender

Firma: 

Dpto. de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. IFEC-CONICET

“Participación de los astrocitos del complejo basolateral de la amígdala en diferentes etapas de la formación de la memoria de miedo contextual”

Tribunal examinador:

Dra. Andrea B. Cragolini

Firma: 

Dra. María A. Rivarola

Firma: 

Dr. Franco R. Mir

Firma: 

Calificación: 10 (Diez)

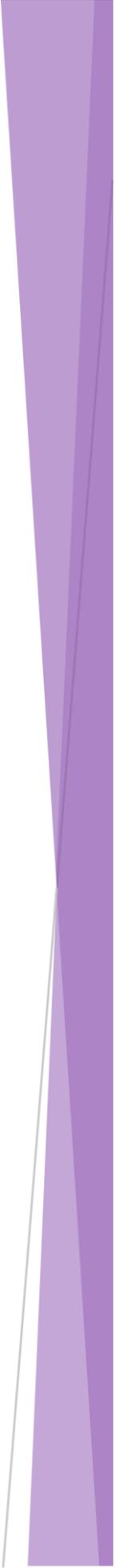
Fecha: 19 de noviembre del 2021

Dedicado a mi madre por la oportunidad,
A Florencia y Shirley por compartir conmigo este camino
A mi familia y amigos por el apoyo incondicional
Gracias.

Índice

Introducción	5
<i>Memoria de miedo</i>	6
<i>Condicionamiento contextual de miedo</i>	8
<i>Estructuras cerebrales implicadas en la memoria del miedo</i>	9
Objetivo	15
Materiales y Métodos	16
<i>Animales</i>	17
<i>Cirugía para administración intracerebral y microinfusión</i>	17
<i>Fluorocitrato (FLC)</i>	18
<i>Microinfusión</i>	18
<i>Condicionamiento de miedo contextual (Día 1)</i>	19
<i>Diseño experimental</i>	20
<i>Análisis estadístico</i>	21
Resultados	22
<i>Experimento 1: Evaluación de los efectos de la inhibición funcional de los astrocitos del C- BLA durante la fase de adquisición</i>	23
<i>Experimento 2: Evaluación de los efectos de la ablación funcional de los astrocitos del C- BLA durante la fase de consolidación</i>	27
<i>Experimento 3: Evaluación de los efectos de la ablación funcional de los astrocitos del C- BLA durante la fase de evocación</i>	30
<i>Experimento 4: Evaluación de los efectos de la inhibición funcional de los astrocitos del C- BLA durante la fase de reconsolidación</i>	33
Discusión y Conclusión.....	34
Bibliografía	34

Introducción



Memoria de miedo

A lo largo de la evolución los organismos han perfeccionado distintas estrategias para hacer frente a los requerimientos ambientales. En los animales, es particularmente importante la defensa contra la predación y la protección de la progenie por lo cual han desarrollado una serie de sistemas neurales capaces de disparar diferentes estados emocionales como el miedo y la ansiedad. El miedo es una respuesta adaptativa, que se desencadena en presencia de señales o contextos particulares que amenazan la supervivencia del individuo y en consecuencia se exhiben una serie de respuestas comportamentales y fisiológicas defensivas que son medibles y predecibles (Johansen et al, 2011; Perusini & Fanselow, 2015; Bergstrom, 2016). La formación de la memoria del miedo es un proceso que se divide en fases distintivas e independientes que se desarrollarán en los siguientes párrafos.

La primera fase se conoce como *adquisición* y se desarrolla durante la sesión de aprendizaje donde se incorpora información nueva y como resultado se forma una memoria a corto plazo (STM, por sus siglas en inglés) lábil e inestable. Posteriormente, en un periodo de aproximadamente 6 horas después de la adquisición, se desarrolla la fase de *consolidación* que consiste en un proceso de estabilización mediante el cual la memoria recientemente adquirida se convierte en una memoria a largo plazo (LTM, por sus siglas en inglés) persistente (Figura 1). Se sabe que en esta fase se inicia una síntesis de proteínas, como las protein-kinasas, y la liberación de factores neurotróficos como BDNF que median los cambios plásticos necesarios para la estabilización y consolidación de la STM (Johansen et al., 2011; Nader 2015). Un ejemplo de los cambios plásticos que se desarrollan durante la consolidación es el aumento en el tamaño de las sinapsis (Ostroff et al., 2010) mediado por la inserción de receptores AMPA, que se sabe están involucrados en la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés; Johansen et al., 2011).

En algunos casos puede presentarse un estímulo ambiental relacionado con la memoria que provoca que esta sea reactivada y da lugar a la fase de *evocación* (Figura 1). Este hecho desencadena un proceso activo de transducción de señales en el que ocurren cambios transitorios que conducen a que la memoria regrese a un estado similar al de la STM y se vuelva lábil y susceptible a sufrir cambios como modificar su robustez o incorporar nueva información a la traza (Nader, 2015; Kida, 2020). Luego de esta labilización, se da lugar a la fase de *reconsolidación* en la que se inicia una nueva expresión génica y síntesis de proteínas que permiten volver a estabilizar la memoria (Johansen et al., 2011; Kida, 2020). Estas fases son de particular importancia ya que permiten “actualizar” la memoria, lo que sería crucial para modelar el comportamiento y poder adaptarse a los requerimientos ambientales fluctuantes.

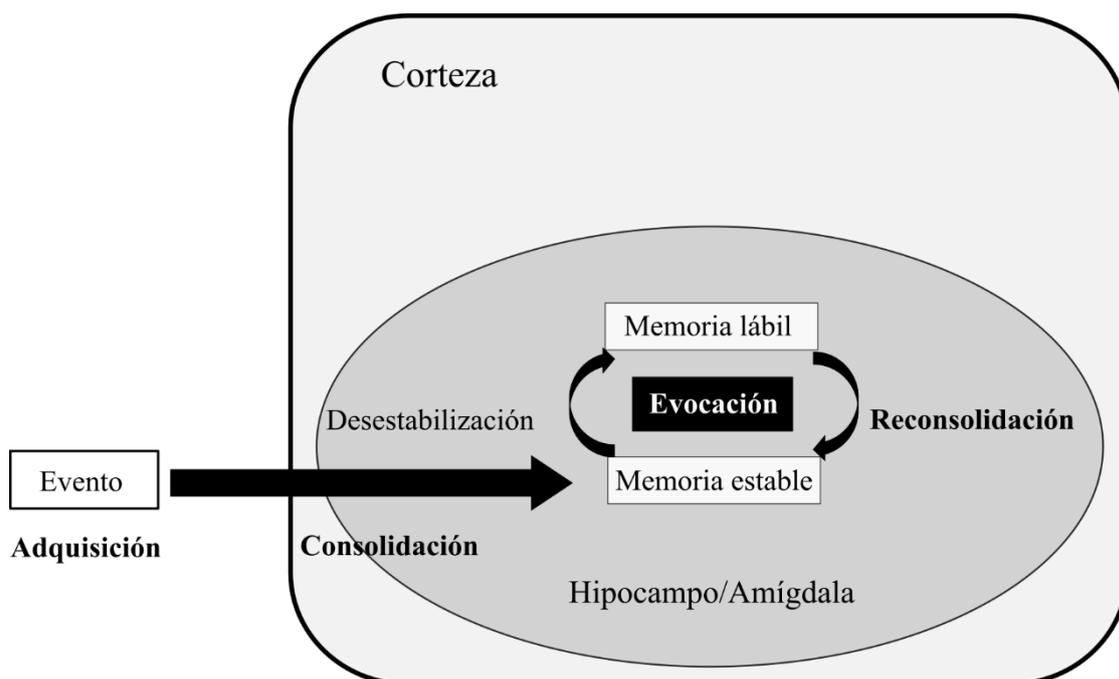


Figura 1: representación esquemática del desarrollo de las distintas fases de la memoria del miedo dentro del cerebro (Modificado de Kida, 2020).

La formación de la memoria de miedo resulta fundamental para poder prever futuras situaciones que pongan en riesgo la supervivencia del individuo, pero una desregulación en los circuitos cerebrales del miedo puede resultar en respuestas desadaptativas que se encuentran presentes en desórdenes psiquiátricos como las fobias y el trastorno de estrés post traumático (Pape & Pare, 2010).

Condicionamiento contextual de miedo

El paradigma más utilizado para explorar los mecanismos de la memoria y el aprendizaje asociativo del miedo es el condicionamiento de miedo Pavloviano (Bergstrom et al., 2011; Fanselow & LeDoux, 1999; Maren, 2001; Maren, 2008). En este modelo se presenta un estímulo ambiental aversivo, controlado por el experimentador, que genera en el animal un estado emocional negativo y suscita un set de comportamientos defensivos mensurables inducidos por la amenaza (Herry & Johansen, 2014). Mas específicamente los sujetos aprenden a asociar un estímulo previo neutral (estímulo condicionado - EC), a un estímulo aversivo incondicionado (EI; e.g. shock eléctrico). En el caso de los paradigmas contextuales los animales asocian el EI al contexto distintivo en el que se produce, entendiendo como contexto el conjunto de elementos discretos que forman un marco multisensorial donde ocurren los procesos cognitivos (Chaaya & Johnson, 2018; Fanselow, 1990). Como resultado de este entrenamiento la reexposición al EC (contexto) evoca una respuesta comportamental de miedo altamente predecible (Respuesta condicionada - RC). La figura 2 ilustra el proceso de condicionamiento contextual.

Dentro del repertorio de RC al miedo en roedores se encuentran aspectos fisiológicos (como activación autonómica simpática) y comportamentales como el congelamiento o *freezing* (Ehrlich et al., 2009; Fanselow, 1980), que se define como la falta absoluta de movimientos por parte del animal (exceptuando los necesarios para respirar) y la magnitud en la que es expresado por el individuo resulta proporcional al nivel de miedo que experimenta (Cushman & Fanselow, 2010).

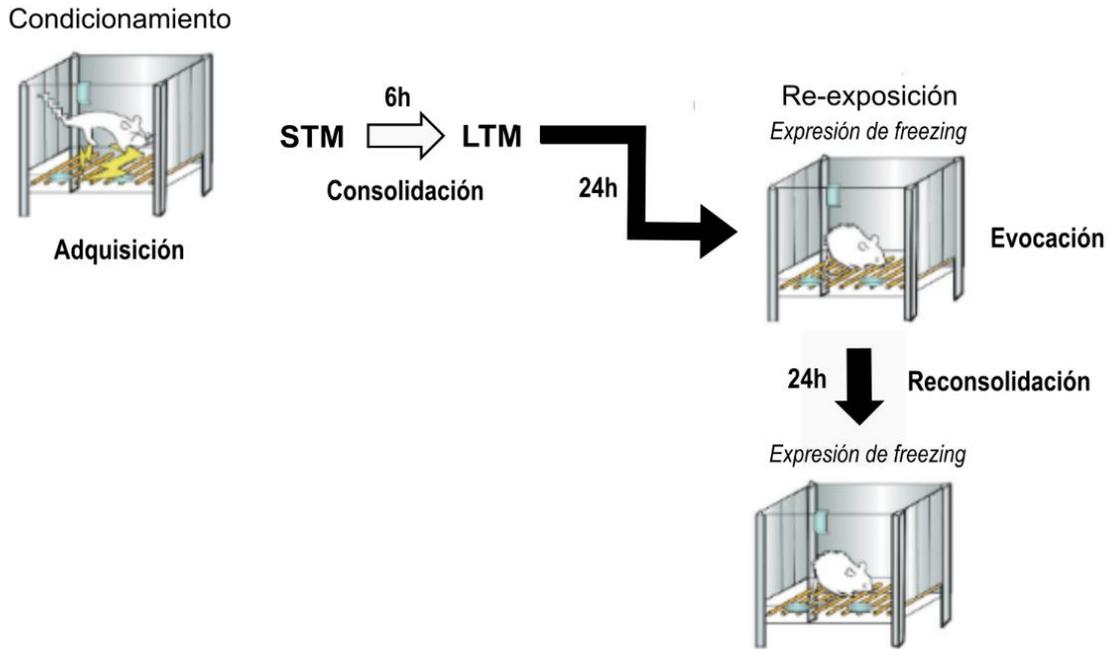


Figura 2: representación esquemática del protocolo de condicionamiento contextual en roedores. (Modificado de Kida, 2020)

Estructuras cerebrales implicadas en la memoria del miedo

En el encéfalo existen dos estructuras que han sido descritas como las principales involucradas en la formación y mantención de la memoria del miedo contextual: el hipocampo y la amígdala (LeDoux, 2000; Pape & Pare, 2010). Se ha postulado que el hipocampo es el encargado de integrar los elementos discretos del ambiente para generar una representación coherente y unificada del contexto (Fanselow & Dong, 2010), mientras que la amígdala recibe aferencias somatosensoriales que le permite codificar la información del dolor inducido por el shock, a la vez que tiene conexiones con el hipocampo y la corteza (Ehrlich et al., 2009; LeDoux, 2000).

La amígdala o complejo amigdalóide es un conjunto de núcleos de sustancia gris anatómica y funcionalmente diferenciados que se localiza en el lóbulo temporal anteromedial ventral. En la rata pueden reconocerse cuatro divisiones supranucleares principales: el núcleo superficial o cortical, la amígdala extendida, el complejo basolateral (C-BLA) y un grupo de células sin

clasificar. A los fines de esta tesina solo profundizaremos en la estructura anatómica del C-BLA. Esta estructura es un conjunto de núcleos heterogéneo entre los cuales se pueden reconocer cuatro principales: lateral (LA), basolateral (BL), ventral basolateral (BLV) y basomedial (BM) (De Olmos et al., 2004).

El C-BLA es el principal sitio de entrada de la información sensorial, como la visual, olfativa, somatosensorial (incluido el dolor), entre otras, gracias a que posee fibras que la conectan bidireccionalmente con otras estructuras como el hipocampo, la corteza prefrontal y el tálamo (LeDoux, 2007; Erlich et al., 2009; LeDoux et al., 1988; De Olmos et al., 2004). Así es que durante el condicionamiento la amígdala recibe las aferencias sensitivas aversivas del EI y la representación contextual del hipocampo, esta convergencia resulta en cambios plásticos que permiten la codificación de la memoria de miedo (Fanselow, 2010; Fanselow & LeDoux, 1999). Por otra parte, el C-BLA, también mantiene conexiones con el núcleo central (parte de la amígdala extendida), que es la principal estructura de salida de la amígdala y controla las respuestas autonómicas y motoras asociadas al aprendizaje (Fig. 3, LeDoux. 2007; Erlich et al., 2009).

La importancia de la amígdala en la formación de la memoria del miedo ha sido reportada por diversos autores (Schafe & LeDoux, 2000; Blair et al., 2001; Nader et al., 2000). Por ejemplo, se ha visto que una lesión en la amígdala interfiere con el condicionamiento (Blanchard & Blanchard, 1972). Asimismo, otros estudios han reportado que la infusión de fármacos inhibidores de la síntesis de proteínas como la anisomicina en el C-BLA después del condicionamiento produce un déficit en la consolidación de la memoria (Nader, 2015).

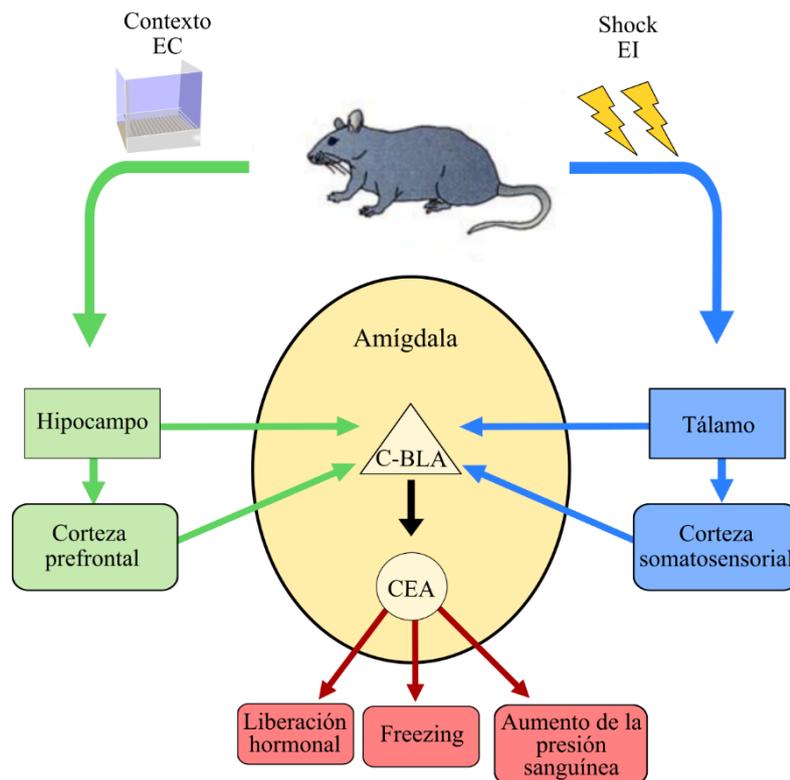


Figura 3: modelo del circuito cerebral implicado en la formación de la memoria de miedo contextual. (Modificado de Phelps & LeDoux, 2005).

Astrocitos en relación a la formación de la memoria de miedo

En el campo de las neurociencias, las investigaciones sobre los procesos relacionados con la memoria históricamente se han enfocado principalmente en el estudio de las neuronas (Blair et al., 2001; Pape & Pare, 2010; Li et al., 2013; Nader, 2015; Rossignoli et al., 2017; Casagrande et al., 2018). Sin embargo, en el encéfalo existen otro grupo de células con características y funciones distintivas que se conocen como células gliales y representan alrededor de un 50% del total de células cerebrales (Herculano-Houzel, 2014).

Los astrocitos son un tipo especializado de glía que tienen una característica forma de estrella y poseen muchos procesos finos como ramas que les permiten formar un contacto estrecho con las neuronas, envolviendo

las sinapsis, y los vasos sanguíneos cerebrales (Khakh & Sofroniew, 2015; Adamsky & Goshen, 2018). Si bien estas células son incapaces de disparar potenciales de acción, se sabe que pueden ser excitadas mediante la elevación de las concentraciones de Ca^{+2} citosólico principalmente provisto de la movilización de los iones almacenados en el retículo endoplásmico. Estas corrientes de Ca^{+2} constituyen una vía de comunicación astrocítica ya que pueden propagarse a otros astrocitos mediante las uniones gap que existen entre células vecinas, las cuales forman dominios anatómicos y funcionales altamente organizados que prácticamente no se solapan (Adamsky & Goshen, 2018; Bender et al., 2016; Stehberg et al., 2012).

Clásicamente se creyó que las células gliales tenían un rol inferior en el sistema nervioso mediante la mantención de las condiciones ideales para las funciones neuronales. Sin embargo, en las últimas décadas, ha surgido el concepto de la sinapsis tripartita (Figura 4) que propone a los astrocitos como participantes fundamentales de la conexión sináptica (Araque et al., 1999; Haydon, 2001; Allen & Barres 2009). Este cambio en el paradigma del estudio de las conexiones neurales está respaldado por un amplio set de evidencias que sugieren que la glía, tiene una variedad de funciones entre las cuales se encuentra el soporte fisiológico de las neuronas y la regulación de la neurotransmisión. En este sentido, se ha visto que los astrocitos son capaces de detectar la actividad neuronal y responder a esta en múltiples escalas gracias a que expresan diversos receptores (e.g. receptores glutamatérgicos) que permiten una comunicación bidireccional entre estos y las neuronas (Bender et al., 2016; Adamsky & Goshen, 2018; Allen & Barren, 2009).

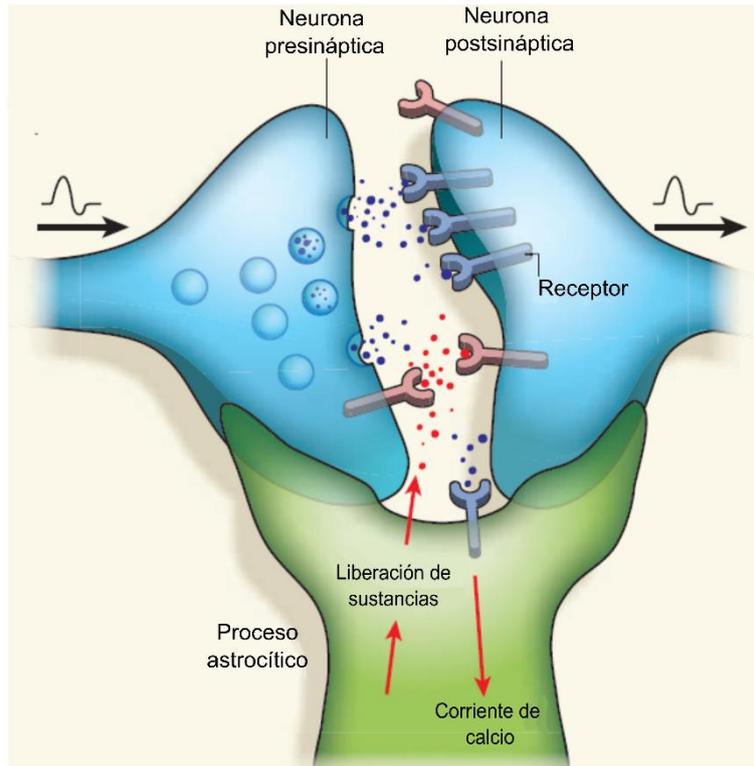


Figura 4: representación de una sinapsis tripartita. En el esquema se puede observar que el terminal astrocítico posee receptores del mismo tipo que los neuronales. Cuando se liberan los neurotransmisores desde la neurona presináptica, los receptores ubicados en el astrocito se activan provocando un incremento del Ca^{+2} intracelular y la consiguiente liberación de sustancias neuro activas capaces de modular la sinapsis. (Modificado de Allen & Barres, 2009)

Una de las respuestas de los astrocitos a la actividad neuronal son los cambios en su morfología ya que se sabe que son capaces de extender y retraer sus procesos perisinápticos (PAPs) en coordinación con los elementos pre y postsinápticos (Bender et al., 2016; Santello & Volterra, 2019; Bender et al., 2020). Por otro lado, recientes descubrimientos han comprobado que los astrocitos liberan gliotransmisores (e.g. glutamato, D-serina) que pueden unirse a receptores post o presinápticos resultando en una modulación de la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica (Fig 4), a la vez que controlan el microambiente sináptico (e.g. recaptación de glutamato) y la formación y eliminación de la sinapsis (Vezzoli et al., 2019).

Existe evidencia que indica que los contactos astrocíticos no se distribuyen al azar y están relacionados con los cambios estructurales relacionados con el aprendizaje soportando y potenciando la memoria normal (Ostroff et al., 2014; Adamsky et al., 2018; Suzuki et al., 2011). También se ha observado que la comunicación bidireccional astrocito-neurona es importante en la fisiología de la amígdala influenciando las respuestas comportamentales (Martin-Fernandez et al., 2017; Stehberg et al., 2012). Por esta razón, la integración de la señalización y modulación astrocítica en el estudio de los procesos cognitivos que resulta de gran importancia para comprender no solo los procesos de memoria normales, sino también para entender la base de las alteraciones producidas en las condiciones patológicas.

Una herramienta ampliamente utilizada en la literatura para el estudio de la función astrocítica en distintas áreas del cerebro es el inhibidor metabólico fluorocitrato (FLC) (Wang et al., 2009; Christian and Huguenard, 2013; Shang et al., 2015; Liao et al., 2017). Se ha reportado que este fármaco es captado preferentemente por los astrocitos (Paulsen et al., 1987; Hassel et al., 1992) provocando la disminución transitoria del metabolismo mediante la inhibición de la encima aconitasa en el ciclo de Krebs (Morselli et al., 1968). Como consecuencia de la interrupción del metabolismo, se produce una baja en los niveles astrocíticos de ATP además de un decremento de la síntesis de aminoácidos como la glutamina y de la recaptación de neurotransmisores como glutamato y GABA (Clarke et al., 1970; Paulsen et al., 1987; Hassel et al., 1997). El efecto selectivo y reversible del FLC lo convierte en un método de mucha utilidad en el estudio de la función astrocítica en procesos dinámicos como lo es el aprendizaje y la formación de la memoria.

Objetivo general:

Indagar sobre la participación de los astrocitos del C-BLA en las distintas etapas de formación de la memoria de miedo contextual.

Objetivos específicos:

- 1) Evaluar los efectos de la inhibición farmacológica de los astrocitos del C-BLA durante la fase de adquisición (administración de fluorocitrato antes del condicionamiento)
- 2) Evaluar los efectos de la inhibición farmacológica de los astrocitos del C-BLA durante la fase de consolidación (administración de fluorocitrato luego del condicionamiento)
- 3) Evaluar los efectos de la inhibición farmacológica de los astrocitos del C-BLA durante la fase de evocación (administración de fluorocitrato antes del test de recuerdo)
- 4) Evaluar los efectos de la inhibición farmacológica de los astrocitos del C-BLA durante la fase de reconsolidación (administración de fluorocitrato luego de la evocación de la memoria)

Hipótesis:

La inhibición farmacológica de astrocitos del C-BLA en alguna/s de las distintas fases de la memoria de miedo induce un déficit mnésico, indicando la importancia de los astrocitos del C-BLA en dicho proceso.

Se espera que en aquellas fases en las que la participación de los astrocitos sea crítica, los animales que sean infundidos con el inhibidor astrocítico muestren un déficit en la performance cognitiva, operacionalizada como una disminución en la respuesta de congelamiento frente al estímulo incondicionado.

Materiales y Métodos

Animales

Para cumplir con los objetivos propuestos se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar (300-330 g) que fueron criadas en el bioterio del IFEC-CONICET y alojadas en cajas de plexiglass (2 o 3 individuos por caja). Los animales se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 hs a temperatura estable (22-24 grados centígrados) con libre acceso de agua y comida. Todos los procedimientos se realizaron durante el ciclo de luz y bajo las condiciones de bienestar animal aprobadas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-FCQUNC, Resolución 856, EXP-UNC:001 7152/2018). En todos los casos, con el fin de minimizar el estrés y facilitar el manejo, una semana antes del inicio de los experimentos se tomaron los recaudos necesarios para que las ratas se habituaran a la manipulación del experimentador como el transporte dentro del bioterio, pesaje, inmovilización para los procedimientos, etc.

Cirugía para administración intracerebral y microinfusión

Bajo condiciones de asepsia, las ratas fueron anestesiadas con una combinación de ketamina (60 mg/kg, i.p) y xilacina (7 mg/kg i.p.). Posteriormente se posicionaron en un aparato estereotáxico para ratas y se colocaron bilateralmente cánulas guías de acero inoxidable (22 G) en el complejo basolateral de la amígdala (C-BLA) en las coordenadas AP: -2.8 mm, LM: +/- 5 mm, DV: -8 mm (Paxinos y Watson, 2017). Las cánulas se fijaron al cráneo con acrílico dental y dos tornillos enroscados en el hueso craneal. Además, se les administraron 2,1mg por cada 100g de peso de una combinación de penicilina y estreptomina (Norcilina) como antibiótico para evitar posibles infecciones bacterianas. Luego de la cirugía los animales permanecieron en sus cajas habituales por 10 días antes de iniciar los experimentos de condicionamiento.

Fluorocitrato (FLC)

Se ha reportado que la administración de una dosis de 1nmol/ μ l de FLC en el neoestriado produce una inhibición de la función astrocítica que persiste por al menos 12hs y se recupera 24hs luego de la administración (Paulsen et al., 1987). Por otro lado, existe evidencia de que el tratamiento con FLC produce efectos significativos entre 30 minutos y 1 hora después de la administración (Shang et al., 2015; Christian and Huguenard, 2013; Damolin et al., 2007). Con base en antecedentes de la literatura, en el presente trabajo se utilizaron dosis de 0,5nmol/0,5 μ l o de 1 nmol/0,5 μ l de FLC para la administración en el C-BLA (Hassel et al., 1997; Liao et al. 2017).

Para la preparación de la solución de fluorocitrato se disolvieron 8 mg de sal de bario de ácido DL-fluorocítrico en 1 ml de HCl 0.1 M, se precipitó el Ba⁺² con 50 μ l de Na₂SO₄ 0.1 M y luego se añadieron 0.2 ml de Na₂HPO₄ 0.1 M. Se centrifugó a 1000g por 5 min, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente por 5 minutos a 1000g. El nuevo sobrenadante se diluyó en solución salina a una concentración final de 1nmol/ μ l o 1 nmol/0.5 μ l (pH 7.4).

Microinfusión

Para la administración de la droga se fabricaron cánulas inyectoras (30 G) de una longitud 2mm mayor a las cánulas guía (para evitar así la presión negativa al momento de la infusión) que se conectaron mediante vías de polietileno a micro jeringas de 10 μ l (Hamilton) montadas en una bomba de microinfusión. Las cánulas inyectoras se insertaron dentro de las guías para la administración bilateral intra C-BLA. Cada animal fue infundido con 0,5 μ l de solución salina o de un inhibidor metabólico de los astrocitos llamado fluorocitrato (FLC) en las concentraciones de 0,5nmol/0,5 μ l o de 1 nmol/0,5 μ l, a una velocidad constante de 0,5 μ l/min.

Condicionamiento de miedo contextual (Día 1)

Se utilizó una cámara de condicionamiento que consiste en una caja de acrílico blanco (20 cm x 23 cm x 20 cm) con una tapa transparente y un suelo de rejilla con 10 barras paralelas de acero inoxidable (cada una de 4 mm de diámetro y separadas entre sí por 1,5 cm) conectada a un generador para producir choques eléctricos de intensidad y duración definidas. La cámara se ubicó en una habitación con aislamiento sonoro, iluminación blanca y uniforme y con una temperatura constante (21 ± 2 °C). En todos los ensayos, después de cada animal, la cámara se limpió con alcohol al 70% con el fin de eliminar cualquier posible olor que dejara el individuo anterior.

En el día 1 del protocolo, cada animal fue introducido en la cámara de condicionamiento donde permaneció por 3 minutos, tiempo requerido para que el animal pueda generar una representación acabada del contexto. Además, este intervalo nos permitió determinar el freezing basal de cada individuo (período pre- EI). Seguidamente se aplicaron dos shocks de 1mA de 3 segundos de duración cada uno y separados entre sí por 30 segundos (EI). Luego del último shock la rata continuó en la cámara por 50 segundos (período post- EI), pasado este tiempo se la devolvió a su caja de alojamiento. En todo el procedimiento se realizaron filmaciones que luego fueron analizadas cuantificando los niveles de freezing, considerados como la cantidad de tiempo en que el animal permanece inmóvil, durante los períodos de pre y post-EI.

Test 1 (Día 3)

Después de 48 horas del condicionamiento se realizó un test de memoria mediante la reexposición de los animales al contexto donde recibieron el estímulo (caja de condicionamiento) durante cinco minutos y luego se cuantificaron los niveles de freezing a partir de las filmaciones obtenidas. Una excepción fue un grupo de animales del experimento 4 (ver sección de diseño experimental) que no fueron sometidos a este test con el objetivo de que no atravesaran el proceso de evocación que resulta fundamental para que ocurra la reconsolidación.

Test 2 (Día 5)

48 hs después del test 1, se realizó una segunda prueba de memoria con una nueva exposición de los animales al contexto de condicionamiento por cinco minutos y se cuantificaron los niveles de freezing.

Finalizado el procedimiento del día 5 los animales fueron sacrificados mediante decapitación por guillotina para la posterior verificación del sitio de inyección.

Diseño experimental

Teniendo en cuenta que el FLC produce un efecto significativo aproximadamente 1 hora después de la administración (Shang et al., 2015; Christian and Huguenard, 2013; Damolin et al., 2007), la infusión de los animales se realizó a diferentes tiempos respecto al condicionamiento, en relación a la fase de la formación de memoria a evaluar, quedando delimitados los siguientes experimentos:

- *Experimento 1:* Con el fin de evaluar la fase de adquisición, 60 minutos antes de proceder a realizar el condicionamiento en el día 1 tres grupos de animales asignados aleatoriamente fueron infundidos con solución salina (SAL: N=13), con FLC en la concentración de 0,5nmol/0,5 µl (FLC 0,5: N=12) o con FLC en la concentración de 1 nmol/0,5µl (FLC 1: N=10).
- *Experimento 2:* para evaluar la fase de consolidación se realizó la infusión 60 minutos después de haberse realizado el condicionamiento en el día 1, ya que observaciones previas indicaban que la administración inmediatamente después del condicionamiento interfería con la formación de la memoria también en el grupo control impidiendo el análisis de los resultados y posteriores conclusiones. En este set de experimentos se utilizaron 28 animales de los cuales 13 fueron infundidos con solución salina y 15 con fluorocitrato a una concentración de 0,5nmol/0,5 µl.

- *Experimento 3:* teniendo como objetivo la fase de evocación, la infusión se realizó 60 minutos antes de la reexposición al contexto en el test 1 (test de recuerdo) en dos grupos de 12 ratas cada uno que recibieron salina o fluorocitrato 0,5nmol/0,5 μ l.
- *Experimento 4:* para la evaluación de la reconsolidación, en el día 3, dos grupos aleatorios de individuos fueron infundidos inmediatamente después de realizado el test 1 (reactivación de la memoria) con salina o con fluorocitrato 0,5nmol/0,5 μ l (SAL: N=10, FLC 0,5 N=10). Un tercer grupo de animales, que no fue expuesto al contexto, también fue infundido al mismo tiempo que los dos anteriores con una dosis de 0,5nmol/0,5 μ l de fluorocitrato (FLC-NR: N=6).

Análisis estadístico

En el texto, los resultados se expresan como la media del porcentaje de *freezing* \pm DS. En los gráficos están representadas las observaciones individuales mediante dispersión de puntos. Los datos fueron analizados mediante prueba T de Student, ANOVA de una vía o ANOVA de medidas repetidas según correspondiera. Cuando el ANOVA indicó diferencias significativas se realizaron análisis post hoc de Newman–Keuls. En todos los casos, el valor mínimo para la significación estadística fue de $p < 0.05$. Por otro lado, se calcularon índices de respuesta al shock (*freezing* post-EI/*freezing* pre-EI), índices de aprendizaje (*freezing* test 1/*freezing* pre-EI) e índices de retención (*freezing* test 2/*freezing* test 1)

Resultados

Experimento 1: Evaluación de los efectos de la inhibición funcional de los astrocitos del C-BLA durante la fase de adquisición

Con el fin de facilitar la explicación de los análisis estadísticos a continuación se expondrán en orden cronológico las distintas fases de este experimento en el que los animales fueron infundidos en C-BLA con SAL o con FLC en las concentraciones de 0,5 nmol/0,5 μ l o 1 nmol/0,5 μ l y sometidos al protocolo correspondiente (Figura 5A).

Previo al test de memoria resulta importante realizar un análisis de los niveles de freezing de los animales en el día del condicionamiento para evaluar el índice de respuesta al EI (estímulo incondicionado) ya que, si bien los registros observacionales durante el desarrollo del experimento indican que todos los animales manifestaron una reacción notoria a cada uno de los shocks, cabría la posibilidad de que la administración de FLC en la amígdala antes del condicionamiento influyera en la percepción del EI afectando las interpretaciones subsiguientes.

Al analizar los niveles de freezing para cada tratamiento encontramos que los animales presentaron, en el tiempo pre-EI, niveles de freezing similares con un promedio del 37% (SAL=37 \pm 15%, FLC0,5=39 \pm 7%, FLC1=34 \pm 12%) que aumentó a un promedio de 73% (SAL=72 \pm 25%, FLC0,5=75 \pm 17%, FLC1=71 \pm 19%) en el análisis post-EI (Figura 5B). El ANOVA de medidas repetidas (tratamiento x tiempo) reveló que no hubo diferencias entre los tratamientos ($F_{(2, 30)} = 0,33$, $p = 0,7$) pero sí los niveles de freezing observados en el tiempo post-EI fueron significativamente mayores en comparación a los del tiempo pre-EI ($F_{(1, 30)} = 81,75$, $p < 0,0001$; test de Newman-Keuls, $p = 0,0001$) y no hubo una interacción entre ambas variables ($F_{(2, 30)} = 0,24$, $p = 0,8$). Esto se refleja también en los índices de reacción (figura 5C) obtenidos para cada tratamiento entre los cuales no se hallaron diferencias significativas (ANOVA, $F_{(2, 30)} = 0,71$, $p = 0,5$). Nuestros resultados sugieren que todos los animales presentaron una reacción al condicionamiento similar independientemente del tratamiento.

Durante la reexposición al contexto de condicionamiento en el test 1, como era esperable, los animales del grupo SAL mostraron un aumento del freezing con respecto al basal (pre-EI) al $49\pm 15\%$ mientras que los grupos FLC 0,5 y FLC 1 se mantuvieron en los niveles basales con promedios de 34 ± 8 y $29\pm 13\%$ respectivamente. Estas medias fueron significativamente diferentes entre los tratamientos (ANOVA $F_{(2,30)} = 7,68$, $p=0,002$). El test de Newman-Keuls arrojó que ambos grupos tratados con FLC presentaron niveles de freezing menores que el grupo SAL (FLC 0,5: $p=0,006$; FLC 1: $p=0,003$), pero no se hallaron diferencias entre las dosis de la droga ($p=0,5$) (Figura 5D).

Dado los altos niveles de freezing basal (pre-EI) y con el fin de minimizar la variabilidad entre los datos individuales que podrían dificultar las interpretaciones, se calculó un índice de aprendizaje individual (% de freezing test 1/pre-EI). Consecuente con los resultados anteriores, se halló una diferencia significativa entre las medias (ANOVA, $F_{(2, 32)} = 4,99$, $p=0,01$) y el test de Newman-Keuls mostró que los índices de los grupos FLC resultaron significativamente menores que el del grupo SAL (FLC 0,5: $p=0,006$; FLC 1: $p=0,003$) pero no difirieron entre sí ($p=0,9$). En conjunto, estos resultados indican que la administración de fluorocitrato en BLA antes del condicionamiento produjo un déficit en la memoria del miedo contextual. Por otro lado, también hemos observado que no hubo un efecto dosis-respuesta en las dos concentraciones ensayadas, aunque los altos niveles de freezing basales no permitirían una mayor reducción de la ya observada con la dosis de 0.5 nmol, como se refleja en la proporción Test 1/pre-EI (Figura 5E).

Inesperadamente, durante el test 2, los animales del grupo SAL redujeron sus niveles de freezing a valores similares a los obtenidos durante el pre-EI ($37\pm 15\%$) imposibilitando cualquier interpretación respecto a los demás grupos experimentales (Figura 5D). En efecto, el ANOVA no arrojó diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA, $F_{(2, 30)} = 1,20$, $p=0,3$). En la misma dirección el ANOVA de medidas repetidas (tratamiento x test) mostró que existe una interacción entre las variables ($F_{(2, 30)} = 3,96$, $p=0,03$) y el test de Newman-Keuls confirmó que los animales del grupo SAL presentaron un nivel de freezing menor en comparación con su propia performance en el test 1 ($p=0,001$), mientras que en los demás grupos no se hallaron diferencias

significativas (FLC 0,5 $p= 0,8$; FLC 1 $p= 0,9$). Estos resultados podrían deberse a un cambio en la estrategia que emplearon las ratas de este grupo ante una tercera exposición al contexto, por ejemplo, la expresión del comportamiento de huida. Otra interpretación posible sería que la exposición en el test 1 indujo una extinción de la memoria, pero resulta improbable ya que 5 minutos es un periodo habitualmente insuficiente para generar un proceso de extinción. A pesar de ello, los grupos FLC no variaron su desempeño con respecto al test anterior lo que favorece la interpretación de que la inhibición astrocítica impidió la adquisición/consolidación de manera permanente.

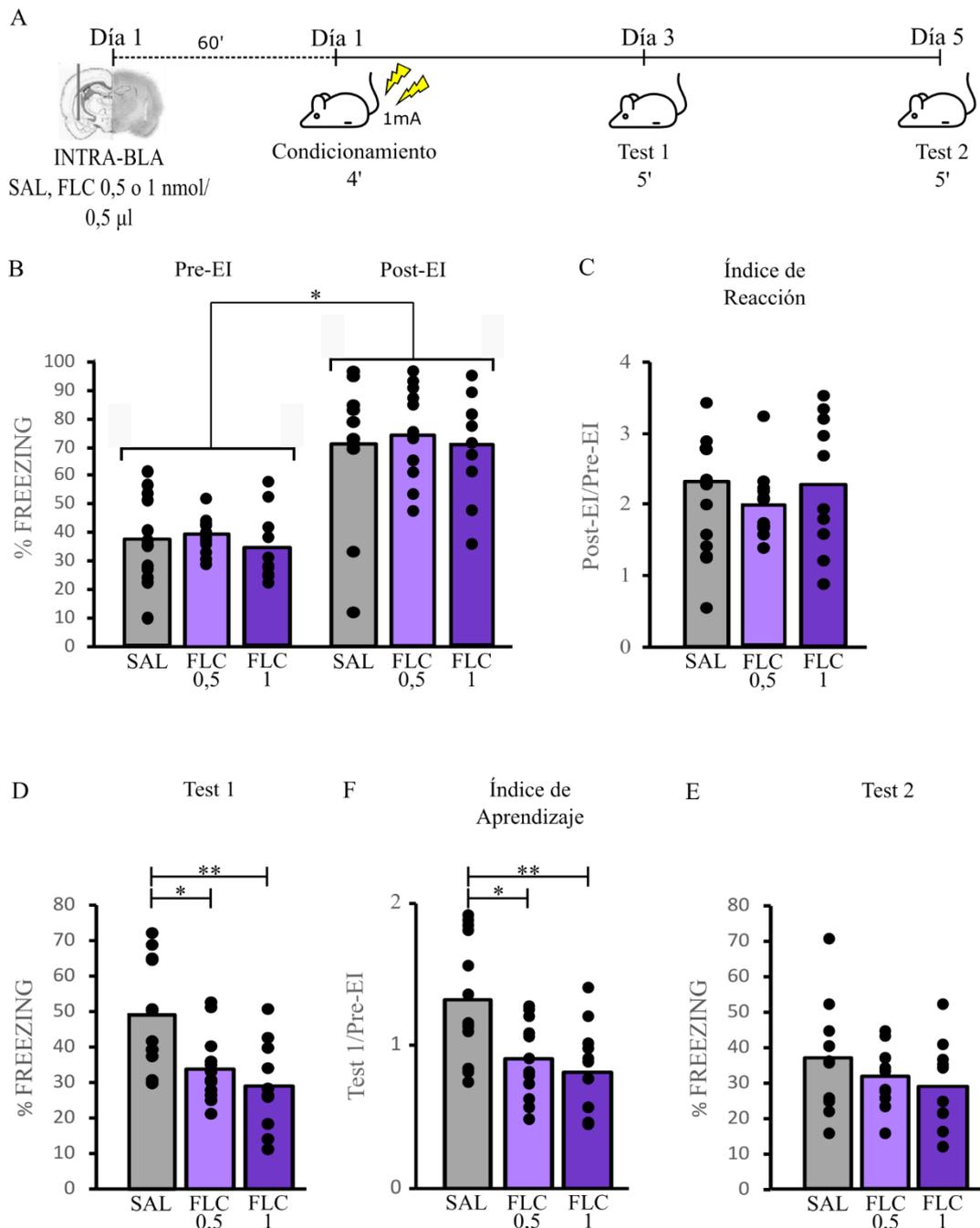


Figura 5: Evaluación de la adquisición de la memoria. A) Representación esquemática del diseño experimental. B) Porcentaje de freezing en los tiempos Pre-EI y Post-EI. En el tiempo Post-EI todos los animales presentaron niveles de freezing más elevados que en el Pre-EI (test de Newman-Keuls, $p=0,0001$). C) El índice de reacción al shock (Post-EI/Pre-EI). D) Porcentaje de freezing de los animales durante los test 1 y 2. Los grupos FLC mostraron niveles de freezing significativamente menores a los del grupo SAL en el test 1 (test de Newman-Keuls, FLC 0,5: $p=0,006$; FLC 1: $p=0,003$). E) Índice de memoria (Test1/Pre-EI) (test de Newman-Keuls, FLC 0,5: $p=0,006$; FLC 1: $p=0,003$) (SAL: N=12; FLC 0,5: N=11; FLC 1: N= 10). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas cuando $p<0.05$.

Experimento 2: Evaluación de los efectos de la ablación funcional de los astrocitos del C-BLA durante la fase de consolidación

En el experimento anterior se observó que la administración de FLC en C-BLA interfirió con la adquisición de la memoria. Sin embargo, se ha visto que el efecto de la droga perdura hasta 12 horas después de la infusión, tiempo suficiente para que se desarrolle el proceso de consolidación por lo que esta fase también pudo haber sido afectada. Para abordar de manera más selectiva la fase de consolidación los animales fueron sometidos al protocolo correspondiente (Figura 6A) y, una hora después, fueron infundidos en BLA con SAL o FLC (0,5 nmol/0,5 μ l).

Si bien en este y en los siguientes experimentos los animales estuvieron libres de la droga durante el condicionamiento, el análisis del día 1 sigue siendo valioso para descartar la presencia de diferencias en la percepción del EI propias de la variabilidad entre grupos que pudieran dificultar la interpretación de los test posteriores.

En este caso los animales del grupo SAL presentaron un porcentaje de freezing basal promedio del $20\pm 6\%$ y los del grupo FLC $19\pm 9\%$, que se vio aumentado a $37\pm 25\%$ y $43\pm 20\%$ respectivamente en el tiempo post-EI (Figura 6B). El ANOVA de medidas repetidas confirmó que hubo un aumento significativo de las medias obtenidas en el tiempo post-EI en comparación con las del pre-EI ($F_{(1, 26)} = 21,04$, $p = 0,0001$; test de Newman-Keuls $p = 0,0002$), pero que no existen diferencias significativas entre grupos ($F_{(1, 26)} = 0,25$, $p = 0,62$) ni interacción entre las variables ($F_{(1, 26)} = 0,8$, $p = 0,4$). Congruente con ello, no se hallaron diferencias significativas entre los índices de reacción calculados para cada grupo (prueba T, $p = 0,1$) lo que indicaría que todos los animales reaccionaron de manera similar a los shocks tal y como sugerían las observaciones durante el condicionamiento (Figura 6C).

Si la consolidación se viera afectada por la inhibición de los astrocitos, se esperaría que los niveles de freezing del grupo FLC durante la reexposición al contexto en el test 1 fueran significativamente menores a los del grupo SAL y

que esta tendencia se mantuviera en el test 2. Sin embargo, ambos grupos mostraron niveles de freezing similares (SAL=44±12%, FLC=45±15%; prueba T $p=0,8$) en el test 1 (Figura 6D). Al igual que en el experimento anterior, se calculó el índice de aprendizaje (Figura 6E) y, si bien el del grupo FLC resultó ligeramente mayor que el del grupo SAL (3,11±1 y 2,31±2 respectivamente), no se encontraron diferencias significativas entre ambos (prueba T $p=0,2$). A partir de estos datos podemos inferir que la administración de fluorocitrato después del condicionamiento no interfirió con la consolidación de la memoria.

Durante la segunda reexposición en el día 5 no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de freezing de ambos grupos (SAL=39±12%, FLC=43±13%; prueba T $p=0,3$). De manera similar al experimento anterior, se observó que los animales del grupo SAL disminuyeron su porcentaje de freezing en comparación con su propio desempeño en el test anterior (Figura 6D). No obstante, en esta oportunidad el ANOVA de medidas repetidas mostró que no existen diferencias significativas entre ambos test ($F_{(1, 26)} = 2,20, p=0,1$) ni interacción entre las variables ($F_{(1, 26)} = 0,44, p=0,5$). Estos datos replican los resultados obtenidos en el test 1 apoyando la hipótesis de que, bajo este protocolo, la consolidación de la memoria no fue afectada.

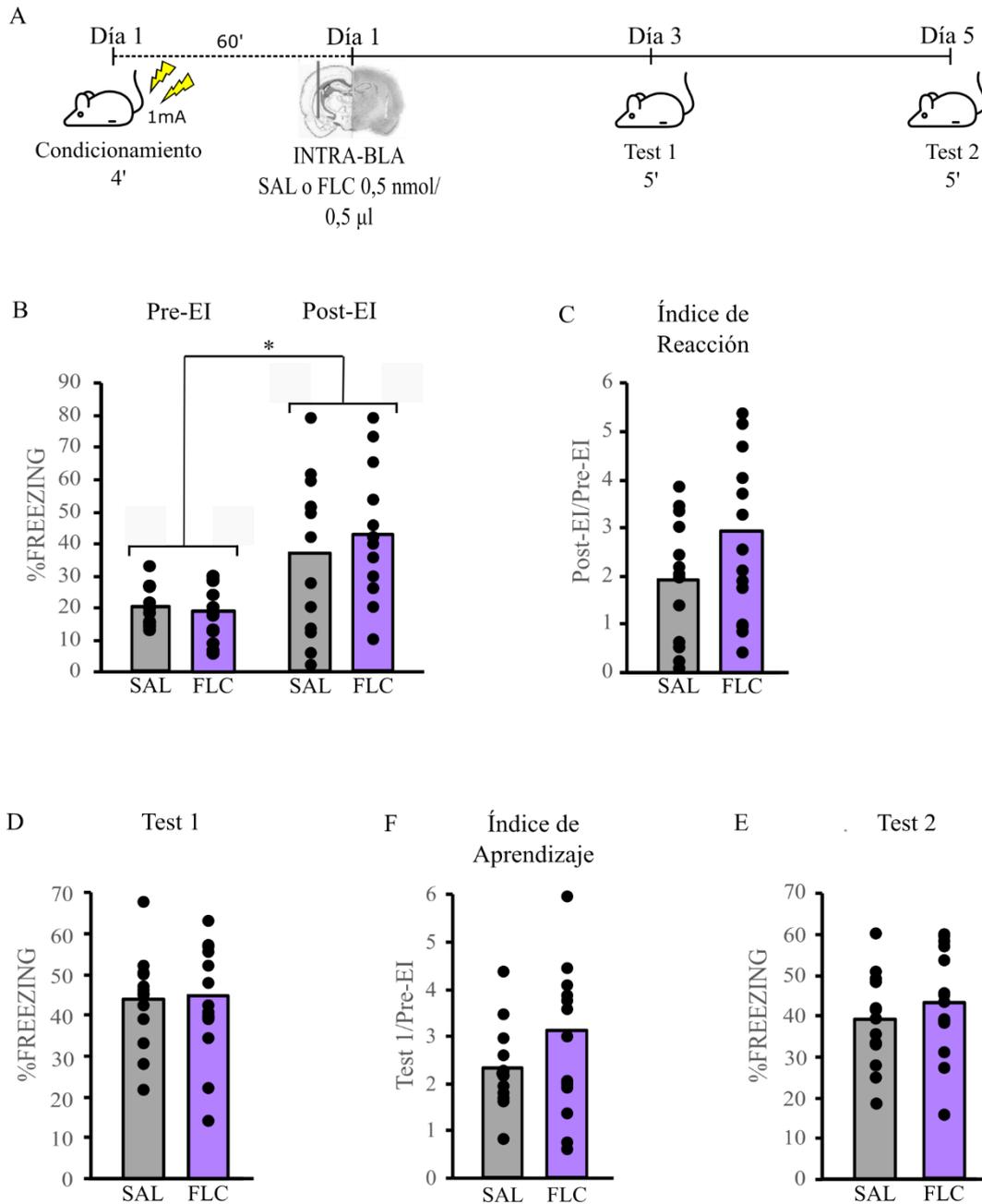


Figura 6: **Evaluación de la consolidación de la memoria.** A) Representación esquemática del diseño experimental. B) Porcentaje de freezing en los tiempos Pre-EI y Post-EI. En el tiempo Post-EI todos los animales presentaron niveles de freezing más elevados que en el Pre-EI (test de Newman-Keuls, $p=0,0001$). C) El índice de reacción al shock (Post-EI/Pre-EI) no fue significativamente distinto entre los grupos (prueba T, $p=0,1$). D) Porcentaje de freezing de los animales durante los test 1 y 2. E) Índice de memoria (Test1/Pre-EI). (SAL: N=13; FLC: N=15). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas cuando $p<0,05$.

Experimento 3: Evaluación de los efectos de la ablación funcional de los astrocitos del C-BLA durante la fase de evocación

Siguiendo con el orden cronológico de las fases de la memoria y con el fin de abordar la evocación, las ratas fueron infundidas en C-BLA con SAL o FLC (0,5 nmol/0,5 μ l) una hora antes de realizar el test de recuerdo (test 1) como indica el protocolo de la figura 7A.

En el análisis del tiempo pre-EI encontramos que los animales del grupo SAL presentaron un porcentaje de freezing basal promedio de $26\pm 10\%$, mientras que los del grupo FLC uno de $31\pm 9\%$. En ambos casos los niveles de freezing se vieron aumentados en el análisis del tiempo pre-EI a 44 ± 19 y $52\pm 19\%$ respectivamente (Figura 7B). El ANOVA de medidas repetidas reveló que dicho aumento fue significativo ($F_{(1, 22)} = 24,87$, $p < 0,0001$; test de Newman-Keuls $p = 0,0001$) pero no hubo diferencias significativas entre los grupos ($F_{(1, 22)} = 1,60$, $p = 0,22$) ni interacción entre las variables ($F_{(1, 22)} = 0,16$, $p = 0,7$). Estos resultados se ven respaldados por el índice de reacción (Figura 4C) que no mostró diferencias significativas entre los grupos (prueba T $p = 0,2$). En conjunto, estos datos indican que ambos grupos de animales mostraron una respuesta semejante ante el EI.

En este set de experimentos se esperaba que: si la evocación fuera mermada por la inhibición de los astrocitos, los animales administrados con FLC presentarían menores niveles de freezing durante el test 1 y que estos se recuperarían en el test 2, cuando la droga ya ha sido eliminada. Sin embargo, en este caso ambos grupos evidenciaron niveles de freezing similares (SAL= $68\pm 8\%$, FLC= $64\pm 9\%$) en el test 1 (Figura 7D) entre los cuales no se hallaron diferencias significativas (prueba T $p = 0,3$). Asimismo, cuando se analizaron los índices de aprendizaje (Figura 7E), tampoco se hallaron diferencias entre los grupos (prueba T $p = 0,1$). Estos datos favorecen la hipótesis de que la administración de fluorocitrato no interfiere con la correcta evocación de la memoria.

Durante el test 2 (Figura 7F) los animales de ambos grupos evidenciaron niveles de freezing entre los que tampoco se hallaron diferencias significativas (SAL=53±14%, FLC=49±11%; prueba T p=0,4). En este experimento también se observó que las medias de freezing en ambos grupos disminuyeron con respecto a las obtenidas en el test 1 (ANOVA tratamiento x test, $F_{(1, 22)} = 35,31$, p=0,00001; test de Newman Keuls p=0,0001), sin embargo, no se encontraron interacciones entre los tratamientos y los dos test ($F_{(1, 22)} = 0,03$, p=0,9) ni diferencias entre los grupos en el test 2 ($F_{(1, 22)} = 1,15$, p=0,29). Debido a la diferencia en los niveles de freezing de ambos test, se calcularon índices de retención de la memoria (% de freezing test 2/test 1) para cada grupo (Figura 7G), entre los cuales no se hallaron diferencias significativas (prueba T p=0,8). Estos datos favorecen la hipótesis de que la administración de fluorocitrato no interfiere con la evocación de la memoria, por otro lado, también sugieren que la reconsolidación tampoco se ve afectada.

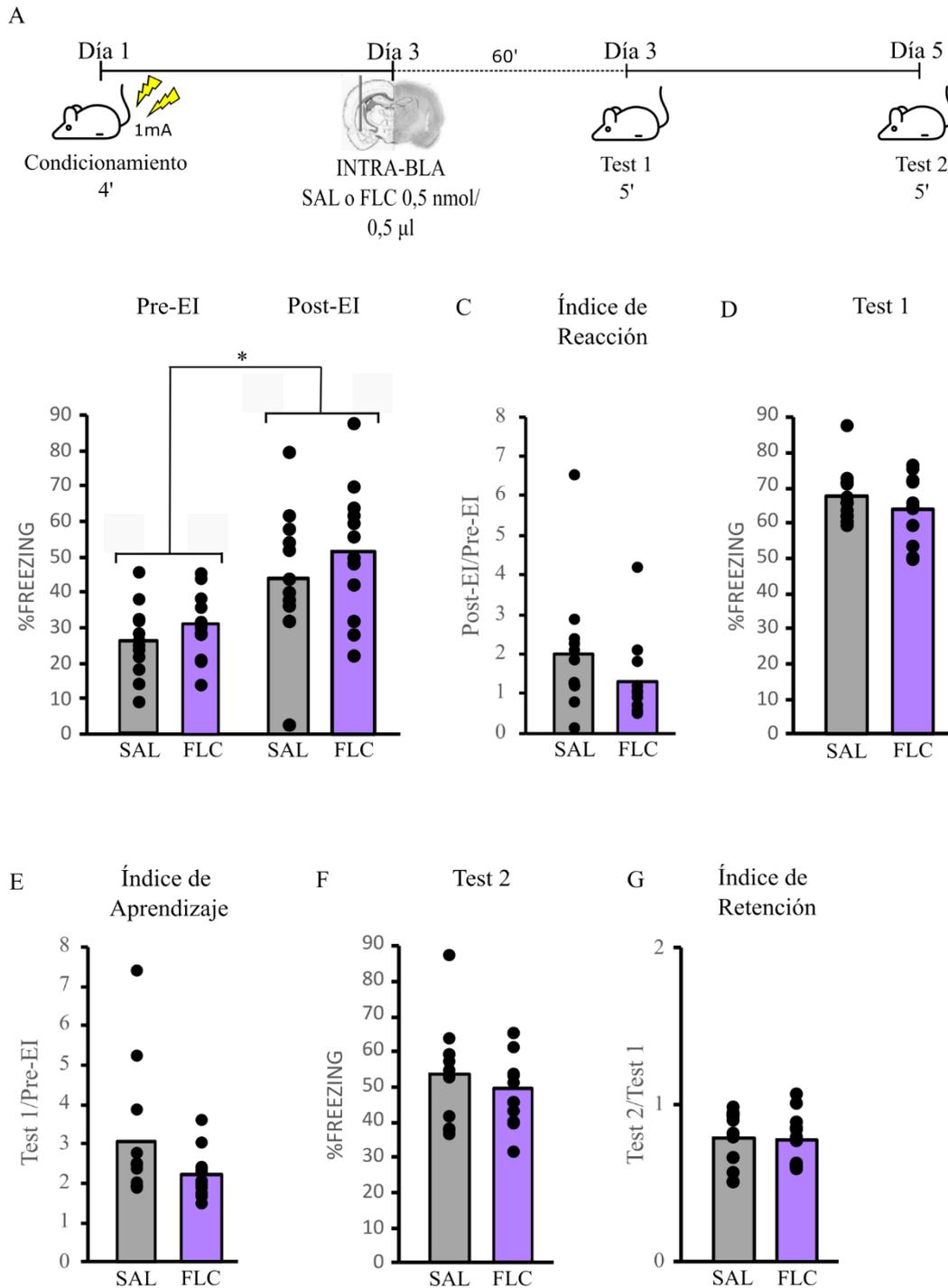


Figura 7: Evaluación de la evocación de la memoria. A) Representación esquemática del diseño experimental. B) Porcentaje de freezing en los tiempos Pre-EI y Post-EI. (test de Newman-Keuls, $p=0,0001$). C) Índice de reacción al shock (Post-EI/Pre-EI). D) Porcentaje de freezing de los animales durante los test 1 y 2. E) Índice de memoria (Test1/Pre-EI). F) Índice de retención (Test2/Test1). (SAL: N=12; FLC: N=12). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas cuando $p<0.05$.

Experimento 4: Evaluación de los efectos de la inhibición funcional de los astrocitos del C-BLA durante la fase de reconsolidación

De manera similar a lo que ocurre con la adquisición/consolidación, en el experimento anterior, si bien la administración de fluorocitrato transcurre durante la fase de evocación, la droga permanece en el sistema en el periodo de reconsolidación también. Si bien los resultados del experimento anterior sugieren que esta última no habría sido impedida ya que no se observaron diferencias en los niveles de freezing en el test 2, para estudiar más selectivamente la reconsolidación los animales fueron infundidos con SAL o FLC (0,5 nmol/0,5 μ l) después de realizado el test 1 como indica el protocolo representado en la figura 8A. Además, se incluyó un tercer grupo de animales (FLC-Sin Reactivación) que fue infundido con la misma dosis de FLC, pero no fue sometido al test 1. En otras palabras, este tercer grupo no experimentó el proceso de reactivación de la memoria (condición necesaria para que ocurra la reconsolidación) antes de que la droga les fuera administrada.

En el primer set de experimentos, el día del condicionamiento, los grupos presentaron un porcentaje de freezing basal similar (SAL=33 \pm 13%, FLC=25 \pm 11%, FLC-SR=25 \pm 7%) que aumentó en todos los casos (SAL=51 \pm 26%, FLC=39 \pm 26%, FLC-SR=29 \pm 11%) en el tiempo post-EI (Figura 8B). Si bien podemos observar que el aumento en el grupo FLC-SR fue menor que en los otros dos casos, el ANOVA de medidas repetidas no reveló diferencias entre los grupos ($F_{(2, 23)} = 1,99$, $p = 0,16$) pero sí un aumento significativo en los niveles de freezing del tiempo post-EI en comparación a los del pre-EI ($F_{(1, 23)} = 11,16$ $p = 0,003$; test de Newman Keuls $p = 0,001$). Estos resultados eran los esperados ya que al momento del condicionamiento los animales se encontraban libres de la droga. Por otra parte, en la figura 8C se pueden observar los índices de reacción donde queda de manifiesto que hubo un aumento del freezing en el grupo FLC-SR que además no presentó diferencias con los demás grupos (ANOVA, $F_{(2, 23)} = 1,68$, $p = 0,2$). Conjuntamente estos resultados sugieren que, a pesar de la variabilidad intrínseca de los grupos, reaccionaron indistintamente al EI.

Aunque durante el test 1 los animales también estuvieron libres de la droga, resulta importante el análisis de estos datos para confirmar que ambos grupos evocan de manera similar la memoria lo cual es un prerrequisito para que suceda la labilización/reconsolidación. Como se mencionó anteriormente, solo los grupos SAL y FLC fueron repuestos al contexto de condicionamiento para inducir la reactivación de la memoria. Como era esperable, los niveles de freezing de ambos grupos (Figura 8D) resultaron similares (SAL=63±15%, FLC=59±8%; prueba T, $p=0,9$) al igual que los índices de aprendizaje (Figura 8E) que tampoco resultaron diferentes entre sí (prueba T, $p=0,9$). Estos datos indican que, efectivamente todos los grupos expresaron la memoria de manera similar.

Si la administración de fluorocitrato en BLA afectara la reconsolidación, en este experimento se esperaría que los animales del grupo FLC evidenciaran niveles de freezing menores en el test 2 con respecto a los demás grupos y a su propia performance en el test 1.

Durante el test 2 fue expuesto al contexto por primera vez el grupo FLC-SR y por segunda vez los grupos SAL y FLC. Como se puede observar en la figura 8F los niveles de freezing de los tres grupos resultaron similares (SAL=57±16%, FLC=54±13%; FLC-SR=52±10%; ANOVA $F_{(2, 23)}=0,22$, $p=0,8$). Por otro lado, el ANOVA de medidas repetidas reveló que no existen diferencias entre los niveles de freezing presentados en los test 1 y 2 por los grupos SAL y FLC ($F_{(1, 18)}=2,92$, $p=0,1$); en el mismo sentido, los índices de retención (Figura 8G) tampoco mostraron diferencias significativas entre sí (prueba T $p=0,5$). En conjunto estos resultados sugieren que la memoria se mantuvo independientemente del tratamiento y que la reconsolidación de la memoria no fue afectada.

Posteriormente, con el objetivo de averiguar si una dosis mayor de la droga era necesaria para afectar la reconsolidación, se realizó una réplica de este experimento en donde una nueva cohorte de animales fue infundida con SAL o con FLC en las concentraciones de 0,5 nmol/0,5 μ l o 1 nmol/0,5 μ l y sometidos al protocolo que muestra la figura 9A. En el segundo set de experimentos, los resultados fueron consistentes con los reportados en el anterior, es decir, no hallamos diferencias en los niveles de freezing en ninguna

de las dos concentraciones ensayadas con respecto al grupo control (Figura 9). Esto refuerza la idea de que la reconsolidación de la memoria no se ve afectada por la administración de fluorocitrato.

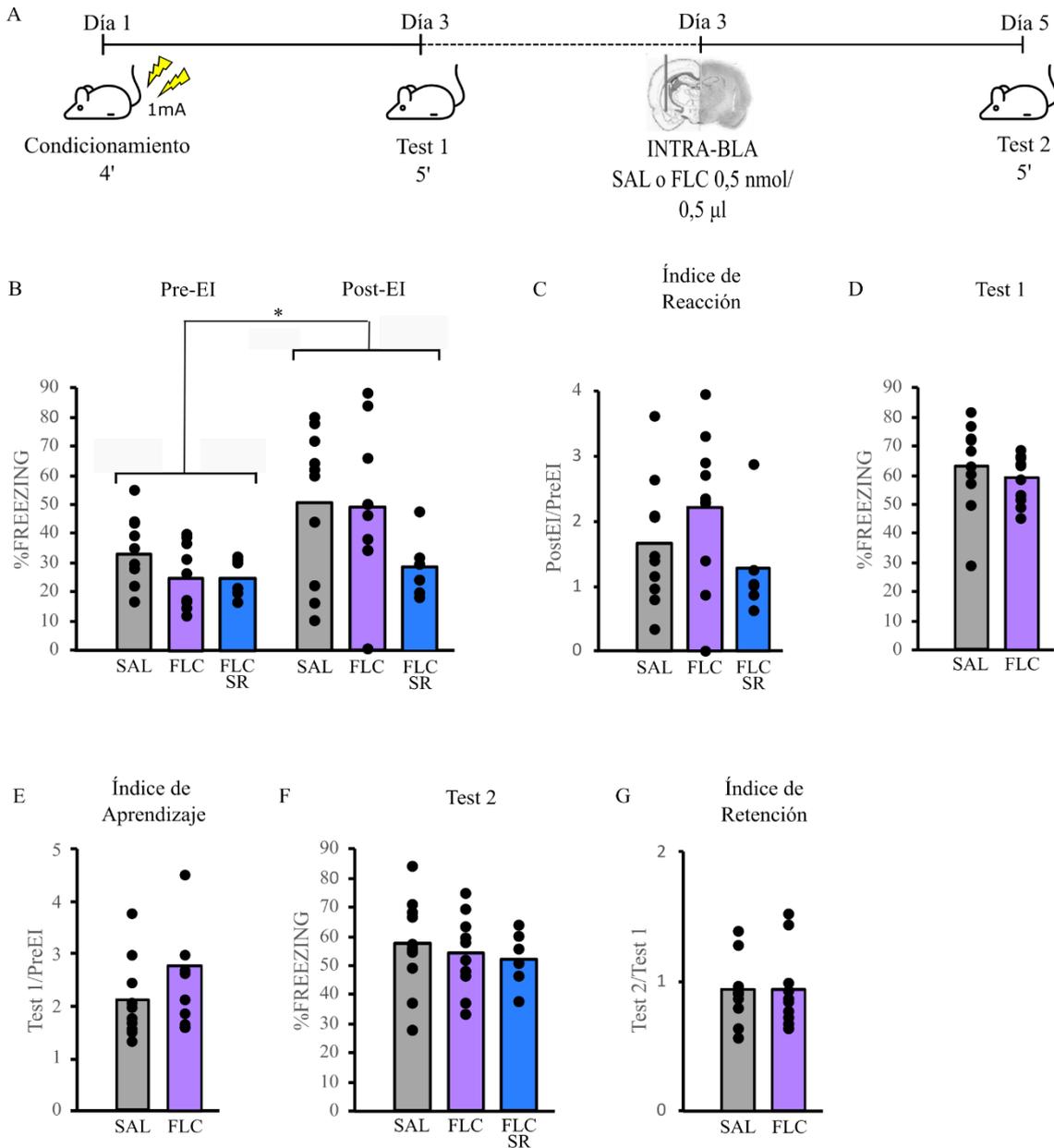


Figura 8: **Evaluación de la reconsolidación de la memoria.** A) Representación esquemática del diseño experimental. B) Porcentaje de freezing en los tiempos Pre-EI y Post-EI. (test de Newman-Keuls, $p=0,001$). C) Índice de reacción al shock (Post-EI/Pre-EI). D) Porcentaje de freezing de los animales durante el test 1. E) Índice de memoria (Test1/Pre-EI). F) Porcentaje de freezing durante el test 2. G) Índice de retención (Test2/Test1). (SAL: N=10; FLC: N=10; FLC-NR: N=6). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas cuando $p<0.05$.

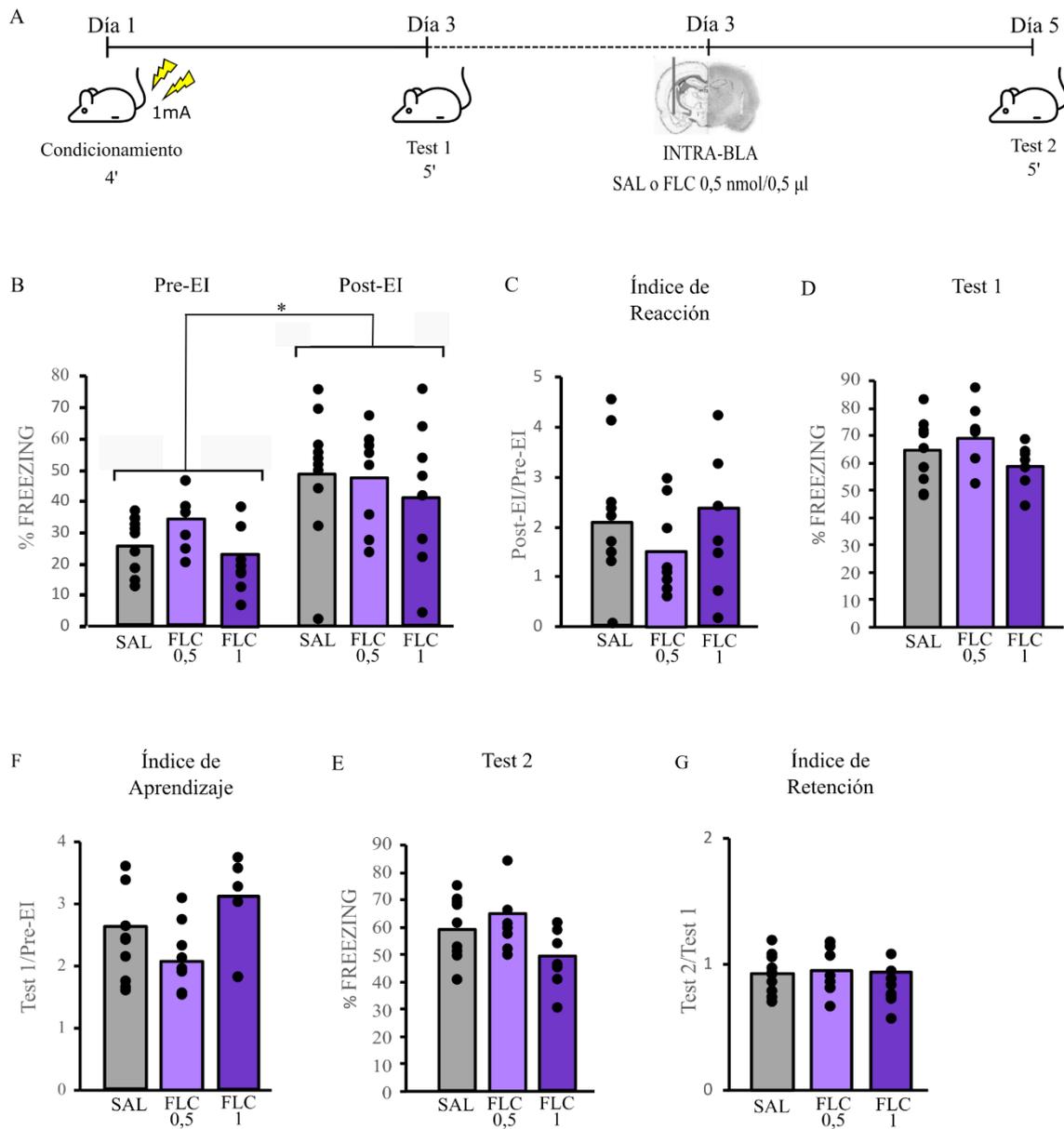


Figura 9: Evaluación de la reconsolidación de la memoria. A) Representación esquemática del diseño experimental. B) Porcentaje de freezing en los tiempos Pre-EI y Post-EI. (test de Newman-Keuls, $p=0,001$). C) Índice de reacción al shock (Post-EI/Pre-EI). D) Porcentaje de freezing de los animales durante el test 1. E) Índice de memoria (Test1/Pre-EI). F) Porcentaje de freezing durante el test 2. G) Índice de retención (Test2/Test1). (SAL: N=12; FLC 0,5: N=9; FLC 1: N=9). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas cuando $p<0,05$.

Discusión y Conclusión

Identificar y comprender los procesos y componentes neurobiológicos que subyacen a la formación de la memoria de miedo resulta fundamental para lograr el entendimiento de la aparición de memorias desadaptativas que pueden conducir a enfermedades psiquiátricas como trastornos de ansiedad y el trastorno de estrés post traumático. Si bien en los últimos tiempos se ha revalorizado el estudio de los astrocitos como parte de este proceso y existen evidencias que sugieren que la actividad astrocítica es crucial para la regulación sináptica y la plasticidad, se sabe relativamente poco sobre el papel que desempeñan los astrocitos del complejo basolateral de la amígdala (C-BLA) en las diferentes etapas de la formación de la memoria de miedo contextual.

En el presente trabajo hemos hallado que la administración en el C-BLA del inhibidor astrocítico fluorocitrato (FLC), en dosis de 0,5 nmol o 1 nmol, previo a la sesión de aprendizaje en animales expuestos a un protocolo de condicionamiento de miedo contextual provocó que la expresión del freezing decayera a niveles similares a los basales en el test de memoria, efecto que se mantuvo al menos cuatro días después. Estos resultados indican que la formación de la memoria se vio impedida por el inhibidor. Por otro lado, el análisis de la respuesta al shock nos permitió observar que no existe un efecto significativo de la droga *per se* en la percepción del estímulo incondicionado que pudiera explicar los resultados observados. Además, estudios preliminares en los que se probó el efecto del FLC sobre la ansiedad en el laberinto en cruz elevado muestran que no hubo diferencias en el comportamiento de los animales tratados con la droga con respecto a los del grupo control, lo cual indica que tampoco habría un efecto ansiolítico que pudiera influir en la expresión del freezing. En conjunto, todo lo anterior sugiere que la inhibición metabólica de los astrocitos del C-BLA provocó una disrupción de la adquisición afectando el aprendizaje asociativo de manera específica.

Un inconveniente en la manipulación farmacológica es la falta de especificidad temporal. Se sabe que la droga utilizada tiene una ventana temporal de acción de al menos 12 horas (Paulsen et al. 1987), por lo que resulta difícil intervenir selectivamente, por ejemplo, en la adquisición sin afectar también la fase de consolidación. Por esta razón, en otro set de experimentos, se administró el FLC luego de la fase de adquisición, para

afectar de manera específica la consolidación. Se observó que no hubo un déficit en la memoria en el test de recuerdo lo que sugiere que la función astrocítica no sería indispensable para el correcto desarrollo de esta fase.

Se sabe que el fluorocitrato alcanza un efecto significativo aproximadamente una hora después de la administración (Shang et al., 2015; Christian and Huguenard, 2013; Damolin et al., 2007), y teniendo en cuenta que la infusión se realizó una hora después del condicionamiento, una posible explicación a estos resultados sería que el efecto de esta droga ocurra una vez concluidas las fases tempranas de la consolidación en las que la memoria es más susceptible a ser interrumpida. Si bien se considera que la fase de consolidación dura al menos 6 horas (McGaugh, 2000), algunos estudios han reportado que 1 o 3 horas después de la adquisición la memoria resulta menos susceptible a ser interferida (Igaz et al., 2002; Gafford et al., 2005). Un estudio reciente en el que se manipuló temporalmente la actividad astrocítica de manera selectiva en hipocampo mostró que la consolidación solo resultó afectada cuando la manipulación se realizó 1 hora y no 2 o 3 horas después del condicionamiento (Li et al., 2020). Estos datos sugieren la posibilidad de que los astrocitos participen en fases tempranas de la consolidación.

Un posible mecanismo mediante el cual los astrocitos podrían afectar la formación de la memoria son los cambios plásticos en estas células inducidos por el condicionamiento, como la reducción del volumen y la retracción de los procesos perisinápticos, que implica que se vea favorecida la potenciación a largo plazo mediante la estabilización y el agrandamiento de las espinas (Ostroff et al., 2014, Liao et al., 2017). Además de los cambios plásticos, los astrocitos controlan activamente las sinapsis mediante el intercambio de señales regulatorias (Santello & Volterra, 2019). También, se ha demostrado que la liberación de diferentes gliotransmisores como D-serina y sustratos metabólicos como L-lactato en el hipocampo es necesaria para el aprendizaje (Robin et al., 2018; Gao et al., 2016). Este tipo de modulación constituye otro posible mecanismo mediante el cual los astrocitos pueden participar en el proceso de formación de la memoria y sus consecuencias comportamentales.

Previamente en nuestro laboratorio se realizaron experimentos (resultados no publicados) bajo un protocolo similar al aplicado en esta tesina pero que incluía la exposición a un contexto distinto al de condicionamiento que

no fue apareado con el shock (para detalles del protocolo ver Bender et al., 2018). A diferencia de lo hallado aquí, se observó que, la administración de FLC después del condicionamiento provocó la interrupción de la consolidación, reflejada en una disminución del freezing en el día del test. Este contraste entre los resultados podría deberse a que la exposición a un contexto alternativo podría estar interfiriendo con la representación del contexto por parte del animal y, en consecuencia, se vea facilitada la disrupción de la consolidación. A favor de esta interpretación, se ha reportado que la exposición previa a un contexto novedoso antes y después de la sesión de aprendizaje resultó en una disminución de la expresión de la memoria del miedo cuando se testearon los animales 7 días después (Katche et al., 2016).

En concordancia de nuestros resultados actuales, existe un trabajo reciente en el que se infundieron 0,5nmol de FLC en C-BLA de ratones sometidos a un protocolo de condicionamiento a clave en el que el estímulo incondicionado (shock) se aparea a un tono de algunos segundos de duración (estímulo condicionado). En este tipo de condicionamiento el estímulo condicionado (EC) se presenta de forma explícita y precisa en relación al EI mientras que en el condicionamiento contextual (utilizado en esta tesina) el EC es polimodal y está presente continuamente. Si bien ambos tipos de protocolo resultan similares, estas diferencias en la presentación del EC implican el reclutamiento de distintas vías cerebrales de análisis y procesamiento de la información sobre los estímulos (Rustay et al., 2008). Por otro lado, el condicionamiento a tono, permite describir una curva de adquisición a partir de la cuantificación del freezing de los animales en los tiempos que transcurren entre cada presentación del EC. Mas allá de estas diferencias entre los protocolos, de manera similar a nuestro trabajo, los investigadores han observado que la administración de FLC en el C-BLA antes del condicionamiento fue suficiente para inducir una disrupción de la adquisición evidenciada en una disminución de los niveles de freezing en la curva de adquisición. En esta investigación los autores no realizaron el test de memoria correspondiente luego del condicionamiento por lo que permanece inconcluso si efectivamente se afectó la adquisición. Por otro lado, también realizaron una infusión de FLC intracerebroventricular (icv) inmediatamente después del condicionamiento donde, no se observaron diferencias en los niveles de

freezing en el test de recuerdo lo que refuerza la idea de que la inhibición metabólica de los astrocitos no interfiere con la consolidación (Liao et al., 2017).

En otros experimentos se manipuló el hipocampo (también involucrado la memoria de miedo contextual) mediante la utilización de tecnología DREADD que permite la activación de receptores de diseño exclusivamente por fármacos como N-óxido de clozapina (CNO). Como resultado de esta activación de receptores acoplados a proteína G_q en los astrocitos antes del condicionamiento a tono se obtuvo un aumento en la expresión de la memoria del miedo. Estos resultados fueron replicados cuando, mediante optogenética, se activaron un tipo de receptores similares a los anteriores pero sensibles a la luz durante el condicionamiento, lo que indicaría que la estimulación durante la adquisición es suficiente para que la memoria se vea afectada (Adamsky et al., 2018). Por otra parte, Li y cols hallaron que la estimulación optogenética de los astrocitos del hipocampo antes o hasta 1 hora después del condicionamiento a tono provocó menores niveles de freezing en el test de recuerdo, mediado por la activación de receptores de adenosina A_1 (que tienen un efecto inhibitorio). Este resultado no se observó cuando la estimulación se realizó 2 o 3 horas después (Li et al., 2020).

En conjunto con nuestros datos, los resultados anteriores demuestran que un nivel óptimo de actividad astrocítica es necesario para mantener la memoria intacta, mientras que el aumento o la disminución de la actividad resulta en una desregulación del proceso.

En esta tesina, también hemos demostrado que la inhibición astrocítica en C-BLA antes del test de recuerdo no produjo diferencias en la expresión de la memoria. Estos resultados concuerdan con trabajos previos en los que se manipularon los astrocitos del hipocampo mediante la activación con CNO de receptores de diseño acoplados a proteínas G_q (Adamsky et al., 2018) o G_i (Kol et al., 2020) durante el test de recuerdo donde no se observaron cambios en la expresión de la memoria. Asimismo, la estimulación optogenética de los astrocitos en hipocampo tampoco arrojó diferencias en el comportamiento (Li et al., 2020)

Por otro lado, existe un trabajo en el que también se utilizó la técnica DREADD para la activación de la vía de los receptores acoplados a proteína G_q en astrocitos de la amígdala central medial (CeM) durante la evocación resultó en una disminución de los niveles de freezing en el test de memoria que se recuperó cuando los animales fueron evaluados nuevamente 24hs después. Esto sugiere que dicha activación afectó selectivamente la evocación sin interferir con la reconsolidación (Martin-Fernández et al., 2017). Sin embargo, se sabe que, a diferencia de C-BLA que recibe aferencias multimodales de distintas áreas del cerebro, CeM es la principal estructura de salida de la amígdala que controla las respuestas autonómicas y motoras (Erlich et al., 2009; LeDoux et al., 1988), por lo que el déficit en los niveles de freezing puede ser también explicado por un efecto en la respuesta motora más que una alteración del aprendizaje asociativo específicamente.

Por último, hemos demostrado que la inhibición del metabolismo astrocítico no interfirió con la reconsolidación de la memoria. En ambos sets de experimentos desarrollados se observaron índices de retención casi idénticos entre el grupo control y los grupos tratados con ambas dosis de FLC (0,5 nmol o 1 nmol) lo que confiere una evidencia robusta de que la función astrocítica no sería necesaria para esta fase de la memoria. Hasta donde llegan nuestros conocimientos, en la actualidad no existen trabajos en los que se haya abordado específicamente el rol de los astrocitos sobre la reconsolidación de la memoria del miedo por lo que nuestro trabajo aporta los primeros datos sobre la participación de los astrocitos de C-BLA en la reconsolidación de la memoria.

Cabe destacar que, si bien tanto la fase de reconsolidación como la de consolidación consisten en un periodo en el que la memoria, que se encuentra en un estado lábil, sufre un proceso de estabilización, ambas fases involucran diferentes moléculas y vías celulares (Nader, 2015; Kida, 2020). Por ejemplo, se ha visto que en hipocampo el factor neurotrófico derivado del cerebro, que es liberado por algunos tipos celulares, entre ellos los astrocitos (Chen 2006), es necesario para la consolidación, pero no para la reconsolidación de la memoria de miedo contextual (Lee et al., 2004). Estas diferencias entre ambos procesos constituyen una posible explicación de por qué la inhibición del

metabolismo astrocítico es capaz de disrumpir la consolidación temprana pero no tiene efecto sobre la reconsolidación.

En conclusión, en este trabajo hemos demostrado que los astrocitos poseen un rol esencial en la adquisición y posiblemente de la consolidación temprana de la memoria de miedo contextual, mientras que no hemos hallado evidencias de que los astrocitos sean necesarios para el desarrollo de las fases de evocación y reconsolidación. Nuestros aportes contribuyen a ahondar en el entendimiento de los procesos que subyacen a la formación de la memoria lo que resulta crítico momento de desarrollar tratamientos nuevos y efectivos para desórdenes relacionados con el miedo y la ansiedad como lo es el desorden por estrés post traumático.

Bibliografía

Adamsky, A., & Goshen, I. (2018 a). Astrocytes in Memory Function: Pioneering Findings and Future Directions. *Neuroscience*, 370, 14–26.

Adamsky, A., Kol, A., Kreisel, T., Doron, A., Ozeri-Engelhard, N., Melcer, T., Refaeli, R., Horn, H., Regev, L., Groysman, M., London, M., & Goshen, I. (2018b). Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement. *Cell*, 174(1), 59-71.

Allen NJ, & Barres BA. (2009). Glia-more than just brain glue. *Nature*, 457(February), 675–677.

Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, 22(5), 208–215.

Bender, C. L., Calfa, G. D., & Molina, V. A. (2016). Astrocyte plasticity induced by emotional stress: A new partner in psychiatric physiopathology? *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 65, 68–77.

Bender, C. L., Otamendi, A., Calfa, G. D., & Molina, V. A. (2018). Prior stress promotes the generalization of contextual fear memories: Involvement of the gabaergic signaling within the basolateral amygdala complex. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 83(November 2017), 18–26.

Bergstrom, H. C., McDonald, C. G., & Johnson, L. R. (2011). Pavlovian Fear Conditioning Activates a Common Pattern of Neurons in the Lateral Amygdala of Individual Brains. *PLoS ONE*, 6(1), e15698.

Bergstrom, H. C. (2016). The neurocircuitry of remote cued fear memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 71, 409-417.

Blair HT, Schafe GE, Bauer EP, Rodrigues SM, LeDoux JE (2001) Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn Mem* 8:229–242.

Blanchard, D.C. and Blanchard, R.J. (1972) Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 81, 281–290.

Casagrande, M. A., Haubrich, J., Pedraza, L. K., Popik, B., Quillfeldt, J. A., & de Oliveira Alvares, L. (2018). Synaptic consolidation as a temporally variable process: Uncovering the parameters modulating its time-course. *Neurobiology of Learning and Memory*, 150, 42–47.

Chaaya, N., Battle, A. R., & Johnson, L. R. (2018). An update on contextual fear memory mechanisms: Transition between Amygdala and Hippocampus. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 92, 43–54.

Chen, P.S., Peng, G.S., Li, G., Yang, S., Wu, X., Wang, C.C., Wilson, B., Lu, R.B., Gean, P.W., Chuang, D.M., & Hong, J.S. (2006). Valproate protects dopaminergic neurons in midbrain neuron/glia cultures by stimulating the

release of neurotrophic factors from astrocytes. *Molecular Psychiatry*, 11, 1116–1125.

Christian, C. A., & Huguenard, J. R. (2013). Astrocytes potentiate GABAergic transmission in the thalamic reticular nucleus via endozepine signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(50), 20278–20283.

Clarke, D. D., Nicklas, W. J., & Berl, S. (1970). Tricarboxylic acid-cycle metabolism in brain. Effect of fluoroacetate and fluorocitrate on the labelling of glutamate, aspartate, glutamine and gamma-aminobutyrate. *The Biochemical journal*, 120(2), 345–351.

Cushman, J. D., & Fanselow, M. S. (2010). Fear Conditioning. *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*, 524–531.

Dalmolin, G. D., Silva, C. R., Bellé, N. A., Rubin, M. A., Mello, C. F., Calixto, J. B., & Ferreira, J. (2007). Bradykinin into amygdala induces thermal hyperalgesia in rats. *Neuropeptides*, 41(4), 263–270.

De Olmos, J. A., Beltramino, C. A. & Alheid, G. (2004). Amygdala and Extended Amygdala of the Rat: A Cytoarchitectonical, Fibroarchitectonical, and Chemoarchitectonical Survey. In: G. Paxinos, ed., *The Rat Nervous System*, 3rd ed. Oxford: Academic Press, pp.509-603.

Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Ciocchi, S., Herry, C., & Lüthi, A. (2009). Amygdala Inhibitory Circuits and the Control of Fear Memory. *Neuron*, 62(6), 757–771.

Fanselow, M. S. (1980). Conditional and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlovian Journal of Biological Sciences*, 15, 177-182

Fanselow, M. S. (1990). Factors governing one-trial contextual conditioning. *Animal Learning & Behavior*, 18(3), 264–270.

Fanselow, M. S. (2010). From contextual fear to a dynamic view of memory systems. *Trends in Cognitive Sciences*, 14(1), 7–15.

Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*, 65(1), 7–19.

Fanselow, M. S., & LeDoux, J. E. (1999). Why We Think Plasticity Underlying Pavlovian Fear Conditioning Occurs in the Basolateral Amygdala. *Neuron*, 23(2), 229-232.

Gafford, G. M., Parsons, R. G., & Helmstetter, F. J. (2005). Effects of post-training hippocampal injections of midazolam on fear conditioning. *Learning & Memory*, 12(6), 573–578

Gao, V., Suzuki, A., Magistretti, P. J., Lengacher, S., Pollonini, G., Steinman, M. Q., & Alberini, C. M. (2016). Astrocytic β 2- Adrenergic receptors mediate hippocampal long- Term memory consolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(30), 8526–8531.

Hassel, B., Paulsen, R. E., Johnsen, A., & Fonnum, F. (1992). Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain Research*, 576(1), 120-124.

Haydon, P. G. (2001). Glia: listening and talking to the synapse. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(3), 185-193.

Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* 62 (9), 1377–1391.

Herry, C., Johansen J. P. (2014). Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. *Nat Neurosci* 17(12), 1644-1654.

Igaz, L. M., Vianna, M. R. M., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *The Journal of Neuroscience*, 22 (15), 6781–6789.

Johansen, J. P., Cain, C. K., Ostroff, L. E., & Ledoux, J. E. (2011). Molecular mechanisms of Fear Learning and Memory. *Cell*, 147(3), 509–524.

Katche, C., Tomaiuolo, M., Dorman, G., Medina, J. and Viola, H., 2016. Novelty during a late postacquisition time window attenuates the persistence of fear memory. *Scientific Reports*, 6(1), 1–8.

Khakh, B. S., & Sofroniew, M. V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature Neuroscience*, 18(7), 942–952.

Kida, S. (2020). Function and mechanisms of memory destabilization and reconsolidation after retrieval. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 96(3), 95–106.

Kol, A., Adamsky, A., Groysman, M., Kreisel, T., London, M., & Goshen, I. (2020). Astrocytes contribute to remote memory formation by modulating hippocampal–cortical communication during learning. *Nature Neuroscience*, 23(10), 1229–1239.

LeDoux, J. E., Iwata, J., Cicchetti, P., & Reis, D. J. (1988). Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 8(7), 2517–2529.

LeDoux J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual review of neuroscience*, 23, 155–184.

LeDoux, J., 2007. The amygdala. *Current Biology*, 17(20), R868-R874.

Lee, J. L. C., Everitt, B. J., & Thomas, K. L. (2004). Independent Cellular Processes for Hippocampal Memory Consolidation and Reconsolidation. *Science*, 304(5672), 839–843.

Li Y, Meloni EG, Carlezon WA Jr, Milad MR, Pitman RK, Nader K, Bolshakov VY (2013) Learning and reconsolidation implicate different synaptic mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:4798–4803.

Li, Y., Li, L., Wu, J., Zhu, Z., Feng, X., Qin, L., Zhu, Y., Sun, L., Liu, Y., Qiu, Z., Duan, S., & Yu, Y. Q. (2020). Activation of astrocytes in hippocampus decreases fear memory through adenosine A1 receptors. *ELife*, 9, 1–25.

Liao, Z., Tao, Y., Guo, X., Cheng, D., Wang, F., Liu, X., & Ma, L. (2017). Fear Conditioning Downregulates Rac1 Activity in the Basolateral Amygdala Astrocytes to Facilitate the Formation of Fear Memory. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 1-6.

Maren, S. (2001). Neurobiology of Pavlovian Fear Conditioning. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 897-931.

Maren, S. (2008). Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats. *European Journal of Neuroscience*, 28(8), 1661-1666.

Martin-Fernandez, M., Jamison, S., Robin, L. M., Zhao, Z., Martin, E. D., Aguilar, J., Benneyworth, M. A., Marsicano, G., Araque, A. (2017). Synapse-specific astrocyte gating of amygdala-related behavior. *Nature Neuroscience*, 20(11), 1540–1548.

McGaugh, J.L. (2000). Memory—a century of consolidation. *Science* 287, 248–251.

Morselli, P. L., Garattini, S., Marcucci, F., Mussini, E., Rewersky, W., Valzelli, L., & Peters, R. A. (1968). The effect of injections of fluorocitrate into the brains of rats. *Biochemical Pharmacology*, 17(2), 195–202.

Nader, K. (2015). Reconsolidation and the dynamic nature of memory. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(10).

Nader K, Schafe GE, LeDoux JE (2000) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722–726.

Ostroff, L., Cain, C., Bedont, J., Monfils, M. and LeDoux, J., 2010. Fear and safety learning differentially affect synapse size and dendritic translation in the lateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9418-9423.

Ostroff, L. E., Manzur, M. K., Cain, C. K., & LeDoux, J. E. (2014). Synapses lacking astrocyte appear in the amygdala during consolidation of pavlovian threat conditioning. *Journal of Comparative Neurology*, 522(9), 2152–2163.

Pape, H. C., & Pare, D. (2010). Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiological Reviews*, 90(2), 419–463.

Paulsen, R. E., Contestabile, A., Villani, L., & Fonnum, F. (1987). An In Vivo Model for Studying Function of Brain Tissue Temporarily Devoid of Glial Cell Metabolism: The Use of Fluorocitrate. *Journal of Neurochemistry*, 48(5), 1377–1385.

Paxinos, G., & Watson, C. (2017). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Compact*. Elsevier Gezondheidszorg.

Perusini, J. N., & Fanselow, M. S. (2015). Neurobehavioral perspectives on the distinction between fear and anxiety. *Learning and Memory*, 22(9), 417–425.

Phelps, E. A., & LeDoux, J. E. (2005). Contributions of the amygdala to emotion processing: From animal models to human behavior. *Neuron*, 48(2), 175–187.

Robin, L. M., Oliveira da Cruz, J. F., Langlais, V. C., Martin-Fernandez, M., Metna-Laurent, M., Busquets-Garcia, A., Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Papouin, T., Varilh, M., Sherwood, M. W., Belluomo, I., Balcells, G., Matias, I., Bosier, B., Drago, F., Van Eeckhaut, A., Smolders, I., Georges, F., Araque, A., ... Marsicano, G. (2018). Astroglial CB1 Receptors Determine Synaptic D-Serine Availability to Enable Recognition Memory. *Neuron*, 98(5), 935–944.e5.

Rossignoli, M. T., Lopes-Aguiar, C., Ruggiero, R. N., Do Val da Silva, R. A., Bueno-Junior, L. S., Kandratavicius, L., Peixoto-Santos, J. E., Crippa, J. A., Cecilio Hallak, J. E., Zuardi, A. W., Szawka, R. E., Anselmo-Franci, J., Leite, J. P., & Romcy-Pereira, R. N. (2017). Selective post-training time window for memory consolidation interference of cannabidiol into the prefrontal cortex: Reduced dopaminergic modulation and immediate gene expression in limbic circuits. *Neuroscience*, 350, 85–93.

Rustay N, Browman K, Curzon P (2008) Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. In *20 Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, Second Edition by Taylor & Francis Group, LLC. pp :19–37

Santello, M., Toni, N., & Volterra, A. (2019). Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. *Nature Neuroscience*, 22(2), 154–166.

Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2000). Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in

the amygdala. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(18), RC96.

Shang, X. L., Wang, Q. B., Liu, X. P., Yao, X. Q., Cao, F. Y., Wang, Q., Zhang, J. Y., Wang, J. Z., & Liu, G. P. (2015). Fluorocitrate induced the alterations of memory-related proteins and tau hyperphosphorylation in SD rats. *Neuroscience Letters*, 584, 230–235.

Stehberg, J., Moraga-Amaro, R., Salazar, C., Becerra, A., Echeverría, C., Orellana, J. A., Bultynck, G., Ponsaerts, R., Leybaert, L., Simon, F., Sáez, J. C., & Retamal, M. A. (2012). Release of gliotransmitters through astroglial connexin 43 hemichannels is necessary for fear memory consolidation in the basolateral amygdala. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(9), 3649–3657.

Suzuki, A., Stern, S. A., Bozdagi, O., Huntley, G. W., Walker, R. H., Magistretti, P. J., & Alberini, C. M. (2011). Astrocyte-Neuron Lactate Transport Is Required for Long-Term Memory Formation. *Cell*, 144(5), 810-823.

Vezzoli, E., Calì, C., De Roo, M., Ponzoni, L., Sogne, E., Gagnon, N., Francolini, M., Braidà, D., Sala, M., Müller, D., Falqui, A., & Magistretti, P. J. (2019). Ultrastructural Evidence for a Role of Astrocytes and Glycogen-Derived Lactate in Learning-Dependent Synaptic Stabilization. *Cerebral Cortex*, 30(4), 2114-2127.

Wang, L., Li, C. C., Wang, G. W., & Cai, J. X. (2009). The effects of centrally administered fluorocitrate via inhibiting glial cells on working memory in rats. *Science in China. Series C, Life sciences*, 52(8), 701–709.