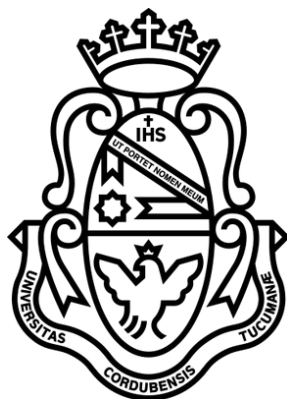


Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales



Tesina de Grado para optar por el título de Bióloga

Participación de astrocitos del complejo
basolateral de la amígdala en la consolidación
de una memoria de miedo.

Tesista: Lourdes M. Argibay

Firma:

Director: Dr. Christian L. Bender

Firma:

Dr. Christian Bender

Codirector: Dr. Gastón D. Calfa

Firma:

Dr. Gastón Calfa

Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC-CONICET) -
Depto. de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de
Córdoba (UNC) Argentina.

2024

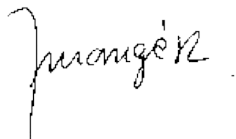
Tesina de Grado para optar por el título de Bióloga

Participación de astrocitos del complejo basolateral de la amígdala en la consolidación de una memoria de miedo.


Alumna: Lourdes María Argibay
Director: Dr. Christian Luis Bender
Codirector: Dr. Gastón Diego Calfa

Tribunal Examinador

Dra. María Angélica Rivarola

Firma: 

Dra. Andrea Beatriz Cagnolini

Firma: 

Dra. María Victoria Pisano

Firma: 

Calificación: 10 (diez)

Fecha: 19 de junio de 2024

Agradecimientos

Quiero aprovechar este espacio para expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido de manera significativa en la realización de esta tesina.

En primer lugar, deseo expresar mi profunda gratitud a mi director de tesis, Dr. Christian Bender, por su orientación, apoyo constante y paciencia a lo largo de todo el proceso. Su sabiduría y dedicación fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

También quiero agradecer al Dr. Gaston Calfa por su invaluable asesoramiento y sus sugerencias que contribuyeron a enriquecer mi trabajo.

No puedo dejar de reconocer el apoyo de mis amigas de la vida, Sofi, Coti, Jime, Nara, Guada y Geor que me acompañan desde siempre; a mis compañeros de clase y amigos, Renzo, Pedro, Sol y en especial a Mari y Fran que me acompañaron y alentaron en cada etapa de este proceso.

Agradezco especialmente a mi familia, mis padres (Maria Marta y Gustavo), hermanos (Martin y Rosario) y sobrinos (Esmeralda, Isabella y Bruno) por su inquebrantable apoyo, comprensión y amor incondicional.

Finalmente, quiero expresar mi gratitud a todas aquellas personas que, de una forma u otra, contribuyeron a este trabajo, así como al IFEC que me facilitó los recursos necesarios para realizar esta investigación.

Lourdes

Índice

1. Introducción.....	4
<i>Condicionamiento del miedo contextual (CMC).....</i>	4
<i>Formación de memoria</i>	5
<i>Estructuras cerebrales implicadas en la formación de la memoria</i>	6
<i>Sinapsis tripartita</i>	8
<i>Gliotransmisores (GLT)</i>	8
<i>Plasticidad astrocítica</i>	11
2. Objetivos e hipótesis	13
3. Materiales y métodos	14
<i>Animales</i>	14
<i>Cirugía para administración intracerebral</i>	14
<i>Condicionamiento de miedo contextual (CMC)</i>	15
<i>Test de memoria y evaluación</i>	16
<i>Inmunofluorescencia</i>	17
<i>Diseños experimentales</i>	18
<i>Análisis estadístico</i>	21
4. Resultados	23
<i>Experimento 1 - Coadministración de FLC y GLT previo al CMC</i>	23
<i>Experimento 2 - Administración de FLC posterior al CMC</i>	29
<i>Experimento 3 - Evaluación de plasticidad astrocítica durante la fase de consolidación de la memoria utilizando inmunofluorescencia.....</i>	33
5. Discusión y conclusión	36
6. Bibliografía	44

Introducción

En la historia natural de la vida el miedo ha sido una respuesta benéfica para los animales, su utilidad radica en que brinda una plataforma de decisión al individuo para comportarse de cierta manera ante situaciones de amenaza o peligro (Sánchez-Ramírez, 2009). Tanto en humanos como en animales, las reacciones conductuales inducidas por amenazas incluyen aquellas que son innatas, no basadas en experiencias previas, y aquellas aprendidas, que representan recuerdos de eventos aversivos (Shumyatsky et al., 2005).

Condicionamiento del miedo contextual (CMC)

Las reacciones aprendidas, fueron ampliamente estudiadas en el condicionamiento de miedo Pavloviano, uno de los procedimientos clásicos que se utilizan en la actualidad para estudiar la memoria y el aprendizaje asociativo del miedo basado en el condicionamiento del miedo contextual (CMC). En este paradigma de aprendizaje, un estímulo condicionado (EC, contexto), inicialmente neutral, adquiere la capacidad de provocar respuestas defensivas después de la asociación con un estímulo nocivo incondicionado (EI) (ej. shock eléctrico) (Glenn E. Schafe et al. 2001). Como resultado de este entrenamiento, la reexposición al EC evoca una respuesta de miedo fisiológica y cambios en el comportamiento del sujeto experimental; en roedores, por lo general, se asocia con varias conductas, como por ejemplo el “congelamiento” o *freezing* y aquellos propios de la “Valoración de riesgos” o *risk assessment* (Blanchard y Blanchard, 1989; Holly et al. 2016) (Fig.1).

El protocolo del CMC es un paradigma de aprendizaje de miedo con potencial relevancia para entender aspectos aprendidos en psicopatologías basadas en el miedo, como las fobias y el *trastorno de estrés postraumático* (TEPT) (Chaaya et al., 2018). Por ejemplo, el TEPT es un trastorno psicológico grave que se desarrolla después de haber experimentado un evento traumático, se lo conceptualiza por lo general como un trastorno de la memoria en el cual se produce un aprendizaje desregulado del miedo y una incapacidad para extinguir el miedo aprendido, que es el aprendizaje de una nueva asociación no amenazante (Jovanovic, T., & Ressler, K. J., 2010; Milad et al. 2009). El tratamiento se basa típicamente en psicoterapia enfocada en el trauma, con o sin medicamentos, pero lamentablemente entre el 30 - 50% de los pacientes no responden al tratamiento quedando afectados crónicamente con este desorden.

Por lo tanto, en la actualidad, los estudios en modelos animales proporcionan una base sólida para la investigación y la formulación de teorías que pueden ayudar a mejorar nuestra comprensión del TEPT y otros trastornos y desarrollar enfoques más efectivos para su tratamiento en humanos (Richter-Levin et al., 2019; Flandreau & Toth, 2017).

Formación de la memoria

El proceso de formación de memoria consiste en varias fases: adquisición, consolidación, evocación y reconsolidación. En el caso del condicionamiento de miedo pavloviano, la *adquisición* ocurre con la aparición repentina del evento aversivo de duración variable donde se incorpora la información y se genera una memoria a corto plazo (MCP). Posteriormente, ocurre la *consolidación*, un período de 4-5 horas (en este modelo) posterior a la adquisición (Schafe et al., 2001) que requiere de la transcripción de genes y la síntesis de nuevas proteínas para que ésta sea estabilizada y almacenada a largo plazo (MLP). Una vez consolidada la memoria, la presentación de una señal ambiental asociada al evento aversivo aprendido, desencadena una *evocación*, donde se reactiva el engrama de la memoria de miedo y la expresión de comportamientos defensivos (Johansen et al., 2011). Cuando una memoria es evocada mediante el recuerdo, bajo ciertas condiciones, puede retornar en forma transitoria a un estado de labilidad que requiere de nueva síntesis de proteínas para su persistencia. Esta fase se denomina *reconsolidación* de la memoria; el propósito adaptativo de esta fase es permitir la integración de nueva información en una memoria previamente consolidada luego de la evocación (Nader et al., 2000; Alberini, 2005) (Fig.1).

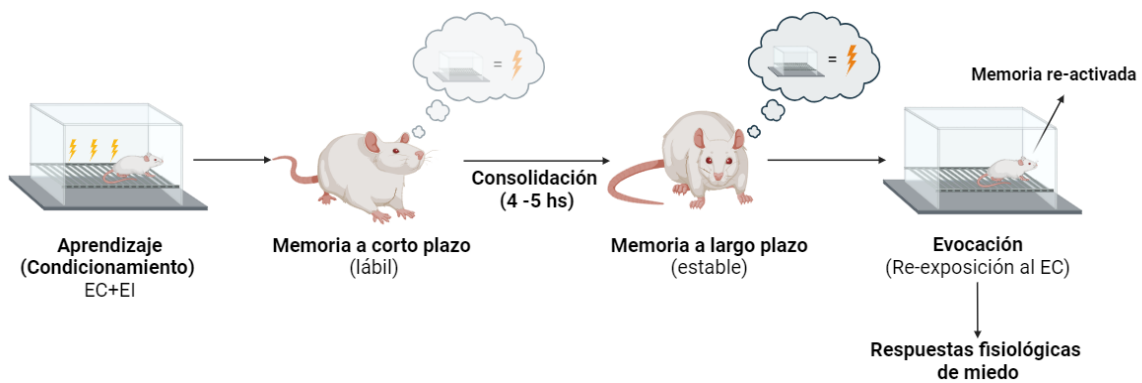


Fig. 1 - Esquema representativo del proceso de formación de la memoria + CMC.

Estructuras cerebrales implicadas en la formación de la memoria

En la actualidad múltiples evidencias soportan que, dentro del encéfalo, la amígdala y el hipocampo desempeñan en conjunto un papel crucial en la adquisición y consolidación de la memoria del miedo contextual. El hipocampo es una estructura cerebral ubicada en el lóbulo temporal medial del encéfalo, responsable de codificar y almacenar la información contextual y espacial relacionada con las experiencias amenazantes al interactuar con la amígdala (Tovote, 2015). La amígdala es un conjunto de núcleos de sustancia gris anatómica y funcionalmente diferenciados que se localiza en el lóbulo temporal anteromedial ventral, en la que se pueden diferenciar varias divisiones supranucleares, como el *complejo basolateral de la amígdala* (C-BLA). Este último comprende el núcleo lateral, el basolateral, ventral basolateral y basomedial que constituyen la principal entrada de la información sensorial a la amígdala, y tiene primordial importancia en la formación de la memoria del miedo (Erlich et al., 2009)

Existen circuitos de retroalimentación entre el hipocampo y la amígdala que son cruciales para el procesamiento y la expresión del miedo. Durante el condicionamiento de miedo contextual, el hipocampo genera una representación contextual del evento mientras que la amígdala recibe e integra esa información junto con las aferencias sensitivas del estímulo aversivo captado por el tálamo para producir la respuesta motora y generando cambios en la eficacia sináptica permitiendo la codificación de la memoria del miedo para su almacenamiento (Fig.2) (Fanselow, 2010; Schafe et al. 2001; Fanselow & LeDoux, 1999).

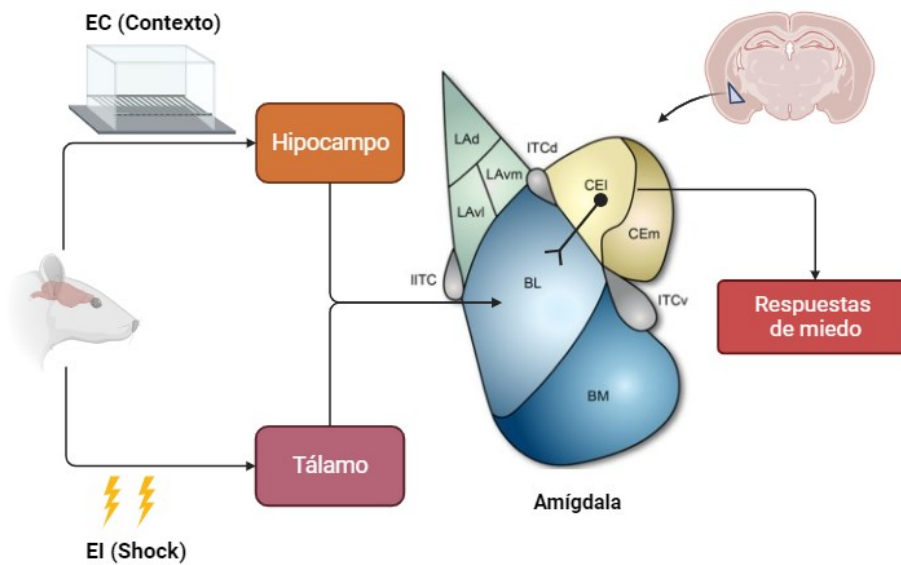


Fig. 2 - Representación esquemática del circuito cerebral implicado en la formación de la memoria de miedo contextual. EC: estímulo condicionado; EI: estímulo incondicionado.

Dado el papel fundamental de la amígdala en la memoria de miedo es congruente que actualmente se la encuentre implicada de manera activa en la patogénesis del TEPT. Se ha reportado que el estrés afecta las entradas neuronales al C-BLA, induciendo neuroplasticidad y causando hiperexcitabilidad de las neuronas principales de C-BLA. Numerosos estudios de imágenes cerebrales funcionales indican consistentemente una hiperactivación de la amígdala en el TEPT (Stevens et al. 2013), incluso se asocia esta hiperactividad con la predicción del desarrollo y mantenimiento de futuros síntomas, así como la causante de la falta de respuesta al tratamiento psicoterapéutico (Van Rooij et al. 2016). Esta hiperexcitabilidad es un factor importante que mantiene y exacerba los comportamientos anormales en el TEPT y otros trastornos del comportamiento (Sharp 2017; Rosen 2022).

En otro estudio relevante (Bijanki et al., 2020), dos pacientes con TEPT crónico fueron sometidos a ablación láser dirigida a la amígdala derecha, además del hipocampo epiléptico. Tras este procedimiento, ambos pacientes experimentaron no sólo una reducción significativa de las convulsiones, sino también una notable disminución de los síntomas de estrés postraumático. Este hallazgo respalda la hipótesis de que la modificación en la función de la amígdala, específicamente mediante la ablación, podría tener un impacto beneficioso en los síntomas crónicos del TEPT y mejorar la respuesta al tratamiento.

Sinapsis tripartita

El aprendizaje y la memoria están representados por circuitos neurales altamente interconectados; las conexiones son mediadas por sinapsis, que permiten que una célula transmita una señal eléctrica o química a otra célula. La eficacia de una sinapsis se fortalece o debilita con el tiempo, y este fenómeno se conoce como “plasticidad sináptica”, por lo tanto, se postula que esta plasticidad es un sustrato celular importante para el aprendizaje y la memoria (Goto, 2022).

El SNC de los vertebrados está compuesto aproximadamente por un 50% de células neuronales y un 50% de células gliales, que comprende a varios tipos de células, astrocitos, oligodendrocitos, microglía y otras que forman en conjunto “la glía” (Hilgetag 2009). Hasta hace unos 30 años en el campo de la neurociencia se creía que el flujo de la información nerviosa era de tipo “bipartito”, es decir, entre neuronas presinápticas y postsinápticas a través de neurotransmisores, y que las células gliales eran fundamentalmente un componente de “sostén y nutrición” cuya única función era proporcionar un entorno ideal para el desarrollo de las neuronas. Sin embargo, en este último tiempo, múltiples investigaciones soportan la teoría de que las células gliales cumplen un rol fundamental en la transmisión de señales nerviosas, principalmente los astrocitos. Se ha establecido que los astrocitos intercambian información con las neuronas, respondiendo y regulando la actividad sináptica a través de moléculas que funcionan como transmisores, formando en conjunto una “sinapsis tripartita” (Araque et al. 1999).

Gliotransmisores (GLT)

Es ampliamente reconocido el papel crucial de la transmisión glutamatérgica a través de receptores NMDA en la formación de memorias de miedo y otros tipos de memoria. El glutamato, principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central (SNC), es liberado por los inputs que llegan al complejo amígdala basolateral central (C-BLA) para activar receptores postsinápticos, incluyendo los AMPA y NMDA. Específicamente, el receptor NMDA desempeña un papel clave en la formación de memorias, ya que su bloqueo farmacológico o mediante otras metodologías impide dicha formación.

El complejo receptor NMDA, además de requerir glutamato, necesita la unión de co-agonistas endógenos como glicina o D-serina en el sitio modulador de glicina para su

activación. Estudios electrofisiológicos han demostrado que la D-serina es el principal agonista de los receptores NMDA sinápticos (Henneberger et al., 2010). Actualmente, existe un debate en curso sobre si la D-serina es liberada por astrocitos o neuronas. La mayoría de las investigaciones sostienen que los astrocitos son los principales responsables de la liberación de D-serina y glutamato y que esta fuente de "gliotransmisores" (GLT) es fundamental para la plasticidad sináptica (Adamsky et al., 2018; Henneberger et al., 2010; Purpura et al., 2004). Sin embargo, algunas investigaciones recientes sugieren que, aunque los astrocitos desempeñen un papel clave en modular la disponibilidad de D-serina, las neuronas serían la principal fuente de este transmisor. Al parecer los astrocitos sintetizarían, a partir de glucosa, su precursor L-serina, liberándolo para su conversión a D-serina mediante la enzima serina racemasa (SR), destacando así la importancia de ambos tipos de células en la neurotransmisión (Wolosker et al., 2016; Coyle et al., 2020). A los fines de simplificar la redacción, en esta tesina describiremos la D-serina como un gliotransmisor.

En diversos estudios se demostró que la administración exógena de D-serina fue capaz de recuperar el déficit de memoria inducido con inhibidores de hemicanales expresados por astrocitos (Stehberg et al. 2012) y de facilitar la extinción del miedo, que es fundamental para trastornos relacionados con el trauma, el miedo y la ansiedad como en el TEPT (Balu et al. 2018; Wolosker & Balu 2020).

Un estudio reciente que investigó el efecto del bloqueo de los hemicanales de conexina 43 en los astrocitos de la amígdala asociado a un condicionamiento a claves discretas (tono). Estos hemicanales se encargan de regular la liberación de gliotransmisores (glutamato/glutamina, ATP, D-serina/L-serina, entre otros) requeridos para la plasticidad sináptica. Al analizar los resultados, se observó que dicho bloqueo (y, por ende, la inhibición de la liberación de los gliotransmisores) generó un déficit en la memoria - 1h y 24h posteriores al condicionamiento -, y que este deterioro pudo revertirse a través de la co-administración exógena de glutamato y D-serina. Estos resultados sugieren que la liberación astrocítica de estos gliotransmisores, a través de los hemicanales de conexina 43, está involucrada en la adquisición de la memoria a largo plazo y en la modulación de la actividad de los receptores NMDA de las neuronas de la amígdala basolateral. No obstante, se observó que el bloqueo del hemicanal no tuvo efecto cuando se realizó inmediatamente después del condicionamiento, indicando que este proceso no sería relevante para la consolidación de la memoria (Linsambarth et al. 2022).

El reconocimiento de la contribución de los astrocitos en el funcionamiento de la sinapsis, la plasticidad sináptica y el proceso de comunicación entre las células mediante transmisores promovió el estudio del rol de estas células en el aprendizaje y la memoria, sin embargo, poco se sabe sobre el papel de los astrocitos del C-BLA en el condicionamiento del miedo contextual (CMC).

Una de las técnicas comúnmente utilizadas para estudiar la funcionalidad de una célula en un órgano o tejido en particular es a través de la inhibición celular y posterior observación de los cambios que ocurran en el individuo de interés. Para el estudio de los astrocitos se puede utilizar el fluorocitrato (FLC), un inhibidor metabólico selectivo de estas células que actúa por inhibición de la aconitasa afectando el ciclo de Krebs (Voloboueva et al., 2007). Uno de los efectos del FLC que revierte interés en este trabajo es que desactiva la síntesis de L-serina y glutamina para su posterior transformación en D-serina y glutamato (Le Bail et al., 2014; Schousboe et al. 2013), disminuyendo la activación de los receptores NMDA e impidiendo así el aprendizaje.

Una línea de investigación reciente realizada en nuestro instituto (Riva-Gargiulo, 2021) comenzó a indagar la participación de los astrocitos del C-BLA en las distintas fases del CMC utilizando FLC en las diferentes etapas de la formación de la memoria de miedo. Cuando se administró el FLC en dosis de 0,5 nmol o 1 nmol en el C-BLA previo a la sesión de aprendizaje, se observó que la formación de la memoria fue impedida, lo que sugiere que los astrocitos serían críticos durante la fase de adquisición de la memoria del miedo (Fig.3).

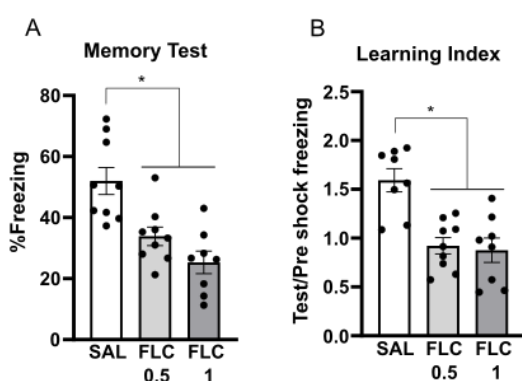


Fig. 3 - Evaluación de la adquisición de la memoria (Riva-Gargiulo, 2021). A) Porcentaje de freezing de los animales durante el test de memoria. Los grupos FLC mostraron niveles de freezing significativamente menores a los del grupo SAL en el test de memoria (test de Newman-Kelus, FLC 0,5: $p=0,006$; FLC 1: $p=0,003$). B) Índice de memoria (Test1/Pre-EI) (test de Newman-Kelus, FLC 0,5: $p=0,006$; FLC 1: $p=0,003$) (SAL: $N=12$; FLC 0,5: $N=11$; FLC 1: $N=10$).

Para profundizar en la investigación y obtener una mejor comprensión de los mecanismos que involucran a los astrocitos en la fase de adquisición de esta memoria, en este trabajo se evaluó como “Experimento 1” si los déficits de memoria inducidos por la administración de FLC previo a la sesión de aprendizaje podrían revertirse mediante la coadministración de los posibles gliotransmisores: glutamato y d-serina.

Por otra parte, cuando se administró FLC una hora después del CMC, es decir durante la fase de consolidación, no se observaron alteraciones en la memoria. Por lo tanto, se podría suponer que la participación de los astrocitos no sería crítica en esta fase. Sin embargo, esta conclusión no se pudo confirmar por completo, ya que el compuesto FLC comienza a ejercer una inhibición en el metabolismo astrocítico aproximadamente una hora después de su administración. En consecuencia, se puede inferir que la administración del FLC una hora después del CMC deja el sistema de memoria "intacto" por al menos dos horas. Sumado a esto, algunos trabajos recientes sugieren que los astrocitos podrían participar en fases tempranas de la consolidación (Li et al., 2020) y no en toda la ventana (4-5 h, según lo evaluado con inhibidores de síntesis de proteínas).

En base a esta información y con el objetivo de maximizar la acción del fármaco lo más temprano posible en la ventana de consolidación, para el “Experimento 2”, se administró el FLC cinco minutos después del CMC, buscando explorar la posible influencia de los astrocitos en las etapas iniciales de la consolidación de la memoria.

Plasticidad astrocítica

Estudios in vitro demostraron que la plasticidad sináptica se encuentra fuertemente regulada por los astrocitos a través de cambios morfológicos en estas células, caracterizados por un aumento en el volumen celular, aumento en el número de procesos y en una mayor cobertura de las estructuras pre y postsinápticas (Lawal et al. 2022), aunque también se ha observado una retracción en el sitio de sinapsis, particularmente en la amígdala e hipocampo (Badia-Soteras 2022; Ostroff 2014). Una manera de estudiar cambios en la morfología de los astrocitos en organismos completos es a través de la inmunomarcación de GFAP (proteína ácida fibrilar glial), una proteína estructural del citoesqueleto de los astrocitos que permite identificar cambios en los procesos principales de estas células. En efecto, trabajos recientes en ratones sometidos a un condicionamiento a claves discretas (un sonido)

mostraron que los astrocitos de la amígdala redujeron la inmunomarcación durante la fase de consolidación de ese tipo de memoria (Liao et al., 2017).

Dicho lo anterior, como último experimento en esta investigación, “Experimento 3”, se evaluó si durante la fase de consolidación de la memoria a partir de un condicionamiento de miedo contextual se generan o no cambios morfológicos celulares y en la expresión de GFAP en los astrocitos de la amígdala y del hipocampo.

Objetivos e hipótesis

Objetivo general

Profundizar el estudio sobre la participación de los astrocitos en el proceso de formación de la memoria del miedo a largo plazo y evaluar posibles mecanismos involucrados en la adquisición/consolidación de la memoria.

Objetivos específicos

1. Evaluar si la administración en el C-BLA de glutamato y D-serina revierten el déficit de formación de memoria en el condicionamiento del miedo inducido por la inhibición del metabolismo de los astrocitos en el C-BLA.
2. Evaluar los efectos de la inhibición astrocítica en el C-BLA en fases tempranas de consolidación de la memoria de miedo.
3. Examinar los cambios morfológicos y en los niveles de GFAP en los astrocitos del C-BLA luego del condicionamiento de miedo.

Hipótesis

Los astrocitos del C-BLA participan activamente en la formación de una memoria de miedo a través de la liberación de gliotransmisores y cambios morfológicos que modulan la sinapsis tripartita durante la adquisición/fases tempranas de la consolidación.

Materiales y métodos

Animales

Para cumplir con los objetivos propuestos se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar (300-320g). Los individuos fueron criados en el bioterio del IFEC-CONICET y mantenidos en cajas de plexiglass (2 o 3 individuos por caja) bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h a temperatura estable (22-24°C) con libre acceso de agua y comida. Todos los procedimientos se llevaron a cabo 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 Decanal 2023-929. EX-2023-00303657). En todos los casos, con el fin de minimizar el estrés y facilitar el manejo, se tomaron los recaudos necesarios para que las ratas pudieran habituarse a la manipulación del experimentador como el transporte dentro del bioterio, pesaje, inmovilización para los procedimientos, etc.

Cirugía para administración intracerebral

Bajo condiciones de asepsia, las ratas fueron anestesiadas con una combinación de ketamina (80 mg/kg, i.p) y xilazina (7 mg/kg i.p.) y colocadas en un aparato estereotáxico específico para ratas (Fig.4). A continuación, los animales fueron canulados bilateralmente, con agujas 22G modificadas, en el C-BLA en las coordenadas AP: - 2,5 mm, LM: +/- 4,7 mm, DV: - 6,4 mm (Paxinos y Watson, 2017). Estas cánulas se fijaron al cráneo con acrílico

dental y dos tornillos enroscados al hueso craneal y se utilizaron de guías para infundir diversas soluciones experimentales utilizando cánulas inyectoras (agujas 30G) de menor grosor y mayor longitud que las cánulas guías (+2 mm) para evitar que la droga inyectada no se adhiera a las paredes de la cánula guía por capilaridad y que las soluciones accedan directa y completamente en el C-BLA. Luego de la cirugía, se dejó descansar a los animales en sus cajas habituales durante 7-10 días mientras se realizaban maniobras de habituación para la manipulación de estos.

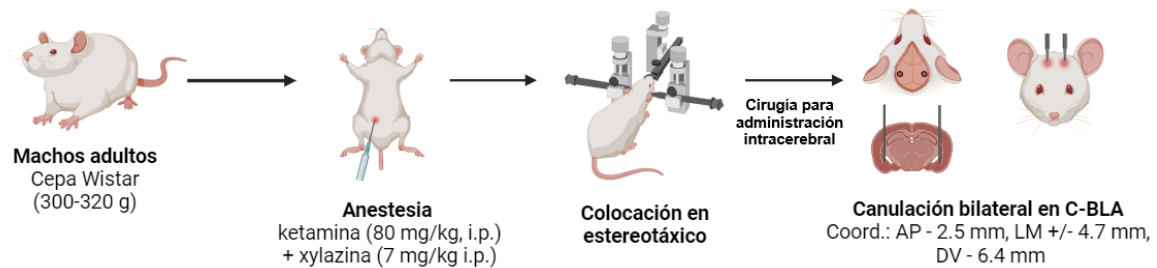


Fig. 4 - Esquema representativo de la cirugía realizada para administración intracerebral.

Condicionamiento de miedo contextual (CMC)

Se utilizó una cámara de condicionamiento (20 x 23 x 20 cm) que constaba en una caja de acrílico blanca con tapa transparente que permitía la visualización del animal y un suelo con una rejilla con 10 barras paralelas de acero inoxidable cada una con un diámetro de 1.5 mm y separadas por 1.5 cm, la misma se ubicó en el suelo de una habitación con aislamiento sonoro y baja iluminación para comodidad del animal. Para realizar el condicionamiento, la rejilla fue conectada a un generador para la transmisión de corriente eléctrica con el fin de generar choques eléctricos de intensidad y duración definidas. En el “Día 1” las ratas fueron colocadas individualmente en la cámara de condicionamiento, luego de 3 minutos de aclimatación (período previo al shock) recibieron dos shocks de 1mA de 3 segundos de duración cada uno separados por 30 segundos (al tiempo 3’00’’ y 3’30’’). Pasados 60 segundos del último shock, se los devolvió a sus cajas de alojamiento. La cámara fue limpiada con una solución acuosa de etanol al 70% antes y después de cada sesión.

Test de memoria y evaluación

Pasadas las 48 horas del CMC (Día 3), se realizó una reexposición de los individuos a la caja (contexto) durante cinco minutos (Test de memoria 1); lo mismo se repitió a las 96 horas (Día 5) (Test de memoria 2). Finalizado el experimento, los animales fueron sacrificados mediante decapitación por guillotina y se extrajeron los cerebros para la verificación del sitio de inyección. Aquellos animales cuyas inyecciones bilaterales no alcanzaron el C-BLA fueron descartados para el análisis.

El *freezing* o “congelamiento” (cesación de todo movimiento excluyendo el asociado con la respiración) es considerado, por lo general, el comportamiento principal para estudiar el aprendizaje del miedo. Sin embargo, en esta investigación, buscamos ampliar el estudio de los comportamientos defensivos en respuestas a situaciones amenazantes, incluyendo al denominado *risk assessment* o “valoración de riesgos” (VR). A este último se lo define como un comportamiento de recopilación de información que se muestra en situaciones aversivas potencialmente amenazantes (Blanchard et al. 2011). Operacionalmente lo definimos como movimientos (usualmente luego del congelamiento) en los que el animal puede tener su cuerpo inmóvil, moviendo la cabeza y sus vibrisas, o moviendo su cuerpo lentamente, pero sin marchar, girando en el mismo eje o alargando su cuerpo unos centímetros hacia adelante o los laterales para olfatear brevemente sin llegar a dar inicio a la marcha (basado en: Blanchard y Blanchard, 1989; Bittencourt et al., 2004; Holly 2016; Viellard et al., 2016).

Para cuantificar los comportamientos se realizaron filmaciones de cinco minutos por individuo durante el condicionamiento y en los momentos de los test. En ellas se calculó el “porcentaje del tiempo” en el cual los animales evidenciaron dichos comportamientos y se obtuvo el **porcentaje de Congelamiento**, el **porcentaje de Valoración de riesgos (VR)** y, a partir de la sumatoria de ambos, el **porcentaje de Respuestas de Miedo integral (RMI)**. Además, también se calcularon diferentes índices: el **índice de memoria** (Test/Pre-EI), que permite normalizar la expresión de miedo propia del animal en el período previo al shock (es decir, el miedo basal de cada individuo), reduciendo así, la heterogeneidad de la expresión de miedo entre diferentes lotes de animales experimentales; y el **índice de reactividad al shock** (Post-EI/Pre-EI), para controlar si la respuesta al EI fue similar en todos los grupos experimentales.

Immunofluorescencia

Los animales fueron anestesiados y perfundidos intracardiamente con una solución de paraformaldehído al 4%. La post fijación se realizó sumergiendo los cerebros durante la noche utilizando también una solución de paraformaldehído al 4%. Posteriormente, para la realización de los cortes, fueron incluidos en un medio de montaje (OCT) y congelados a -70°C para luego ser seccionados coronalmente en rebanadas de 20 µm utilizando un criostato procurando que las mismas contengan las zonas de la amígdala y el hipocampo de interés. Para la inmunotinción primero se realizó un bloqueo y permeabilización de las membranas plasmáticas astrocíticas con suero de cabra 5% + Tritón 0,1% para luego dejar reposar sobre los tejidos durante 2 horas en movimiento a temperatura ambiente. Luego se procedió a la incubación con anticuerpos primarios disponibles comercialmente: anti-GFAP (1:300, SIGMA-ALDRICH) diluidos en una solución Buffer PBS 1%, dejándolos reposar sobre los tejidos toda la noche a 4-5°C. Al día siguiente, se realizó la incubación del anticuerpo secundario (Alexa 488 goat anti-mouse 1:1000) diluidos en una solución Buffer 1% de suero en PBS durante 2 horas en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron los tejidos con el marcador DAPI (para la tinción de núcleos celulares) por 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se realizó el montaje utilizando el medio acuoso FluorSave y posterior colocación de cubreobjetos sobre los tejidos.

Luego de la inmunotinción, se obtuvieron imágenes Z-stack confocales que incluyeron dos canales (verde, GFAP; azul, DAPI), a través del microscopio confocal láser de escaneo Olympus FV 1200. Se logró una resolución de 1024x1024 píxeles utilizando un objetivo de 60x. Las imágenes fueron analizadas con el software FIJI-ImageJ (Bender et al., 2020), utilizando el plugin “Simple Neurite Tracer (SNT) (Tavares et al., 2016). Los astrocitos fueron fácilmente identificados por su característica forma estrellada positiva para GFAP con un núcleo teñido por DAPI. Para la selección de astrocitos destinados al estudio morfométrico, se eligieron aquellos ubicados alejados de los bordes de la imagen con el fin de evitar procesos truncados. Además, se priorizaron aquellos en los que las estructuras teñidas con GFAP estuvieran asociadas a un solo núcleo teñido con DAPI. A partir de esto, se realizó una reconstrucción de 5 - 8 astrocitos por imagen.

Es relevante destacar que no fue factible llevar a cabo el análisis de los astrocitos en la amígdala debido a la limitada inmunomarcación observada en estas regiones en todas las imágenes examinadas. Además, los intentos por resolver este problema, mediante pruebas

que implicaron el uso de diferentes anticuerpos y métodos de tinción, resultaron infructuosos. En consecuencia, se restringió el análisis a los astrocitos ubicados en la zona CA1 del hipocampo donde se evidenció una inmunomarcación adecuada.

Diseños experimentales

Experimento 1: Coadministración de FLC y GLT previo al CMC.

Se utilizó un diseño factorial 2x2, con las variables droga 1 (SAL o FLC) y droga 2 (SAL o GLT), determinando 4 grupos de ratas y un N=10 por grupo. Los grupos fueron: SAL-SAL (control 1), SAL-GLT (control 2), FLC-SAL y FLC-GLT.

En el “Día 1” se efectuaron las administraciones de los fármacos previas al condicionamiento, separadas por un intervalo de tiempo de 50 minutos: SAL 0.5µl, FLC 0.5 nmol/0.5µl y GLT: glutamato (1 µg/0.5µl; SIGMA) + D-serina (2 µg/0.5 µl). La dosis de FLC seleccionada se basó en la literatura que indicaba que bajo estas condiciones afectaba selectivamente a los astrocitos y su efecto era reversible a las 24 h (Hassel B et al. 1992 y Liao Z et al. 2017). Las dosis de los transmisores fueron seleccionadas de la literatura buscando que fueran dosis que por sí mismas no faciliten de manera robusta el aprendizaje dado que el objetivo de la administración exógena fue restaurar la hipotética disminución del aporte astrocítico de estos transmisores por adición del FLC (Linsambarth et al. 2022; Miranda et al. 2002; Izquierdo et al. 1992; Fiorenza et al. 2012). Los fármacos se infundieron a velocidad constante mediante una bomba de micro infusión a través de cánulas intracerebrales previamente colocadas sobre el C-BLA en cada rata; al finalizar la administración, luego de 10 minutos se procedió con el CMC. A las 48 y 96 horas (Días 3 y 5) se efectuó una reexposición de los animales al contexto durante cinco minutos y se cuantificaron los porcentajes de respuestas de miedo (Fig.5).

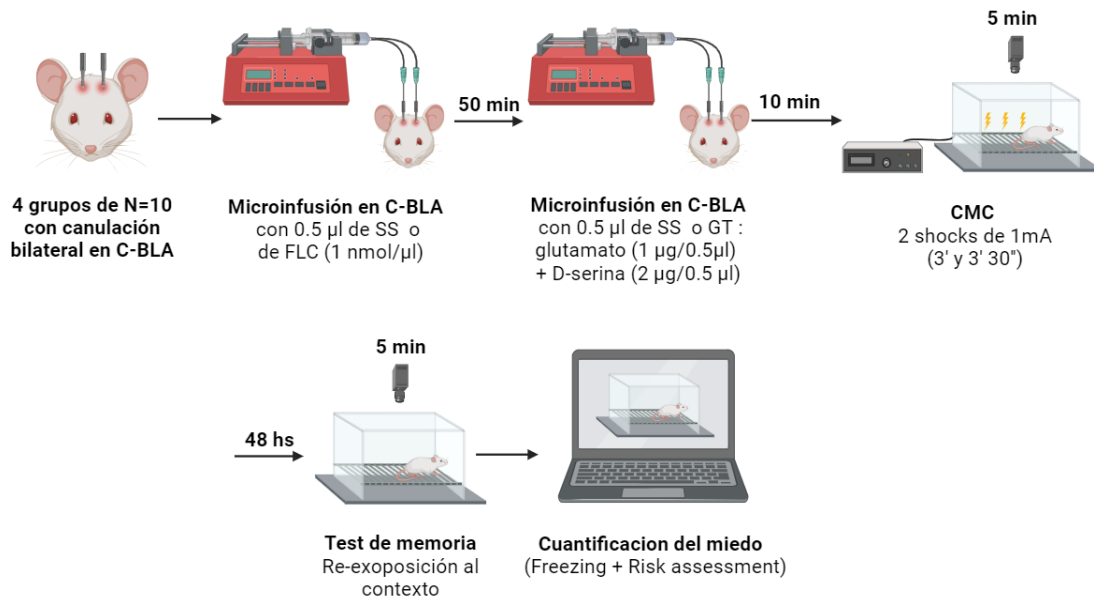


Fig. 5 – Diseño experimental 1. Coadministración de FLC y GLT previo al CMC.

Experimento 2: Administración de FLC posterior al CMC.

En el “Día 1” dos grupos de animales de N=10 fueron infundidos en el C-BLA con 0,5 μ l (1 nmol/ μ l) de fluorocitrato (FLC) o con 0,5 μ l de solución salina (SS), a una velocidad constante de 0,5 μ l/min mediante una bomba de micro infusión, 5 minutos después de efectuado el condicionamiento del miedo contextual. A las 48 y 96 h (Días 3 y 5) se realizó una reexposición de los animales al contexto del condicionamiento por cinco minutos y se cuantificaron los porcentajes de respuestas de miedo (Fig.6).

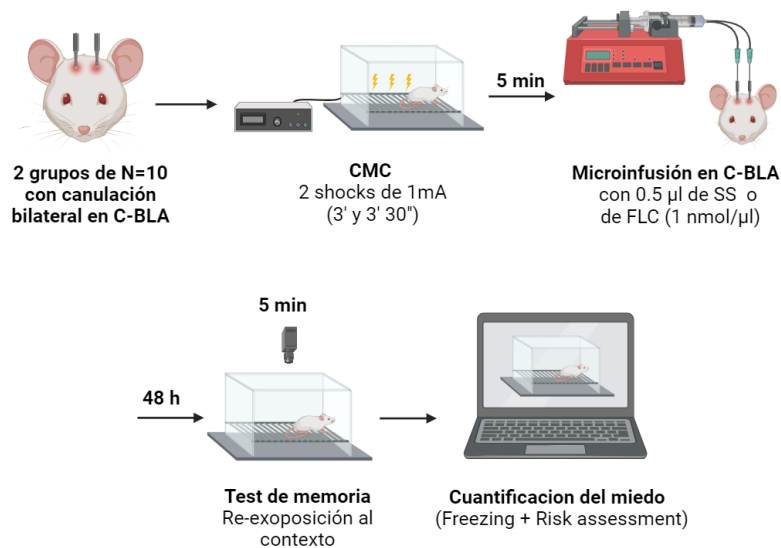


Fig. 6 – Diseño experimental 2. Administración de FLC posterior al CMC.

Experimento 3: *Inmunofluorescencia con GFAP para evaluar la plasticidad astrocítica durante la fase de consolidación de la memoria.*

Se trabajó con animales condicionados (CS US) y no condicionados (No-CS US) como control, con un N=4 por grupo. En los mismos se midieron los cambios en la inmunofluorescencia de los astrocitos marcados con GFAP al cabo de 1 hora posterior al condicionamiento, es decir, en la ventana temprana de la consolidación (Fig.7). mediante la cuantificación del número total de procesos, de la longitud total de cada astrocito a partir de la sumatoria de los procesos y, para evaluar la complejidad de cada astrocito, se realizó un análisis de Sholl (Fig.8), que cuantifica el número de intersecciones de los procesos astrocíticos en esferas concéntricas, originadas en el soma celular, separadas cada 4 micras (Sholl, 1953; Wilson et al., 2017; Tavares et al., 2016). Para analizar la intensidad de la inmunomarcación de GFAP se realizó un análisis de Threshold en cada una de las imágenes obtenidas a partir de cada individuo (1-4).

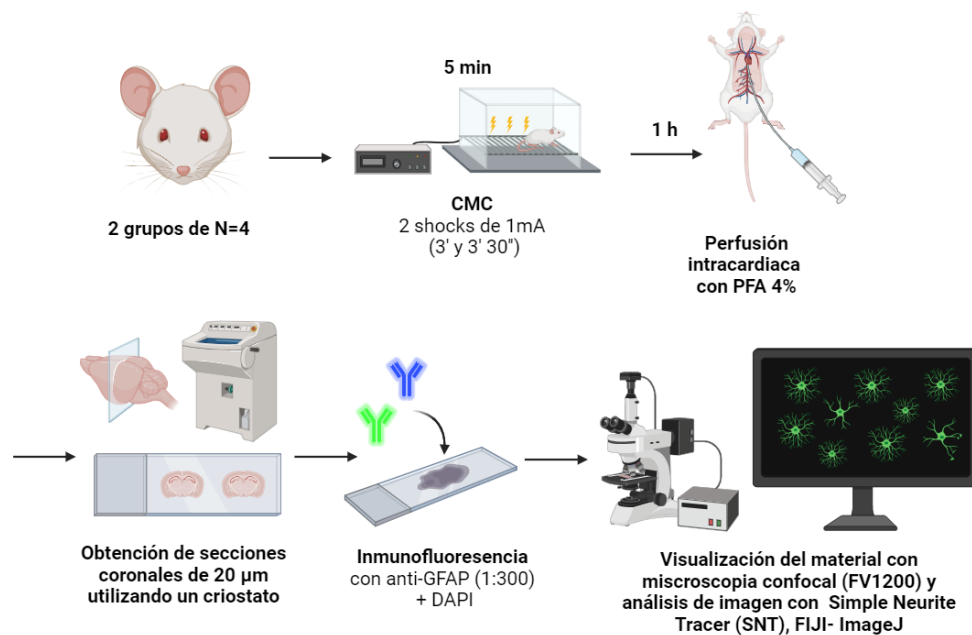


Fig. 7 – Diseño experimental 3. Inmunofluorescencia con GFAP para evaluar la plasticidad astrocítica durante la fase de consolidación de la memoria.

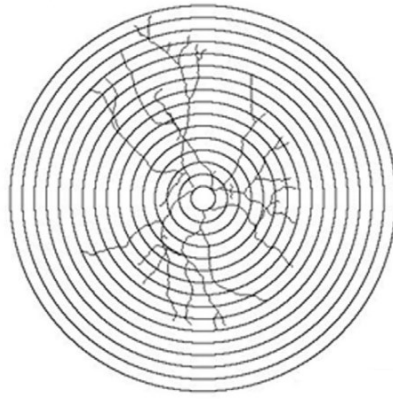


Fig. 8 - Esquema representativo de un análisis de Sholl (tomado de Binley et al. 2014). El centro de la imagen representa el soma celular a partir del cual se generan una serie de circunferencias, a distancias definidas, en las cuales se contabiliza el número de veces que los procesos celulares interceptan en cada de ellas.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media junto con la dispersión de datos individuales. Las diferencias significativas se observaron para un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). Al realizar las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, la gran mayoría de los datos presentó distribución Gaussiana habilitando la utilización de pruebas paramétricas.

Los datos obtenidos en el experimento 1 se analizaron mediante pruebas ANOVA de dos vías y posterior análisis post hoc de Tukey. Aquellos datos que no presentaron una distribución normal fueron normalizados a través de una transformación logarítmica o inversa de los mismos debido a que este tipo de análisis no permite la realización de pruebas no paramétricas.

Los datos del experimento 2 fueron analizados mediante pruebas T. Para aquellos datos que no presentaron una distribución normal se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

En el experimento 3, para el análisis estadístico de los datos astrocíticos, se implementó un diseño de datos anidado, una estructura común en estudios o experimentos estadísticos donde las unidades de observación no son independientes, sino que están organizadas jerárquicamente en niveles. Ignorar esta dependencia resultaría en una probabilidad de concluir incorrectamente que un efecto es estadísticamente significativo mucho mayor (hasta un 80%) que el nivel común establecido (5%) (Arts et al. 2014). En

nuestro caso se estudia la variabilidad entre diferentes unidades superiores (individuos) y la variabilidad dentro de esas unidades en los niveles inferiores (astrocitos). Por lo tanto, para comparar el número total de procesos de cada astrocito, las longitudes totales y la intensidad de expresión de GFAP, se realizaron pruebas T anidadas.

Por otra parte, métodos como los modelos de efectos mixtos pueden ser útiles para manejar la dependencia entre las observaciones anidadas y para extraer conclusiones válidas (Schielteth & Nakagawa, 2012). Estos modelos permiten incorporar tanto efectos fijos (como las diferencias entre individuos) como efectos aleatorios (para modelar la variabilidad dentro de cada individuo) que actualmente suelen utilizarse para el análisis de Sholl (Wilson et al. 2017). Cuando se realizan múltiples comparaciones entre grupos o niveles dentro de un modelo mixto anidado, existe la posibilidad de que algunos resultados significativos sean el resultado de variabilidad aleatoria en lugar de verdaderas diferencias en los efectos que estás investigando. Para resolver esto, se realiza un control del FDR (False Discovery Rate o Tasa de Descubrimiento Falso), que se refiere a la proporción de descubrimientos falsos entre las comparaciones o contrastes realizados en el análisis, que implica aplicar métodos estadísticos que ajusten los valores de significancia para limitar la proporción de falsos descubrimientos. El procedimiento más común para el análisis FDR es el método de Benjamini-Hochberg. Este método ordena los p-valores de las pruebas de menor a mayor y luego compara cada p-valor con un umbral ajustado en función del FDR deseado. Finalmente se seleccionan como descubrimientos significativos aquellos cuyos p-valores que están por debajo de este umbral ajustado, y a estos p-valores corregidos se los denomina q-valores (Benjamini & Hochberg, 1995).

Por lo tanto, para el análisis de Sholl, se realizaron una serie de estudios de modelos mixtos anidados en cada una de las distancias al soma. Para controlar los falsos positivos, se obtuvieron los q-valores utilizando un FDR de 5%.

Resultados

Experimento 1: Coadministración de FLC y GLT previo al CMC.

Estudios anteriores realizados en este instituto sugirieron la participación de los astrocitos en la fase de adquisición de la memoria de miedo contextual. Esta implicación se evidencio al observar una disminución significativa del aprendizaje cuando se inhibió el metabolismo de astrocitos mediante la administración de FLC previo a la sesión de condicionamiento. A raíz de esta investigación y otros antecedentes previamente mencionados, surgió la oportunidad de investigar si el impedimento en la formación de la memoria de miedo producida por el FLC podría ser revertida al incorporar putativos gliotransmisores en la amígdala. Por lo tanto, postulamos la hipótesis de que la administración de glutamato y D-serina en el C-BLA de ratas con inhibición astrocítica previo al condicionamiento revertirá el déficit de formación de memoria inducido por FLC. Para evaluar esto, administramos FLC o SAL seguido por la administración de los gliotransmisores (GLT) o SAL dentro del C-BLA previo a la sesión de condicionamiento, dando lugar a cuatro grupos en total: SAL-SAL (control 1), SAL-GLT (control 2), FLC-SAL y FLC-GLT. La memoria de miedo se evaluó a través del porcentaje de Congelamiento, porcentaje de Valoración de riesgo (VR) y porcentaje de Respuestas de Miedo integral (RMI) (Congelamiento + VR) a las 48 y 96 h posteriores al condicionamiento junto con sus respectivos índices de memoria (Fig. 9A).

Previo al análisis de los test de memoria se evaluaron los porcentajes de cada comportamiento en los tiempos Pre-EI (miedo basal) y Post-EI (posterior al shock). Los ANOVAs de medidas repetidas indicaron que el % Congelamiento y % RMI aumentaron

significativamente en el tiempo Post-EI ($p < 0,001$), mientras que con el % VR se observa una tendencia a una disminución de la VR en el tiempo Post-EI con respecto al Pre-EI, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 9B). Por otro lado, se analizaron los índices de reacción como control para medir la respuesta de los animales al shock (EI) en el día del condicionamiento (Post-EI/Pre-EI) debido a que, aunque los registros observacionales indicaron que todos los animales manifestaron una reacción notoria a cada uno de los shocks durante los experimentos, existía la probabilidad de que la administración de las drogas en la amígdala previa al condicionamiento influyera en la percepción del shock, afectando las interpretaciones de los resultados. En este experimento, al observar los índices de reacción con respecto al % RMI (SAL-SAL: $1,61 \pm 0,4$; SAL-GLT: $1,7 \pm 0,6$; FLC-SAL: $1,39 \pm 0,3$; FLC-GLT: $1,64 \pm 0,4$), %Congelamiento (SAL-SAL: $2,31 \pm 0,8$; SAL-GLT: $2,16 \pm 0,9$; FLC-SAL: $1,84 \pm 0,8$; FLC-GLT: $1,9 \pm 0,8$) y % VR (SAL-SAL: $0,61 \pm 0,3$; SAL-GLT: $0,7 \pm 0,9$; FLC-SAL: $0,64 \pm 0,6$; FLC-GLT: $1,0 \pm 1,1$) y al realizar el ANOVA de dos vías correspondiente, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0,5145$, $p = 0,7841$ y $p = 0,6250$ respectivamente) (Fig. 9C). Estos resultados sugieren que todos los animales presentaron una reacción similar al condicionamiento independientemente del tratamiento.

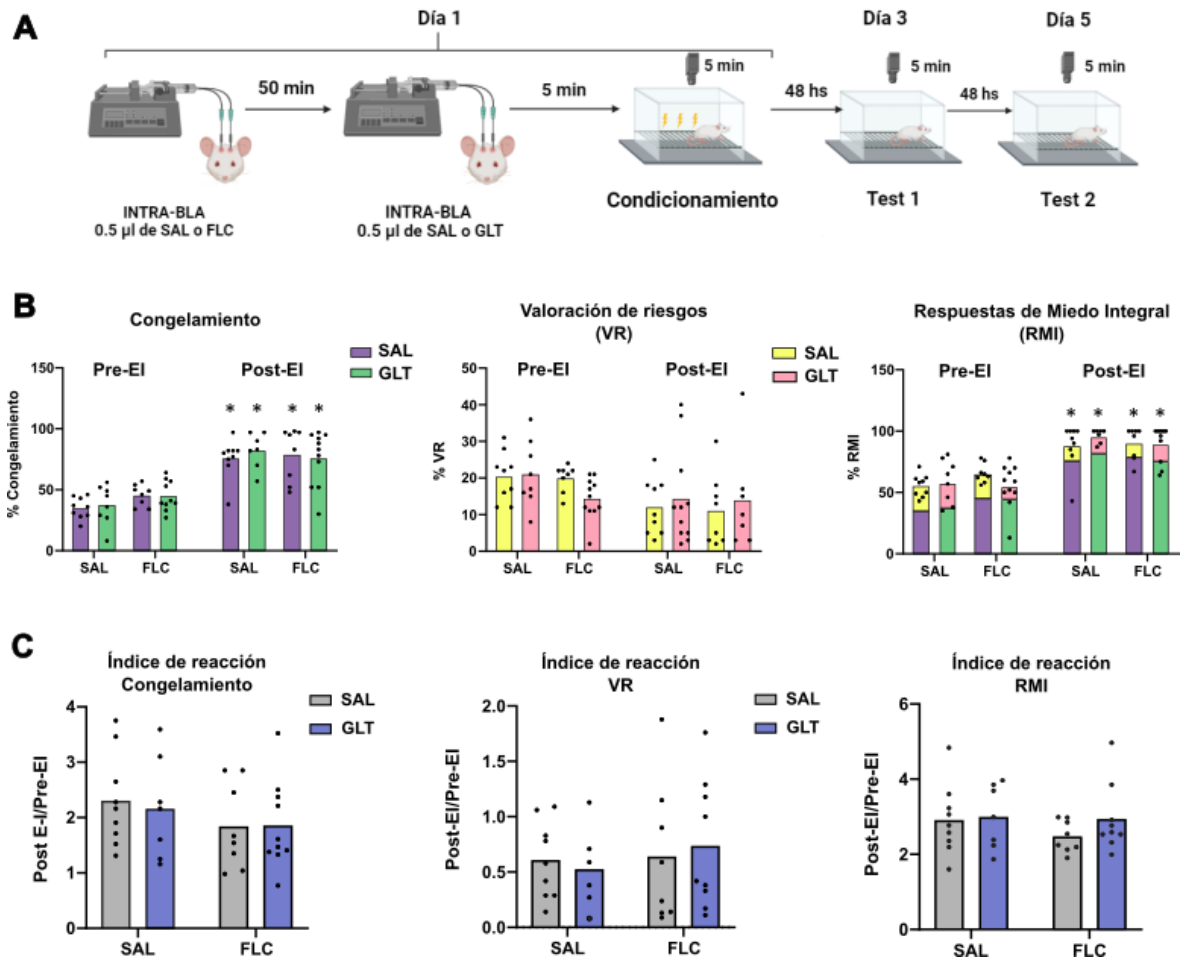


Fig. 9 - Evaluación de la coadministración de FLC y GLT previo al CMC. A) Diseño experimental. B) Porcentajes de Congelamiento (izquierda), Valoración de riesgos (centro) y RMI (derecha), en los tiempos Pre-EI y Post-EI. Todos los tratamientos presentaron mayor porcentaje de miedo en el tiempo Post-EI al analizar el % Congelamiento ($p < 0,001$) y % RMI ($p < 0,001$). C) Índice de reacción al EI (Post-EI/Pre-EI). No se encontraron diferencias en la reacción al shock entre los tratamientos en el análisis del Congelamiento (izquierda) [$F(1, 30) = 0,07641$; $p = 0,7841$], Valoración de riesgos (centro) [$F(1, 28) = 0,2442$; $p = 0,6250$] y de RMI (derecha) [$F(1, 29) = 0,4356$; $p = 0,5145$]. Los datos se representan como la media y dispersión de los datos individuales. Se realizó un análisis estadístico mediante ANOVAs de dos vías y post hoc de Tukey. * $p < 0,05$.

En el día del test de memoria 1 (día 3) (Fig. 10A), cuando se evaluó el % RMI (SAL-SAL: $74 \pm 10\%$; SAL-GLT: $71 \pm 15\%$; FLC-SAL: $63 \pm 15\%$; FLC-GLT: $63 \pm 11\%$) un ANOVA de dos vías indico que el grupo de animales tratado con FLC (FLC-SAL + FLC-GLT) tuvo niveles significativamente más bajos de miedo que aquel de los animales tratados con SAL [$F(1, 32) = 4,363$; $p = 0,0448$]. En la misma dirección, al analizar los índices de aprendizaje 1 (Test 1/Pre-EI) obtenidos a partir de los %RMI (SAL-SAL: $1,35 \pm 0,3$; SAL-GLT: $1,27 \pm 0,3$; FLC-SAL: $0,97 \pm 0,2$; FLC-GLT: $1,09 \pm 0,2$), los ANOVAs también evidenciaron una disminución del aprendizaje del miedo por parte de los grupos tratados con FLC en comparación con que aquellos tratados con SAL [$F(1, 31) = 10,39$; $p = 0,0030$] al igual que el ANOVA repetido que considera la sesión (miedo basal vs el

miedo en la prueba) y el tratamiento como factores, indicó una interacción significativa ($p=0,003$), y en la prueba post hoc de Tukey los grupos administrados con FLC mostraron niveles significativamente menores de miedo que los grupos con SAL en el día de la prueba ($p=0,004$). Estos resultados estarían sugiriendo que la coadministración de los “gliotransmisores” no habría sido capaz de revertir el deterioro de la memoria inducido por la administración del FLC.

Por otra parte, los resultados en el test de memoria 1 para el % Congelamiento (SAL-SAL: $35\pm 13\%$; SAL-GLT: $39\pm 11\%$; FLC-SAL: $30\pm 12\%$; FLC-GLT: $31\pm 7\%$) no evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, cuando se analizaron los índices de memoria 1 (Test 1/Pre-EI) obtenidos a partir del % Congelamiento (SAL-SAL: $1,0\pm 0,3$; SAL-GLT: $1,22\pm 0,5$; FLC-SAL: $0,68\pm 0,3$; FLC-GLT: $0,74\pm 0,3$) los ANOVAs sí mostraron una disminución del aprendizaje del miedo por parte de los grupos tratados con FLC en comparación con que aquellos tratados con SAL [$F(1, 31) = 11,61$; $p=0,0018$]. Mientras que el ANOVA repetido evidenció una interacción significativa ($p=0,018$) entre factores (sesión: Pre-EI/Test 1 vs Tratamiento), y el post hoc indicó que los grupos con FLC mostraron menos congelamiento ($p=0,013$) que los individuos con SAL. Esto estaría indicando que los individuos control mantuvieron el mismo porcentaje de congelamiento, lo cual resultó inesperado.

Estos resultados sugieren que, si solo se hubiera considerado el congelamiento para evaluar la memoria del miedo, como se hace comúnmente, nos encontraríamos ante una discrepancia con los antecedentes que evidenciaban la capacidad del FLC para impedir la formación de la memoria.

Con respecto al % VR en el test de memoria 1 (SAL-SAL: $39\pm 7\%$; SAL-GLT: $32\pm 8\%$; FLC-SAL: $33\pm 8\%$; FLC-GLT: $32\pm 7\%$) no se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos. Y en la misma dirección, entre los índices de memoria de VR (SAL-SAL: $2,02\pm 0,5$; SAL-GLT: $1,79\pm 0,9$; FLC-SAL: $1,71\pm 0,6$; FLC-GLT: $2,38\pm 0,8$) no se observaron diferencias significativas (Fig.10B). Con respecto al ANOVA de medidas repetidas, no se observó una interacción significativa entre factores (sesión: Pre-EI-Test 1 vs Tratamiento), con un Tukey indicando un aumento significativo ($p=0,000134$) en la VR en todos los individuos el día del test.

Con relación al test de memoria 2 (día 5), al analizar los % RMI cuatro días después del condicionamiento (SAL-SAL: $83\pm 7\%$; SAL-GLT: $72\pm 20\%$; FLC-SAL:

65±12%; FLC-GLT: 77±8%) se observó un efecto de interacción significativo en el ANOVA de dos vías [$F(1, 32) = 7,236; p=0,0113$]. La prueba post hoc de Tukey indicó que los animales administrados con FLC-SAL evidenciaron niveles significativamente más bajos de miedo que aquellos administrados con SAL-SAL ($p=0,0486$). En cuanto a la evaluación de los comportamientos individuales en el test 2, al analizar el % Congelamiento entre los distintos tratamientos (SAL-SAL: 45±9%; SAL-GLT: 38±19%; FLC-SAL: 30±9%; FLC-GLT: 42±11%) y el % VR (SAL-SAL: 38±8%; SAL-GLT: 35±6%; FLC-SAL: 36±8%; FLC-GLT: 35±10%), no se observaron diferencias significativas de aprendizaje entre tratamientos (Fig. 10C). Estos resultados sugieren nuevamente la importancia de considerar más de un comportamiento asociado al miedo para una interpretación más precisa de los resultados. Sorpresivamente, cuando comparamos cómo varió el % RMI el día del test 1 vs el test 2, se observa que en el día del test 2 el aprendizaje aumentó (SAL-SAL y FLC-GLT) o se mantuvo constante (SAL-GLT y FLC-SAL).

Sumado a esto último, cuando evaluamos los índices de aprendizaje 2 (Test 2/Pre-EI) del RMI (SAL-SAL: 83±6%; SAL-GLT: 72±19%; FLC-SAL: 65±12%; FLC-GLT: 77±8%), el ANOVA evidenció un efecto de interacción significativo entre los tratamientos [$F(1, 32) = 13,67; p=0,0008$], y el post hoc de Tukey demostró que, además de observarse que los animales administrados con FLC-SAL mostraron niveles significativamente más bajos de miedo que aquellos administrados con SAL-SAL ($p=0,0005$), también se observó que aquellos administrados con los gliotransmisores (FLC-GLT) evidenciaron un aumento significativo del aprendizaje del miedo ($p=0,0398$) sugiriendo que los gliotransmisores fueron capaces de revertir el déficit de memoria inducido por el FLC. También es relevante señalar, en este contexto, que no se observaron diferencias significativas entre SAL-SAL y SAL-GLT (Tukey, $p=0,0938$). Esto sugiere que la administración de GLT podría estar restaurando la disminución inducida por el FLC, en lugar de ser el resultado directo de un efecto pro cognitivo per se de los gliotransmisores que podrían estar compensando el déficit (Fig. 10D).

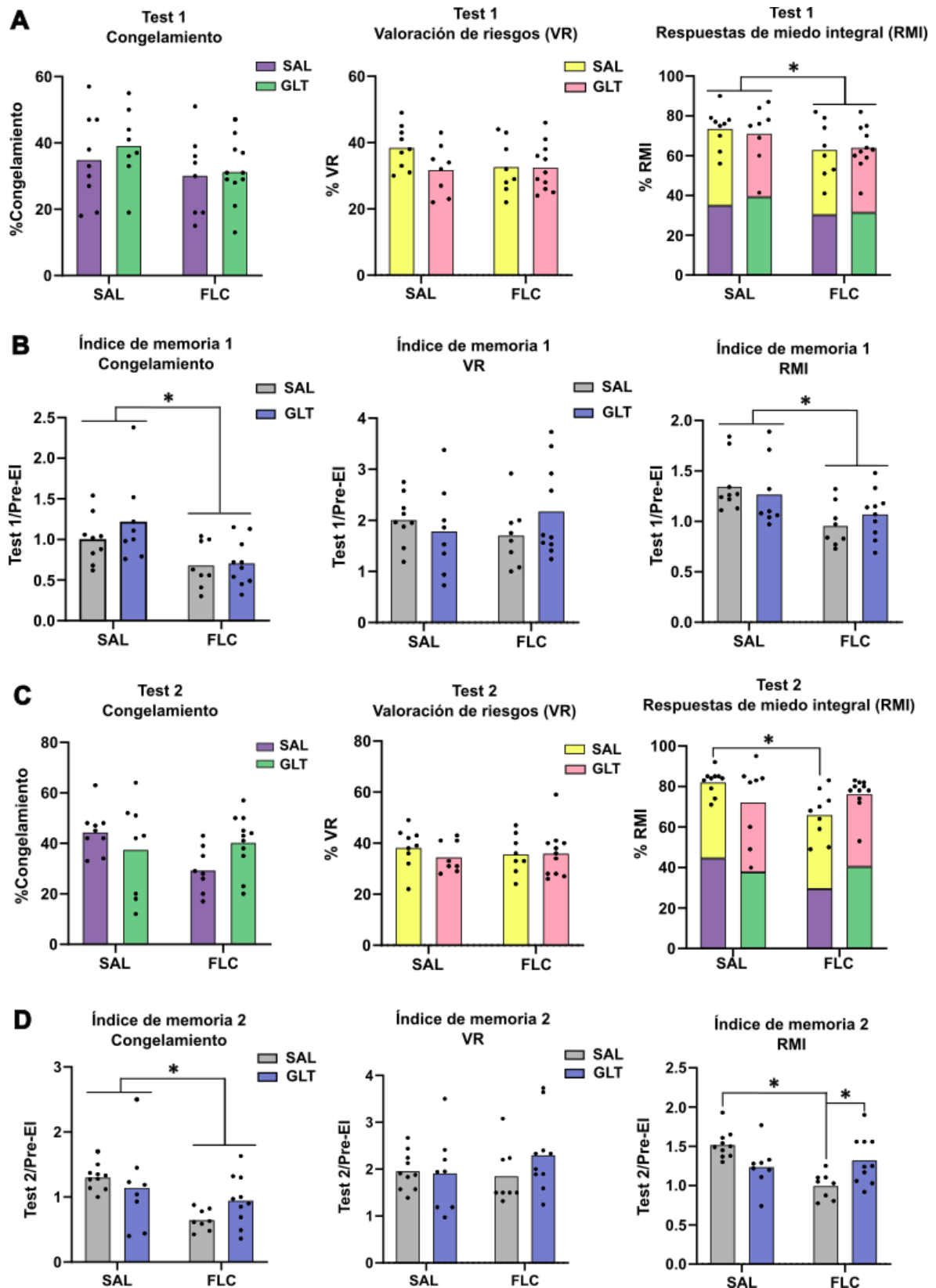


Fig. 10 - Evaluación de la coadministración de FLC y GLT previo al CMC. A) Test de memoria 1. Al evaluar los % RMI (derecha) se evidenciaron diferencias significativas entre grupos del factor droga 1 (SAL vs FLC) [$F(1, 32) = 4,363$; $p=0,0448$]. B) Índice de memoria 1 (Test 1/Pre-EI). Se observaron diferencias significativas entre los grupos SAL vs FLC al analizar los índices de memoria del Congelamiento (izquierda) [$F(1, 31) = 11,61$; $p=0,0018$] y del RMI (derecha) [$F(1, 31) = 10,39$; $p=0,0030$]. C) Test de memoria 2. El análisis del RMI (derecha) del test 2 evidenció una interacción

significativa entre los tratamientos SAL-SAL vs FLC-SAL [$F(1, 32) = 7,236$; $p=0,0113$; Tukey $p=0,0486$]. **D)** Índice de memoria 2 (Test 2/Pre-EI). Al analizar los índices del %Congelamiento (izquierda) se evidenciaron diferencias significativas entre grupos del factor droga 1 (SAL vs FLC) [$F(1, 32) = 10,37$; $p=0,0029$]; entre los índices de RMI (derecha) se observó una interacción significativa [$F(1, 32) = 13,67$; $p=0,0008$] entre los tratamientos SAL-SAL vs FLC-SAL (Tukey $p=0,0005$) y FLC-SAL vs FLC-GLT (Tukey $p=0,0398$). Los datos se representan como la media y la dispersión de los datos individuales. Se realizó un análisis estadístico mediante un ANOVA de dos vías y post hoc de Tukey. * $p < 0,05$.

Finalmente, podemos decir que, al analizar estadísticamente los distintos test e índices utilizados para estudiar la memoria de miedo en este experimento, los resultados obtenidos entre los distintos porcentajes de cada compartimiento (Congelamiento, VR y RMI) fueron por lo general inconsistentes dentro de un mismo análisis.

Experimento 2: Administración de FLC posterior al CMC.

Estudios anteriores realizados en este instituto sugirieron que los astrocitos no participaban en la fase de consolidación de la memoria luego de administrar FLC 60 minutos después de la consolidación. Sin embargo, estudios recientes sugieren que en realidad los astrocitos no participan en toda la ventana de consolidación, sino que en las primeras horas. A raíz de esto, postulamos la hipótesis de que la inhibición astrocítica durante fases tempranas de la consolidación impedirá/disminuirá la formación de la memoria, manifestándose en una reducción de la respuesta de miedo el día del test. Para evaluar esto y para maximizar la acción del fármaco lo más temprano posible en la ventana de consolidación, se administró el FLC, o solución salina (SAL) como control, cinco minutos después del condicionamiento. La memoria de miedo se evaluó a través del porcentaje de congelamiento, porcentaje de Valoración de riesgo (VR) y porcentaje de Respuestas de Miedo integral (RMI) a las 48 y 96 h posteriores al condicionamiento, junto con sus respectivos índices de memoria al igual que en el experimento anterior (Fig. 11A).

Inicialmente se evaluaron los comportamientos de miedo entre los minutos previos al shock (Pre-EI; miedo basal) y aquellos posteriores al shock (Post-EI). Los ANOVAs de medidas repetidas indicaron un aumento significativo de los comportamientos de miedo de ambos tratamientos en el tiempo Post-EI: % Congelamiento ($p<0,0001$), % RMI ($p<0,0001$) y % VR ($p=0,0084$) (Fig. 11B). A su vez, se analizaron los **índices de reacción** como control para garantizar que hubo respuesta de los animales al shock (EI) en el día del condicionamiento (Post-EI/Pre-EI). Las pruebas T sobre los resultados de estos índices indicaron que no existen diferencias significativas con relación a la respuesta al shock

entre los tratamientos [Congelamiento (SAL: $4,6 \pm 3,6$; FLC: $2,32 \pm 1,3$; $p=0,7112$); VR (SAL: $1,6 \pm 1,0$; FLC: $2,68 \pm 2,0$; $p=0,0771$); y RMI (SAL: $2,6 \pm 1,3$; FLC: $2,49 \pm 0,6$; $p=0,1713$)] (Fig. 11C).

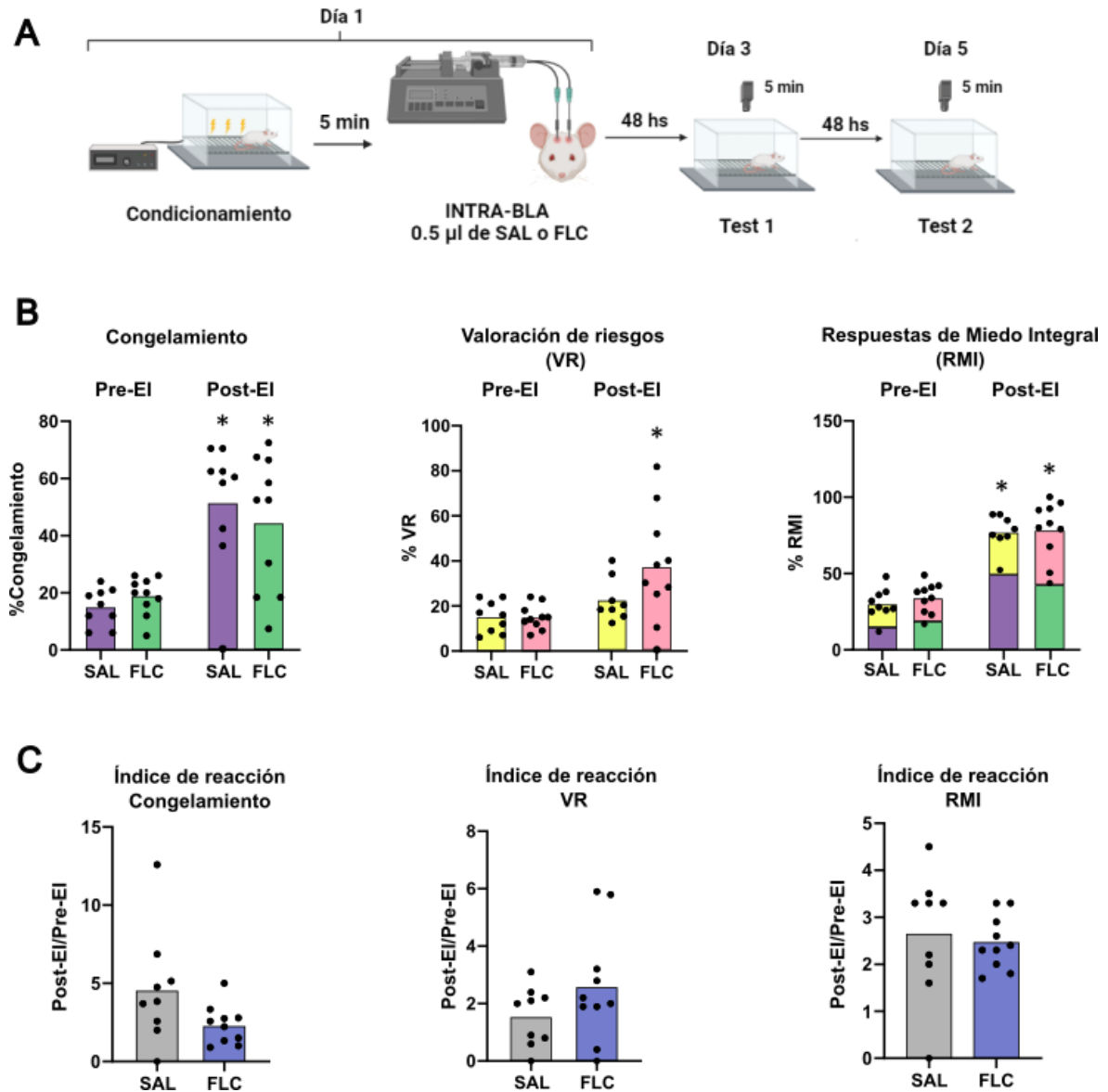


Fig. 11 - Evaluación de la administración de FLC posterior al CMC. A) Diseño experimental. B) Variación de los porcentajes de Congelamiento (izquierda), Valoración de riesgos (centro) y Respuestas de miedo integral (derecha) en los tiempos Pre-EI y Post-EI. Todos los tratamientos presentaron mayor porcentaje de miedo en el tiempo Post-EI: %Congelamiento ($p<0,0001$), % RMI ($p<0,0001$) y % VR ($p=0,0084$). C) Índice de reacción al EI (Post-EI/Pre-EI). No se encontraron diferencias en la reacción al shock entre los tratamientos en el análisis del Congelamiento (izquierda) ($t=1,881$, $df=17$; $p=0,0771$), VR (centro) ($t=1,428$, $df=17$; $p=0,1713$) y de RMI (derecha) ($t=0,3765$, $df=17$; $p=0,7112$). Los datos se representan como la media y dispersión de los datos individuales. Se realizó un análisis estadístico mediante un ANOVA de dos vías y pruebas T. * $p < 0,05$.

Cuando se evaluó la memoria a las 48 h del condicionamiento (Test 1), se obtuvieron los siguientes resultados: Congelamiento (SAL: $49,9 \pm 9,5\%$; FLC: $36,85 \pm 12,5\%$); VR (SAL: $32,8 \pm 8,4\%$; FLC: $25,15 \pm 10,5\%$); y RMI (SAL: $82,7 \pm 7,3\%$; FLC: $62,0 \pm 13,6\%$). Las pruebas T sobre los tres porcentajes estudiados indicaron que los animales administrados con FLC comparados con aquellos con SAL, mostraron una disminución significativa del miedo [Congelamiento ($t=4,334$, $df=17$; $p= 0,0005$); VR ($t=2,491$, $df=17$; $p= 0,0234$); y RMI (Man Whitney $p= 0,0328$)], indicando que efectivamente el FLC interfirió en la consolidación de la memoria (Fig. 12A). Algo similar ocurrió al analizar los distintos índices de memoria.

Por otro lado, las pruebas T de los índices de memoria 1 (Test 1/Pre-EI) del % Congelamiento (SAL: $4,0 \pm 1,8$; FLC: $2,25 \pm 0,8$) y del % RMI (SAL: $3,1 \pm 1,2$; FLC: $2,01 \pm 0,7$) indicaron que los animales administrados con FLC disminuyeron significativamente el aprendizaje del miedo [Congelamiento ($t=3,255$, $df=17$; $p=0,0047$); RMI (Man Whitney, $p=0,0062$)], mientras que al analizar los comportamientos de VR no se evidenciaron diferencias significativas entre tratamientos ($t=1,508$, $df=17$; $p=0,1499$) (Fig. 12B). En conjunto con los datos previos, esto sugiere que la administración de FLC en el C-BLA después del CMC afectó el proceso de consolidación de la memoria de miedo.

Cuando se evaluó la memoria 96 horas después del condicionamiento (día 5) (Test 2) los resultados del % Congelamiento (SAL: $37,9 \pm 8,6\%$; FLC: $30,22 \pm 7,8\%$), % VR (SAL: $34,8 \pm 8,6\%$; FLC: $23,0 \pm 6,1\%$) y del % RMI (SAL: $72,7 \pm 9,9\%$; FLC: $53,22 \pm 7,7\%$) indicaron que la disminución del aprendizaje del miedo en los animales con FLC se mantuvo en el tiempo evidenciándose en una disminución significativa de todos los comportamientos analizados en el día del test 2 [Congelamiento ($t=2,223$, $df=17$; $p=0,0401$); VR ($t=2,231$, $df=17$; $p=0,0394$); RMI (Man Whitney, $p=0,0005$)] (Fig. 12C).

Por último, los resultados obtenidos a partir de los índices de memoria 2 (Test 2/Pre-EI) del % Congelamiento (SAL: $3,1 \pm 1,8$; FLC: $2,25 \pm 0,8$), % VR (SAL: $3,0 \pm 1,9$; FLC: $2,01 \pm 0,7$) y % RMI (SAL: $2,7 \pm 1,0$; FLC: $2,01 \pm 0,7$) muestran resultados congruentes con los anteriores [Congelamiento (Man Whitney, $p= 0,0255$); VR ($t=2,231$, $df=17$; $p=0,0394$); RMI ($t=2,684$, $df=17$; $p=0,0157$)] (Fig. 12D).

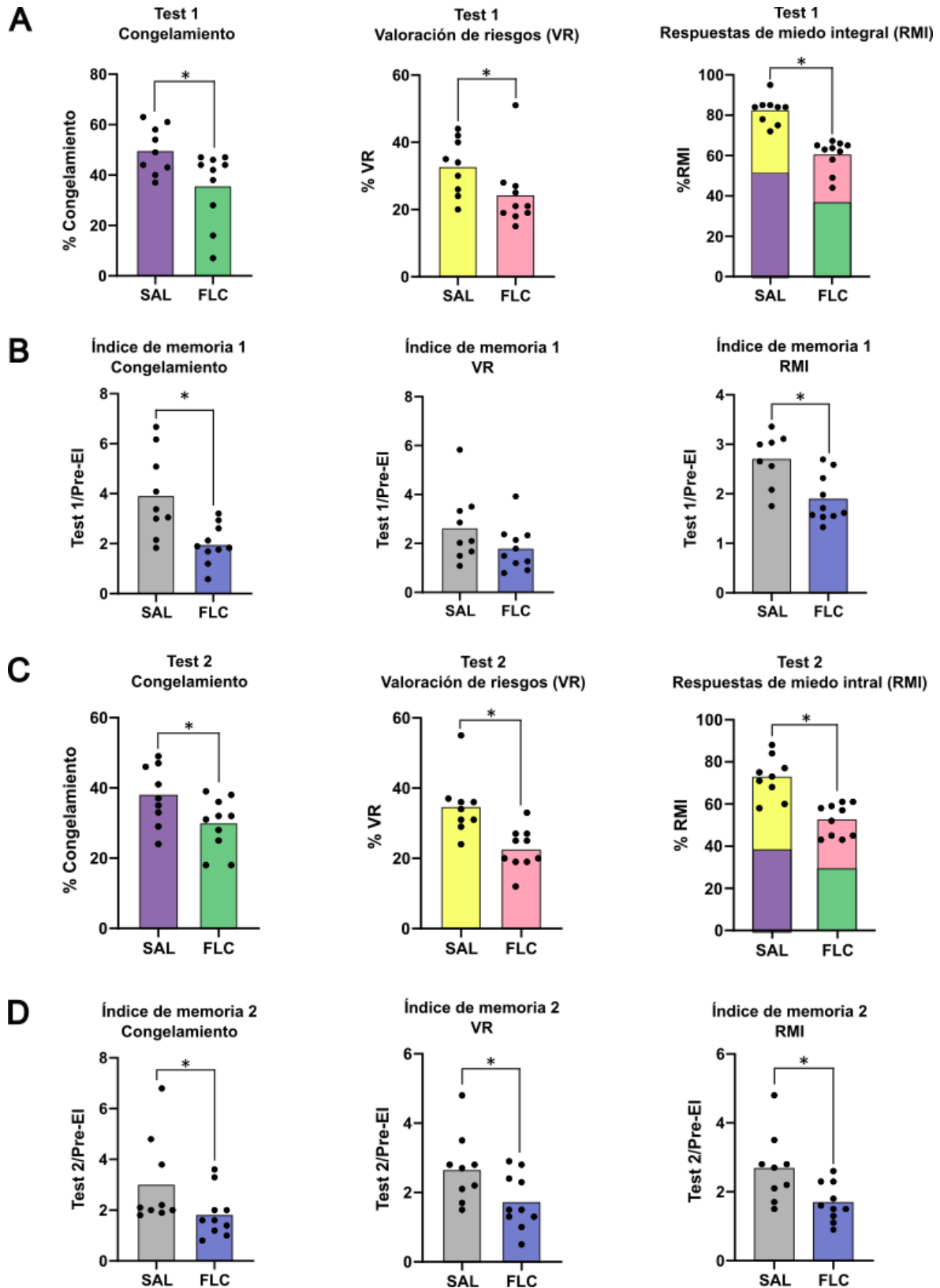


Fig. 12 - Evaluación de la administración de FLC posterior al CMC. A) *Test de memoria 1.* Se evidenciaron diferencias significativas entre tratamientos en cada uno de los porcentajes analizados [%Congelamiento ($t=2,491$, $df=17$; $p=0,0234$); %VR (Man Whitney, $p=0,0328$); y %RMI ($t=4,334$, $df=17$; $p=0,0005$)]. **B)** *Índice de memoria 1 (Test 1/Pre-EI).* Se observaron diferencias significativas entre tratamientos en los índices de memoria 1 del Congelamiento ($t=3,255$, $df=17$; $p=0,0047$) y del RMI (Man Whitney, $p=0,0062$). **C)** *Test de memoria 2.* Se observan diferencias significativas entre tratamientos en cada uno de los porcentajes analizados [%Congelamiento ($t=2,223$, $df=17$; $p=0,0401$); %VR ($t=3,601$, $df=17$; $p=0,0022$); y %RMI (Man Whitney, $p=0,0005$)]. **D)** *Índice de memoria 2 (Test 2/Pre-EI).* Se evidenciaron

diferencias significativas entre tratamientos en cada uno de los comportamientos analizados [Congelamiento (Man Whitney, $p=0,0255$); %VR ($t=2,231$, $df=17$; $p=0,0394$); %RMI ($t=2,684$, $df=17$; $p=0,0157$)]. Los datos se representan como la media y dispersión de los datos individuales. Se realizó un análisis estadístico mediante pruebas T paramétricas y no paramétricas (Man Whitney). * $p < 0,05$.

En conclusión, los resultados obtenidos en este experimento estarían sugiriendo que los astrocitos tendrían una participación importante en fases tempranas de la consolidación.

Experimento 3: Inmunofluorescencia con GFAP para evaluar la plasticidad astrocítica durante la fase de consolidación de la memoria.

Para investigar la plasticidad astrocítica durante la consolidación de la memoria contextual del miedo, se realizó una comparación morfológica entre los astrocitos de tres individuos condicionados (CS US) y tres individuos no condicionados (No CS US) y postulamos la hipótesis de que se observará una disminución en los niveles de GFAP en los astrocitos de la amígdala e hipocampo después del condicionamiento, asociada a una reducción en el número total de procesos y en el largo y complejidad celular.

Para comenzar, como en todos los experimentos, se corroboró que los individuos condicionados (CS-US) hayan recibido el shock, para esto se cuantificaron los % RMI luego de haber recibido la descarga (Fig. 14A) y se observó un aumento significativo del miedo entre el periodo Pre-EI y Post-EI ($t=2,389$, $df=10$; $p=0,0380$). Una hora después del condicionamiento se extrajeron los cerebros para proceder con la inmunohistoquímica. Se utilizaron anticuerpos anti-GFAP, los cuales marcan la GFAP citoesquelética en color verde, junto con el marcador DAPI, para la marcación de los núcleos celulares en azul. En el análisis, se obtuvieron fotografías Z-stack mediante microscopía confocal para realizar las comparaciones utilizando el software Image J/FIJI+SNT (Fig. 13A y B). Al investigar la intensidad de fluorescencia obtenida en la inmunomarcación sobre GFAP, no se observaron diferencias significativas en los niveles de intensidad entre ambas condiciones ($t=0,1700$, $df=4$; $p=0,8733$) (Fig. 14B).

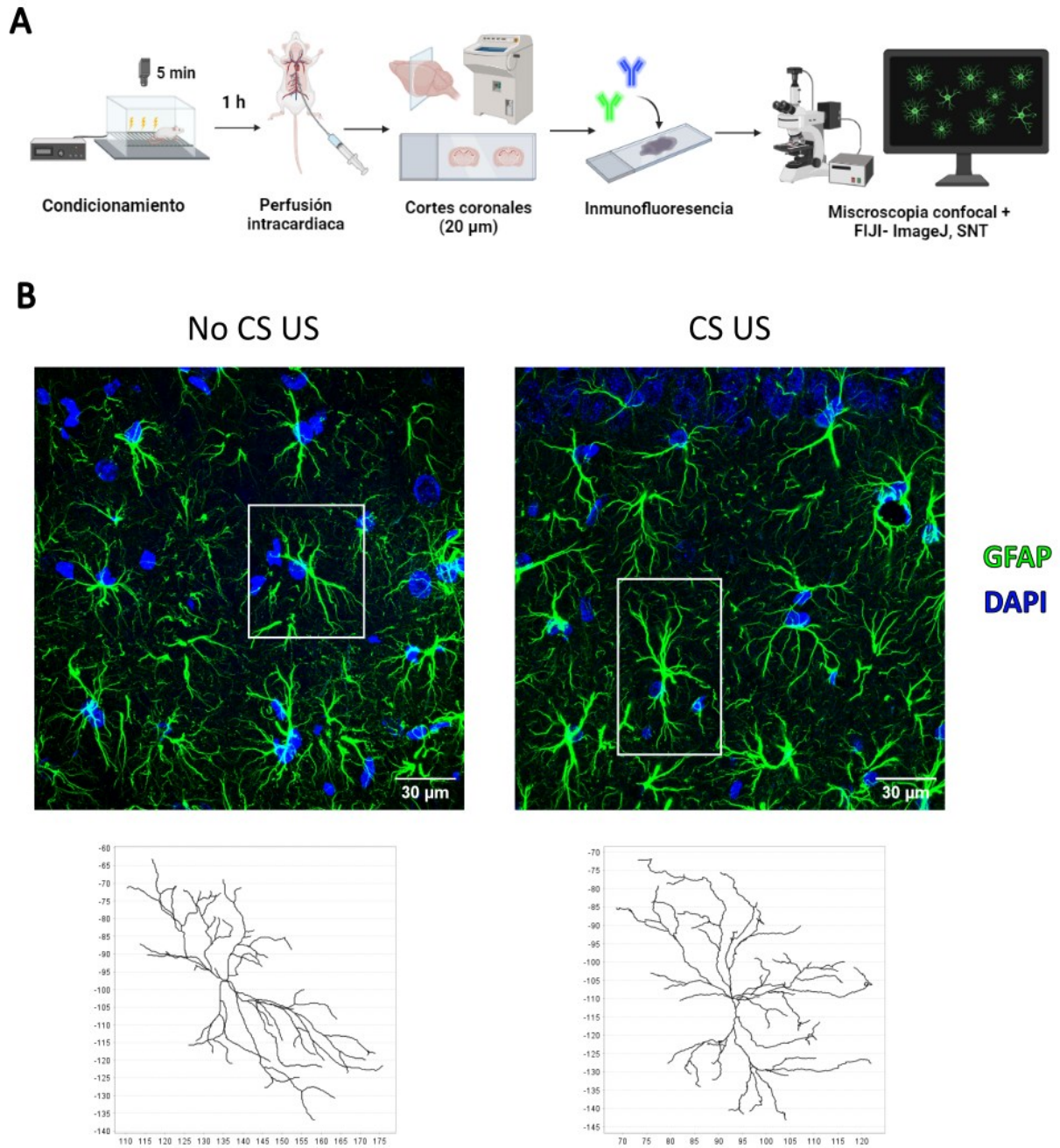


Fig. 13 – Expresión de GFAP en hipocampo luego del condicionamiento. A) Diseño experimental 3. B) Microfotografía en 60x de inmunomarcación astrocítica con antiGFAP-DAPI junto con una reconstrucción tridimensional de la morfología celular detallada obtenida a partir del SNT-Imagej en cada condición; *escala 30 μm* .

El programa utilizado permitió realizar un análisis preciso de la estructura celular de los astrocitos, midiendo la extensión de las células y sus procesos, y de la complejidad celular, a través del análisis de Sholl.

Al realizar la comparación estructural entre los astrocitos de los distintos tratamientos, los resultados del largo total celular (Fig. 14C), obtenidos a partir de una prueba

t anidada, evidenciaron un aumento significativo ($t=3,549$, $df=4$; $p=0,0238$) en los individuos CS US ($959\pm 240\mu\text{m}$) en relación con los No-CS US ($668\pm 168\mu\text{m}$). Del mismo modo, al analizar si hubo cambios en el número total de procesos entre células (Fig. 14E), los astrocitos de los individuos CS US ($58\pm 19\mu\text{m}$) aumentaron significativamente ($t=2,826$, $df=4$; $p=0,0475$) el número de procesos en relación con los No-CS US ($43\pm 12\mu\text{m}$). Al analizar la complejidad celular, a través del análisis de Sholl, los astrocitos de los individuos condicionados mostraron una mayor complejidad celular con respecto al control en las siguientes distancias desde el soma: $16\mu\text{m}$ ($q=0,0442$), $20\mu\text{m}$ ($q=0,0015$), $24\mu\text{m}$ ($q=0,0004$) y $28\mu\text{m}$ ($q=0,0010$) (Fig. 14D).

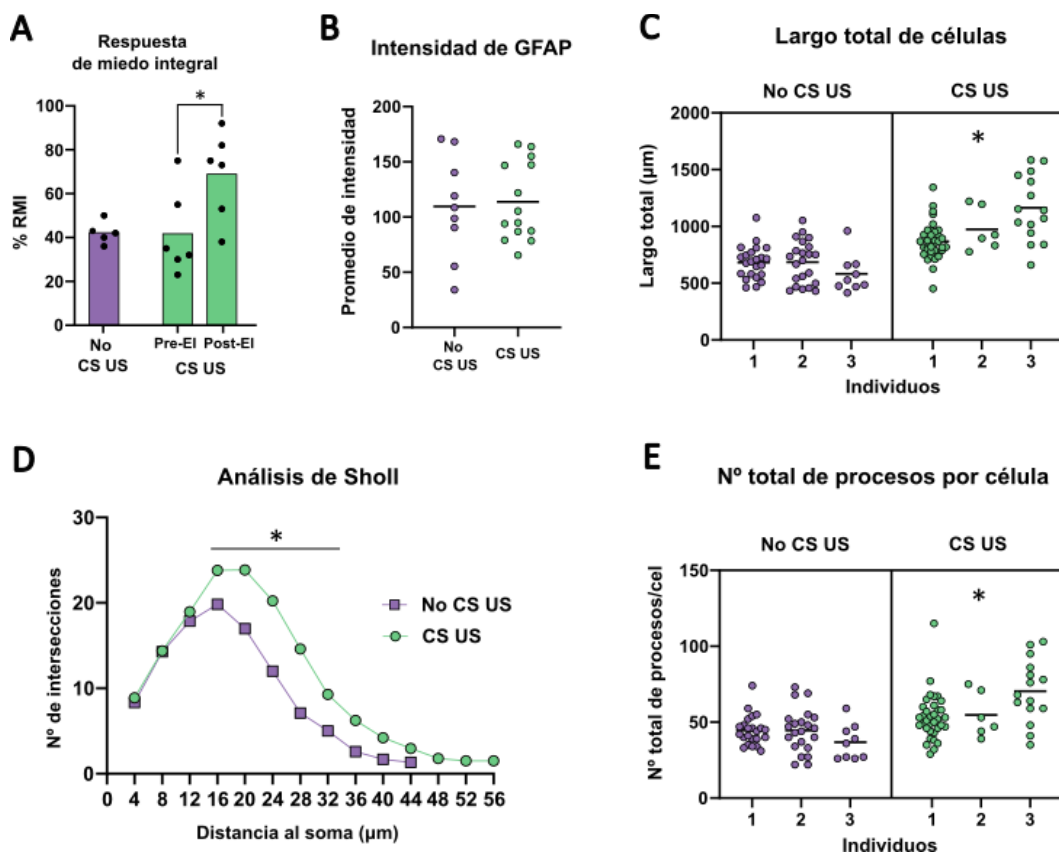


Fig. 14 - Evaluación de la plasticidad astrocítica durante la fase de consolidación de la memoria. **A)** Porcentaje de respuestas de miedo integral en individuos condicionados (CS US) y no condicionados (No-CS US). En los individuos CS-US se observó un aumento significativo del miedo en el periodo Post-EI con relación al Pre-EI ($t=2,389$, $df=10$; $p=0,0380$). No se observaron diferencias significativas en el %RMI basal entre los grupos. **B)** Intensidad de inmunomarcación del GFAP. No se observaron diferencias significativas en la intensidad entre los grupos ($t=0,1700$, $df=4$; $p=0,8733$). **C)** Largo total de células. Se observó un incremento significativo en el largo de los astrocitos de los individuos CS US con relación al control ($t=3,549$, $df=4$; $p=0,0238$). **D)** Análisis de Sholl. Los astrocitos de los individuos CS US evidenciaron una complejidad significativamente mayor a $16\mu\text{m}$ ($q=0,0442$), $20\mu\text{m}$ ($q=0,0015$), $24\mu\text{m}$ ($q=0,0004$) y $28\mu\text{m}$ ($q=0,0010$) desde el soma. **E)** Número total de procesos por célula. Los astrocitos de los individuos CS US evidenciaron un incremento significativo en el número de procesos en relación con los controles ($t=2,826$, $df=4$; $p=0,0475$). Los datos se representan como la media y dispersión de los datos individuales. Se realizó un análisis estadístico mediante pruebas T, pruebas T anidadas y modelos de efectos mixtos anidados con un FDR de 5%. * $p < 0,05$; * $q < 0,05$.

Discusión y conclusión

La identificación y comprensión de los procesos y componentes neurobiológicos involucrados en la formación de la memoria de miedo son fundamentales para entender la aparición de memorias desadaptativas que pueden desencadenar enfermedades psiquiátricas, como trastornos de ansiedad y trastorno de estrés postraumático (TEPT). A medida que se estudia más la participación de los astrocitos en este proceso, surgen evidencias que sugieren que la actividad astrocítica desempeña un papel crucial en la regulación sináptica y la plasticidad cerebral. En particular, actualmente existe un gran interés por comprender el papel de los astrocitos en el complejo basolateral de la amígdala (C-BLA) en las diferentes etapas de la formación de la memoria de miedo contextual. Explorar el papel de los astrocitos particularmente en este complejo junto con otras áreas podría brindarnos un mayor conocimiento sobre los mecanismos moleculares y celulares que regulan la memoria de miedo y servir como base para el desarrollo de intervenciones terapéuticas para los distintos trastornos, principalmente el TEPT.

Por lo tanto, el presente estudio fue diseñado para explorar diversas perspectivas sobre la participación de los astrocitos en el C-BLA en las diferentes etapas de la formación de la memoria del miedo. Las bases de nuestra investigación se cimentaron en estudios previos realizados en este instituto, distinguiéndose, entre otras cosas, por la incorporación de un análisis adicional sobre los comportamientos asociados al miedo.

En neurociencia, para estudiar el miedo, es común cuantificar la duración en la que un animal permanece en un estado de "congelamiento", un comportamiento muy frecuente que se estudia en asociación con estos trastornos. Inicialmente, nuestro estudio se centró en

analizar únicamente este comportamiento, ya que fue el que se utilizó en investigaciones anteriores. Sin embargo, luego de la experimentación y evaluación de los datos obtenidos en nuestros experimentos, los resultados preliminares resultaron sorprendentes. Al comparar el comportamiento de los animales control durante los test con aquellos de experimentos previos, en los que se utilizó exactamente el mismo protocolo, observamos que nuestros animales evidenciaban mucho menos % Congelamiento (media de 35%) en comparación con los anteriores (60%). Además, también manifestaron un mayor porcentaje de congelamiento en los estados basales (Pre-EI: 35% de media) que lo que se obtenía anteriormente (25%), y como resultado de esto, los valores control de los índices de aprendizaje (Test/Pre-EI) también son diferentes, con una media de 1, mientras que por lo general era común encontrar valores que rondan un índice de 2 (1,5-3), es decir, esperábamos que durante el test se duplique el congelamiento basal, mientras que nuestros datos indican que no hubo un incremento del miedo entre el estado basal y el día del test. Esto nos llevó a suponer que nuestros animales no formaron una memoria aprendida y que posiblemente el condicionamiento no funcionó correctamente, sin embargo, el análisis de reactividad al shock y el incremento del congelamiento en todos los grupos luego del EI nos permitió corroborar que no existió un efecto significativo de la droga per se en la percepción del estímulo, por lo que pudimos corroborar que los animales fueron condicionados. Por lo tanto, para tratar de determinar la causa de este cambio, decidimos realizar una serie de experimentos que consistieron en variar ciertos parámetros ambientales que podrían estar afectando a nuestros animales, tales como: intensidad de luz, familiaridad con el entorno y familiaridad con la manipulación. A pesar de estos esfuerzos, los animales control continuaron mostrando un perfil de bajo congelamiento en el test.

En función de esta problemática, exploramos la idea de estudiar algún comportamiento diferente al congelamiento que este asociado al miedo. Uno muy utilizado es el denominado “risk assessment” o “valoración de riesgos”, definido como un proceso que implica la detección y el análisis de una amenaza presente o potencial, así como de las características que podrían influir en la efectividad de diferentes comportamientos defensivos. Es decir, frente a una señal de peligro o peligro potencial, el animal cesa bruscamente sus comportamientos en curso y se orienta hacia la amenaza, utilizando todos sus sentidos para investigar este estímulo, esto le permite predecir con más precisión la probabilidad de éxito de cada estrategia defensiva disponible frente a una amenaza en particular. Esta evaluación no se limita a una respuesta instintiva, sino que es un proceso

complejo que considera la naturaleza de la amenaza como el contexto ambiental y que es fundamental para la supervivencia (Blanchard et al., 2011). Debido a la relevancia de este comportamiento de los animales frente a estímulos amenazantes, muchos autores optan por estudiarlo a través de distintos protocolos que analizan respuestas defensivas (Back & Carobrez, 2018; Holly, 2016; Viellard et al., 2016; Bittencourt et al., 2004). Es por esto que, en esta investigación, decidimos incluir la cuantificación de la valoración de riesgo (VR) y del congelamiento en un protocolo de condicionamiento de miedo contextual.

Nuestros resultados, derivados del análisis de ambos comportamientos (VR y congelamiento) en cada experimento, resaltaron la importancia de la inclusión de los mismos en las investigaciones del miedo, ya que los análisis individuales evidenciaron una variabilidad considerable. Los análisis de Pearson entre ellos revelaron una correlación negativa, con esta negatividad siendo más o menos pronunciada dependiendo del periodo de análisis. Por ejemplo, en los días del condicionamiento, al comparar los comportamientos durante el Pre-EI (Cong=27%; VR=16%) y Post-EI (Cong=67%; VR=17%), la correlación se hace negativa luego de la aparición del EI (ej. Pre-EI=-0,03; Post-EI=-0,38) donde la respuesta dominante que aumentó luego del EI fue el congelamiento y la VR disminuye. Esto tiene sentido, dado que el animal recibe directamente el EI y muestra rápidamente el congelamiento como respuesta. En el día del test 1, el grado de negatividad fue más marcado (-0,71), es decir, a mayor congelamiento, menor fue la VR y viceversa. Por lo tanto, para obtener una medida de miedo robusta y consistente que integre ambas respuestas defensivas, tuvimos en cuenta la RMI (respuesta de miedo integral, i.e. la suma de ambas) y sus índices como principal unidad de análisis.

Participación de los astrocitos en la adquisición y consolidación de la memoria de miedo.

Los estudios previos evidenciaron que los astrocitos serían críticos durante la fase de adquisición de la memoria del miedo cuando se administró FLC en el C-BLA previo a la sesión de aprendizaje. A partir de esto, surgió la pregunta de si este déficit de aprendizaje inducido podría ser revertido al coadministrar este fármaco con los gliotransmisores glutamato y d-serina. Los resultados que obtuvimos fueron algo controversiales. En un inicio, planteamos la hipótesis de que, en el test 1, los animales administrados con FLC-GLT formarían memoria y por lo tanto exhibirán respuestas de

miedo similares a los animales control SAL-SAL. Cuando analizamos el % RMI y el índice de memoria obtenidos el día del test 1, la hipótesis fue rechazada, ya que se observó que la administración de estos gliotransmisores no fueron capaces de revertir el déficit de memoria inducido por el FLC. Sin embargo, sorprendentemente, cuando analizamos los resultados obtenidos el día del test 2 y el índice de memoria 2, se observa que los animales administrados con FLC-GLT evidenciaron una mayor respuesta de miedo que aquellos administrados sólo con FLC, entonces pareciera que la hipótesis no se rechazaría.

¿Por qué observamos este perfil en el test 2 y no en el test 1? Es importante recordar que los animales de todos estos experimentos se caracterizaron por presentar altos niveles de miedo basal, previo al proceso de condicionamiento, lo cual probablemente obscurece la diferenciación de los comportamientos de miedo derivados del proceso de aprendizaje. También existe la posibilidad de que, por razones indeterminadas, la formación de la traza de la memoria durante el condicionamiento fuera débil, permaneciendo así durante la primera evocación en el test 1, y que luego haya ocurrido un fortalecimiento de esta durante la reconsolidación, ya que se ha observado que durante esta fase se puede fortalecer la formación y persistencia de la memoria (Forcato et al., 2014). Esto explicaría por qué el comportamiento defensivo es mayor en el test 2, permitiendo detectar más diferencias entre las distintas condiciones.

De todas formas, la conclusión más parsimoniosa que podemos sugerir es que al integrar otras medidas del comportamiento defensivo de la rata se confirmó nuevamente el efecto inhibitorio del fluorocitrato en la formación de la memoria. Sin embargo, esta inhibición no se vio contrarrestada por la coadministración de los gliotransmisores, posiblemente afectados por el FLC. Por lo tanto, estos experimentos sugieren que estos gliotransmisores no son suficientes para restaurar la adquisición y que otros mecanismos astrocíticos (a determinar) estarían participando en la formación de la memoria (ver discusión más abajo).

Cuando evaluamos la participación de los astrocitos durante la fase de consolidación, administrando el FLC 5 minutos después del CMC, los resultados revelaron una reducción significativa en la expresión del miedo el día del test 1. No obstante, en experimentos anteriores, cuando el FLC se administró 1 hora después del CMC, el fármaco no influyó en la memoria del miedo. Tomados en conjunto con experimentos previos, observamos un gradiente de efectos de deterioro de la memoria con el FLC en función del

tiempo de administración, siendo más robusto cuando se administró antes del CMC, menos eficiente pero significativo cuando se administró poco después del CMC y no efectivo cuando se administró 1 hora después en función del tiempo de administración. Este hallazgo sugiere la posible implicación de los astrocitos en etapas tempranas del proceso de consolidación de la memoria del miedo además de la adquisición.

Estas diferencias, sobre la efectividad del deterioro de la memoria en función del tiempo de administración del FLC, podrían atribuirse a que la administración del fármaco antes del condicionamiento afecta a dos procesos en los que están involucrados los astrocitos (adquisición y consolidación), generando un efecto aditivo. Se sabe que la droga tiene una ventana temporal de acción de al menos 12 horas, lo que dificulta intervenir selectivamente, por ejemplo, en la adquisición sin afectar también la fase de consolidación. Alternativamente, los astrocitos podrían estar involucrados en etapas muy tempranas de la consolidación, y que este período se ve afectado de manera más eficiente cuando se administra el fármaco una hora antes del condicionamiento. Para esta última interpretación, es importante tener en cuenta que la inhibición astrocítica no es inmediata luego de la administración, requiriendo al menos una hora para disminuir el metabolismo de manera significativa, es decir, que la administración luego del condicionamiento no estaría inhibiendo los astrocitos sino hasta una hora después.

Debido a los límites temporales difusos de la acción farmacológica, no podemos llegar a conclusiones taxativas respecto de un rol selectivo en la adquisición o consolidación de la memoria. No obstante, nuestros hallazgos presentes y pasados concuerdan y amplían las evidencias recientes utilizando diferentes enfoques, especies y protocolos (Liao et al., 2017; Lei et al., 2022; Linsambarth et al., 2022; Suthard et al., 2023).

Estudios *in vitro* han demostrado que los astrocitos en la amígdala e hipocampo regulan la plasticidad sináptica a partir de cambios morfológicos en las células (Lawal et al., 2022; Badia-Soteras, 2022; Ostroff, 2014). Para profundizar en el estudio de la participación de los astrocitos durante la formación de la memoria de miedo, nos centramos en estudiar los cambios en estas células a través de inmunohistoquímica, realizada 1 hora después del CMC, durante la fase de consolidación de la memoria. El análisis se restringió a la región CA1 del hipocampo debido a la limitada inmunomarcación obtenida en la amígdala. La causa de esta limitación sigue siendo incierta por lo que consideramos necesario desarrollar

un protocolo distinto y/o la utilización de otros anticuerpos para conseguir una correcta inmunomarcación de los astrocitos de la amígdala y avanzar en nuestra investigación.

En el experimento observamos que los astrocitos de CA1 evidenciaron cambios significativos en su morfología. Se observó un incremento en la longitud de procesos, número de procesos y en la complejidad celular durante la consolidación de la memoria en aquellos individuos sometidos al CMC. Estos hallazgos respaldan y fortalecen las observaciones previas obtenidas en esta investigación sobre la participación de los astrocitos en la adquisición y consolidación de la memoria. En concordancia a nuestros hallazgos, Choi et al. (2016) observó, por inmunomarcación con GFAP, que los astrocitos del giro dentado, una subregión del hipocampo estrechamente relacionada con CA1, incrementaron el número de procesos y su complejidad una hora después del CMC. Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que normalmente ocurre una retracción de los procesos astrocíticos en los sitios de sinapsis, lo que permite aumentar la excitabilidad neuronal en diferentes áreas del cerebro. Por ejemplo, en Badias-Soteras (2022) observaron, mediante microscopía electrónica (ME), una retracción transitoria de los procesos astrocíticos en las hendiduras sinápticas en CA1 del hipocampo de ratones, 30 minutos y 5 días después del CMC (1 shock de 0.7mA, 2s). No obstante, estas discrepancias con nuestros resultados podrían deberse a las diferencias metodológicas, ya que el análisis morfológico de los astrocitos por inmunomarcación con GFAP permite más que nada estudiar los procesos astrocíticos principales, mientras que la ME permite analizar los procesos finos que emanan de los principales, y que son los que se encuentran en asociación con la sinapsis neuronal. Por lo tanto, se debería estudiar a fondo si existe una correlación positiva o negativa en relación a los cambios morfológicos medidos con GFAP y los cambios en los procesos finos para corroborar esta retracción. A raíz de esto, podemos sugerir que los cambios morfológicos que observamos en los procesos principales se deben más que nada al incremento en la actividad metabólica de los astrocitos para estabilizar y mantener las sinapsis neuronales.

Por otra parte, para estudiar si se generan o no cambios en la densidad de GFAP durante la consolidación, medimos la intensidad de la inmunomarcación de la proteína entre animales condicionados y no condicionados. Nuestros resultados sugieren que la intensidad de GFAP no varía significativamente luego del condicionamiento. En contraposición a esto, muchos estudios, que evaluaron los niveles de GFAP en amígdala e hipocampo con otros protocolos y metodologías de análisis, sugieren una disminución de esta proteína luego del

condicionamiento. Por ejemplo, Saur et al. (2015) realizó una evaluación de la intensidad de la inmunorreactividad de GFAP por un análisis densitométrico en CA1 de ratas expuestas a un protocolo de estrés que implicaba un mayor tiempo de exposición al shock (1 descarga de 1mA durante 20s) y 7 días para la reexposición al contexto y evaluación del congelamiento. Los resultados revelaron una disminución del 25% en la densidad de GFAP. Estas diferencias podrían deberse por un lado a que en este estudio el tiempo de exposición al estímulo aversivo fue extremadamente largo, lo que generó un estrés prolongado además de un aprendizaje de miedo (se sabe que el estrés severo genera una disminución de GFAP; Bender et al., 2016). Por otro lado, otra diferencia fundamental serían los tiempos para la evaluación y el hecho de que en ese estudio evaluaron la memoria, lo que implica que los cambios pueden deberse a fenómenos ocurridos en la evocación/reconsolidación de la memoria. En otro estudio (Choi et al., 2016), el análisis densitométrico de inmunotransferencia para GFAP por Western Blot también evidenció una disminución significativa en los niveles de la proteína en los astrocitos de CA1. Es importante tener en cuenta que la medida de intensidad que empleamos nosotros para cuantificar indirectamente la densidad de GFAP puede no ser tan sensible como la utilizada en dicho estudio, por lo tanto, no es completamente pertinente comparar estos resultados. En este sentido, proponemos realizar en el futuro un análisis con Western Blot para una comparación más precisa y adecuada.

¿Cómo contribuyen los astrocitos a los mecanismos de adquisición/consolidación temprana de la memoria del miedo? Como venimos viendo, uno de los mecanismos que sugerimos es el desarrollo de cambios en la morfología de los astrocitos, es decir, la plasticidad astrocítica. Es bien sabido que los procesos finos de los astrocitos son muy dinámicos y se espera que la proximidad a las sinapsis afecte significativamente la actividad neuronal. Pudimos ver que en el hipocampo, durante la consolidación, los astrocitos cambian su conformación celular, aumentando su complejidad, largo y número de procesos y que esto probablemente se deba a su participación activa en la estabilización y mantenimiento de las sinapsis neuronales, por un lado brindando soporte metabólico a través de la liberación de lactato por los astrocitos, ya que es bien conocido que este mecanismo modula el suministro de energía para las neuronas, la excitabilidad, plasticidad y consolidación de la memoria (Magistretti & Allaman, 2018); y por otro lado, a través de la liberación de moléculas, por ejemplo, se ha visto que la concentración de glutamato y su liberación están altamente

reguladas por el recubrimiento astrocítico y por los transportadores GLT-1 y GLAST casi exclusivamente expresados por los astrocitos.

En conclusión, aunque persisten desafíos metodológicos, estos hallazgos subrayan la contribución esencial de los astrocitos en la adquisición/consolidación temprana de un CMC tanto en amígdala como en hipocampo, ofreciendo una visión integral de los mecanismos neurobiológicos subyacentes en este proceso, abriendo nuevas perspectivas para futuras investigaciones y posibles intervenciones terapéuticas.

Bibliografía

- AARTS E., M. VERHAGE, J. V. VEENVLIET, C. V. DOLAN, & S. VAN DER SLUIS (2014). A solution to dependency: using multilevel analysis to accommodate nested data. *Nature Neuroscience*, 17(4), 491–496.
- ADAMSKY A., A. KOL, T. KREISEL A. DORON, N. OZERI-ENGELHARD, T. MELCER, R. REFAELI, H. HORN, L. REGEV, M. GROYSMAN, M. LONDON, I. GOSHEN (2018) Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement. *Cell* 174:59-71e14.
- ALBERINI C. M. (2005). Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends in Neurosciences*, 28: 51–56.
- ARAQUE A., V. PARPURA, R. P. SANZGIRI & P. G. HAYDON (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences*, 22(5), 208–215.
- BACK F. P., & A. P. CAROBREZ (2018). Periaqueductal gray glutamatergic, cannabinoid and vanilloid receptor interplay in defensive behavior and aversive memory formation. *Neuropharmacology*, 135, 399–411.
- BADIA-SOTERAS A., T. S. HEISTEK, M. S. J. KATER, A. MAK, A. NEGREAN, M. C. VAN DEN OEVER, H. D. MANSVELDER, B. S. KHAKH, R. MIN, A. B. SMIT, M. H. G. VERHEIJEN (2022) Retraction of Astrocyte Leaflets from the Synapse Enhances Fear Memory. *Biol Psychiatry* Oct 29: S00.
- BALU D. T., K. T. PRESTI, C. C. Y. HUANG, K. MUSZYNSKI, I. RADZISHEVSKY, H. WOLOSKER, J. T. COYLE (2018). Serine Racemase and D-serine in the Amygdala Are Dynamically Involved in Fear Learning. *Biological Psychiatry*, 83(3), 273–283.

- BENDER C. L., X. SUN, W. YANG, C. DAVISON, M. MAROTEAUX, Y. HUANG, Y. ISHIKAWA, S. J. LIU (2020). Emotional Stress Induces Structural Plasticity in Bergmann Glial Cells via an AC5-CPEB3-GluA1 Pathway. *J Neurosci* 40(17):3374-3384.
- BENJAMINI Y. & Y. HOCHBERG (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57(1), 289-300.
- BIJANKI K. R., S. J. H. VAN ROOIJ, T. D. ELY (2020). Case series: unilateral amygdala ablation ameliorates post-traumatic stress disorder symptoms and biomarkers. *Neurosurg.*
- BINLEY K. E., W. S. NG, J. R. TRIBBLE, B. SONG & J. E. MORGAN (2014). Sholl analysis: A quantitative comparison of semi-automated methods. *Journal of Neuroscience Methods*, 225, 65–70.
- BITTENCOURT A. S., A. P. CAROBREZ, L. P. ZAMPROGNO, S. TUFIK, L. C. SCHENBERG (2004). Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience* 125, 71-89.
- BLANCHARD D. C., G. GRIEBEL, R. POBBE & R. J. BLANCHARD (2011). Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 35(4), 991–998.
- BLANCHARD R. J. & D. C. BLANCHARD (1989). Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *Journal of Comparative Psychology* 103, 70-82.
- BLANCHARD R. J. & D. C. BLANCHARD (1969). Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 68, 129-135.
- CHAAYA N., A. R. BATTLE & L. R. JOHNSON (2018). An update on contextual fear memory mechanisms: Transition between Amygdala and Hippocampus. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 92, 43–54.
- CHOIM., S. AHN, E. J. YANG, H. KIM, Y. H. CHONG & H. S. KIM (2016). Hippocampus-based contextual memory alters the morphological characteristics of astrocytes in the dentate gyrus. *Molecular Brain*, 9(1).
- COYLE J. T., D. BALU & H. WOLOSKER (2020). d-Serine, the Shape-Shifting NMDA Receptor Co-agonist. *Neurochemical Research*.
- EHRlich I., Y. HUMEAU, F. GRENIER, S. CIOCCHI, C. HERRY & A. LÜTHI (2009). Amygdala Inhibitory Circuits and the Control of Fear Memory. *Neuron*, 62(6), 757–771.

- FANSELOW M. S. & J. E. LEDOUX (1999). Why We Think Plasticity Underlying Pavlovian Fear Conditioning Occurs in the Basolateral Amygdala. *Neuron*, 23(2), 229-232.
- FANSELOW M. S. & L. S. LESTER (1988). A functional behavioristic approach to aversively motivated behavior: Predatory imminence as a determinant of the topography of defensive behavior. In R. C. Bolles & M. D. Beecher (Eds.), *Evolution and learning* (pp. 185–212).
- 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.
- FIORENZA NG, J. ROSA, I. IZQUIERDO & J. C. MYSKIW (2012). Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. *Behav Brain Res* 232:210–216.
- FLANDREAU E.I. & M. TOTH (2017). Animal Models of PTSD: A Critical Review. In: Vermetten, E., Baker, D.G., Risbrough, V.B. (eds) *Behavioral Neurobiology of PTSD. Current Topics in Behavioral Neurosciences*, vol 38.
- FOA E. B., R. ZINBARG & B. O. ROTHBAUM (1992). Uncontrollability and unpredictability in post-traumatic stress disorder: an animal model. *Psychol. Bull.* 112, 218–238. doi: 10.1037/0033-2909.112.2.218.
- FORCATO C., R. S. FERNÁNDEZ & M. E. PEDREIRA (2014). Strengthening a consolidated memory: The key role of the reconsolidation process. *Journal of Physiology-Paris*, 108(4-6), 323–333.
- GOTO A. (2022). Synaptic plasticity during systems memory consolidation. *Neuroscience research*, 183, 1–6.
- HASSEL B., R. E. PAULSEN, A. JOHNSEN & F. FONNUM (1992) Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain Res* 576:120–124.
- HENNEBERGER C., T. PAPOUIN, S. H. OLIET & D. A. RUSAKOV (2010) Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463, 232–236.
- HILGETAG C. C. & H. BARBAS (2009) Are there ten times more glia than neurons in the brain? *Brain Struct Funct* 213:365–366.

- HOLLY K. S., C. C. O. ORNDORFF & T. A. MURRAY (2016). MATSAP: An automated analysis of stretch-attend posture in rodent behavioral experiments. *Scientific Reports* | 6:31286.
- IZQUIERDOI., C. DA CUNHA, R. ROSAT, D. JERUSALINSKY, M. B. C. FERREIRA, J. H. MEDINA (1992) Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol* 58:16–26.
- JOHANSEN J. P., C. K. CAIN, L. E. OSTROFF & J. E. LEDOUX (2011). Molecular mechanisms of Fear Learning and Memory. *Cell*, 147(3), 509–524.
- JOVANOVIĆ T. & K. J. RESSLER (2010). How the Neurocircuitry and Genetics of Fear Inhibition May Inform Our Understanding of PTSD. *American Journal of Psychiatry*, 167(6), 648–662.
- LAWAL O., F. P. ULLOA SEVERINO & C. EROGLU (2022). The role of astrocyte structural plasticity in regulating neural circuit function and behavior. *Glia*, 70(8), 1467–1483.
- LE BAIL M., M. MARTINEAU, S. SACCHI, N. YATSENKO, I. RADZISHEVSKY, S. CONROD, S. J. P. MOTHET (2014). Identity of the NMDA receptor coagonist is synapse specific and developmentally regulated in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(2), E204–E213.
- LEI Z., L. XIE, C. H. LI, Y. Y. LAM, A. S. RAMKRISHNAN, Z. FU, X. ZENG, S. LIU, Z. IQBAL & Y. LI (2022). Chemogenetic Activation of Astrocytes in the Basolateral Amygdala Contributes to Fear Memory Formation by Modulating the Amygdala-Prefrontal Cortex Communication. *International journal of molecular sciences*, 23(11), 6092.
- LI Y., L. LI, J. WU, Z. ZHU, X. FENG, L. QIN, Y. ZHU, L. SUN, Y. LIU, Z. QIU, S. DUAN, Y. Q. YU (2020). Activation of astrocytes in hippocampus decreases fear memory through adenosine A1 receptors. *eLife*, 9, e57155.
- LIAO Z., Y. TAO, X. GUO, D. CHENG, F. WANG, X. LIU, L. MA (2017). Fear Conditioning Downregulates Rac1 Activity in the Basolateral Amygdala Astrocytes to Facilitate the Formation of Fear Memory. *Front Mol Neurosci* 10:1–13.
- LINSAMBARTH S., F. J. CARVAJAL, R. MORAGA-AMARO, L. MENDEZ, G. TAMBURINI, I. JIMENEZ, D. A. VERDUGO, G. I. GÓMEZ, N. JURY, P. MARTÍNEZ, B. VAN ZUNDERT, L. VARELA-NALLAR, M. A. RETAMAL, C. MARTIN, G. A. ALTENBERG, M. C. FIORI, W. CERPA, J. A. ORELLANA, A. SCHOUSBOE, L. K. BAK, H. S. WAAGEPETERSEN (2013). Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. *Frontiers in endocrinology*, 4, 102.
- LINSAMBARTH S., F. J. CARVAJAL, R. MORAGA-AMARO, L. MENDEZ, G. TAMBURINI, I. JIMENEZ, D. A. VERDUGO, G. I. GOMEZ, N. JURY, P. MARTINEZ, B. VAN

ZUNDERT, L. VARELA-NALLAR, M. A. RETAMAL, C. MARTIN, G. A. ALTENBERG, M. C. FIORI, W. CERPA, J. A. ORELLANA & J. STEHBERG (2022). Astroglial gliotransmitters released via Cx43 hemichannels regulate NMDAR-dependent transmission and short-term fear memory in the basolateral amygdala. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 36(2), e22134.

MAGISTRETTI P. J. & I. ALLAMAN (2018). Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(4), 235–249.

MILAD M. R., R. K. PITMAN, C. B. ELLIS, A. L. GOLD, L. M. SHIN, N. B. LASKO, N., S. L. RAUCH (2009). Neurobiological Basis of Failure to Recall Extinction Memory in Posttraumatic Stress Disorder. *Biological Psychiatry*, 66(12), 1075–1082.

MIRANDA M. I., G. FERREIRA, L. RAMIREZ-LUGO, F. BERMÚDEZ-RATTONI (2002) Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11417–11422.

NADER K., G. E. SCHAFE & J. E. LE DOUX (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406: 722–726.

PARPURA V., E. SCAMES & D. C. SPRAY (2004) Mechanisms of glutamate release from astrocytes: gap junction “hemichannels”, purinergic receptors and exocytotic release. *Neurochem Int.* 45, 259–264

PAXINOS G. & C. WATSON (2017). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Compact*. Elsevier Gezondheidszorg.

RICHTER-LEVIN G., O. STORK & M. V. SCHMIDT (2019). Animal models of PTSD: a challenge to be met. *Mol Psychiatry* 24, 1135–1156.

ROSEN J. B. & J. SCHULKIN (2022) Hyperexcitability: From Normal Fear to Pathological Anxiety and Trauma. *Front Syst Neurosci* 16:1–21.

SAUR L., P. P. BAPTISTA, P. B. BAGATINI, L. T. NEVES, R. M. DE OLIVERA, S. P. VAZ, K. FERREIRA, S. A. MACHADO, R. G. MESTRINER & L. L. XAVIER (2016). Experimental Post-traumatic Stress Disorder Decreases Astrocyte Density and Changes Astrocytic Polarity in the CA1 Hippocampus of Male Rats. *Neurochemical research*, 41(4), 892–904.

SCHAFE G. E., K. NADER, H. T. BLAIR & J. E. LEDOUX (2001). Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective, *Trends in Neurosciences*, Volume 24, Issue 9, Pages 540-546.

- SCHAFE G. E., K. NADER, H. T. BLAIR & J. E. LEDOUX (2001). Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends in neurosciences*, 24(9), 540–546.
- SCHIELZETH H. & S. NAKAGAWA (2012). Nested by design: model fitting and interpretation in a mixed model era. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(1), 14–24.
- SHARP B. (2017). Basolateral amygdala and stress-induced hyperexcitability affect motivated behaviors and addiction. *Transl Psychiatry* 7, e1194.
- SHOLL D. A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *Journal of anatomy*, 87(4), 387–406.
- SHUMYATSKY G.P., G. MALLERET, R. M. SHIN, S. TAKIZAWA, K. TULLY, E. TSVETKOV, S. S. ZAKHARENKO, J. JOSEPH, S. VRONSKAYA, D. Q. YIN, U. K. SCHUBART, E. R. KANDEL, V. Y. BOLSHAKOV (2005). Stathmin, a gene enriched in the amygdala, controls both learned and innate fear. *Cell* 123:697– 709.
- STEHBERG J. (2022). Astroglial gliotransmitters released via Cx43 hemichannels regulate NMDAR-dependent transmission and short-term fear memory in the basolateral amygdala. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 36(2), e22134.
- STEHBERG J., R. MORAGA-AMARO, C. SALAZAR, A. BECERRA, C. ECHEVERRÍA, J. A. ORELLANA, G. BULTYNCK, R. PONSARTS, L. LEYBAERT, F. SIMON, J. C. SÁEZ & M. A. RETAMAL (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.
- STEVENS J. S., T. JOVANOVIĆ, N. FANI, T. D. ELY, E. M. GLOVER, B. BRADLEY, & K. J. RESSLER (2013). Disrupted amygdala-prefrontal functional connectivity in civilian women with posttraumatic stress disorder. *Journal of Psychiatric Research*, 47(10), 1469–1478.
- SUTHARD R. L., R. A. SENNE, M. D. BUZHARSKY, A. Y. PYO, K. E. DORST, A. H. DIEP, R. H. COLE & S. RAMIREZ (2023). Basolateral Amygdala Astrocytes Are Engaged by the Acquisition and Expression of a Contextual Fear Memory. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 43(27), 4997–5013.
- SUZUKI A., S. A. STERN, O. BOZDAGI, G. W. HUNTLEY, R. H. WALKER, P. J. MAGISTRETTI & C. M. ALBERINI (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*, 144(5), 810–823.

- TAVARES G., M. MARTINS, J. CORREIA, V. SARDINHA, S. GUERRA-GOMES, S. DAS NEVES, F. MARQUES, N. SOUSA, J. OLIVEIRA (2016). Employing an open-source tool to assess astrocyte tridimensional structure. *Brain Structure and Function* 222:1989-1999.
- TOVOTE P., J. P. FADOK & A. LÜTHI, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(6), 317–331.
- VIELLARD J., M. V. C. BALDO & N. S. CANTERAS (2016). Testing conditions in shock-based contextual fear conditioning influence both the behavioral responses and the activation of circuits potentially involved in contextual avoidance. *Behavioural Brain Research*, 315, 123–129.
- VOLOBOUEVA L. A., S. W. SUH, R. A. SWANSON & R. G. GIFFARD (2007). Inhibition of mitochondrial function in astrocytes: implications for neuroprotection. *Journal of neurochemistry*, 102(4), 1383–1394.
- WILSON M. D., S. SETHI, P. J. LEIN, & K. P. KEIL (2017). Valid statistical approaches for analyzing sholl data: Mixed effects versus simple linear models. *Journal of Neuroscience Methods*, 279, 33–43.
- WOLOSKER H & D. T. BALU (2020). d-Serine as the gatekeeper of NMDA receptor activity: implications for the pharmacologic management of anxiety disorders. *Translational Psychiatry*, 10(1).
- WOLOSKER H., D. T. BALU & J. T. COYLE (2016). The Rise and Fall of the d-Serine-Mediated Gliotransmission Hypothesis. *Trends in Neurosciences*, 39(11), 712–721.