



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Biblioteca Digital FCEN-UBA

Participación de factores de transcripción de la familia Rel/NF-kappa B en procesos de plasticidad y memoria

Freudenthal, Ramiro A.M.
2006

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

www.digital.bl.fcen.uba.ar

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

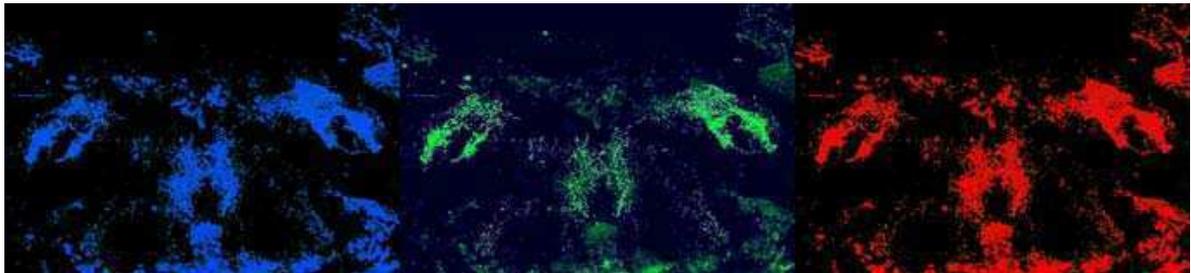
Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Participación de factores de transcripción de
la familia Rel/NF-kappa B en procesos de
plasticidad y memoria.

Tesis para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas



Autor: Lic. Ramiro Freudenthal
Director: Dr. Arturo G. Romano
Laboratorio de Neurobiología de la Memoria
Departamento de Fisiología, Biología
Molecular y Celular

Agosto de 2006

Resumen

La memoria de largo término y la plasticidad neuronal comparten varias características, incluyendo las fases temporales de mecanismos celulares y moleculares: la inducción requiere de un aumento de calcio intracelular, la persistencia temprana depende de la activación de quinasas y las etapas tardías necesitan de transcripción génica y de la síntesis de proteínas. Desde los primeros experimentos en los cuales se logro amnesia inhibiendo la síntesis proteica, se especula acerca de la función de factores de transcripción (FT) específicos, en la regulación de la expresión génica necesaria para la perdurabilidad tanto de fenómenos mnésicos como de la plasticidad neuronal.

Este trabajo se concentro en dos aspectos de la función del FT NF-kappa B en la consolidación de la memoria de largo término y la plasticidad neuronal. El primer aspecto se refiere a la activación del FT luego de inducidos estos fenómenos, y el segundo a la conservación evolutiva de la función de esta vía de transducción desde crustáceos a mamíferos. Para los propósitos de este trabajo se evaluó la activación de este FT en tres modelos: la consolidación de la memoria de largo termina (MLT) en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*, un paradigma evitación inhibitoria en ratón y la inducción de potenciación de largo término *in vivo* de la vía perforante del hipocampo de ratón.

La presencia de la vía de regulación transcripcional Rel/NF-kappa B, se determinó en el cangrejo por retardo electroforético (EMSA), Western Blot, inmunoprecipitación, unión covalente con irradiación ultravioleta e inmunohistoquímica.

En el cangrejo, un protocolo que induce una MLT es seguido por una activación bifásica de unión al ADN por parte del NF-kappa B, mientras que un protocolo que induce una memoria de corto término no activa al FT. NF-kappa B se encuentra presente en las terminales sinápticas, en donde es activado por protocolos de entrenamiento que inducen MLT.

El curso temporal de la activación de NF-kappa B nuclear en hipocampo, se estudió por EMSA, después del entrenamiento de un ensayo, en el paradigma de evitación inhibitoria en ratón. Mostrando, cuando se lo comparo con los animales naive, una inhibición del FT luego de 15 min. del entrenamiento seguida por una activación a los 45 min. tanto en los animales que sufrieron un shock eléctrico, como en los que fueron expuestos al contexto sin shock. En esta misma línea argumental, encontramos que la inyección intra cerebro ventricular (icv) de sulfasalazina inmediatamente post-entrenamiento impide la formación de la memoria de largo término. Más aún, una segunda estrategia independiente para inhibir el NF-kappa B en el cerebro, la administración icv de un oligonucleótido doble cadena de ADN conteniendo la secuencia consenso de NF-kappa B (kB Decoy) también resulta amnésica.

Cuando se estudian los EMSAs de extractos nucleares de hipocampo de ratón, se observa que animales tetanizados (protocolo inductor de potenciación de largo término) muestran, luego de 15 min. un aumento en la actividad de unión al ADN, cuando son comparados con, animales estimulados a baja frecuencia (EBF) y animales naive. Los hipocampos al ser analizados por inmunohistoquímica con un anticuerpo contra la forma activa del factor, muestran la misma tendencia general pero con patrones celulares de activación más complejos.

Estos resultados indican, primero que la actividad de unión al ADN del NF-kappa B es necesaria para la consolidación de memorias de largo término. Y el tratamiento con inhibidores específicos de NF-kappa B, suficiente para generar amnesia en los animales inyectados. A la vez que muestra un patrón temporal claramente delimitado en el cual el factor es necesario para la consolidación.

Igualmente significativa es la activación del FT luego de inducida la plasticidad neuronal, mostrando un papel en el proceso de potenciación.

El segundo aspecto de este trabajo sugiere que la vía de transducción señales de NF-kappa B se encuentra conservada, en su función fisiológica en el sistema nervioso, entre invertebrados y vertebrados.

Abstract.

Long term memory and neural plasticity share several characteristics, including the temporal phases of molecular and cellular mechanisms: the induction requires an increment on intracellular calcium, early persistence depends on the activation of kinases and the late steps need gene expression and protein synthesis. Since the first experiments in which amnesia was produced by protein synthesis inhibition, it has been speculation about the role of specific transcription factors (TF) in the regulation of the gene expression needed for the lasting of mnemonic processes such as neural plasticity.

This thesis concentrates on two aspects of the function of TF NF-kappa B during long term memory consolidation and neuronal plasticity. The first, concerns its activation after the induction of these phenomena, and the second concerns the evolutionary conservation of this signaling pathway from crustaceans to mammals. For the purpose of this thesis, the activation of NF-kappa B was evaluated in three models: long term memory (LTM) consolidation in the crab *Chasmagnathus granulatus*, inhibitory avoidance in mice and the induction of *in vivo* long term potentiation, of the hippocampal perforant pathway in mice.

The presence of the Rel/NF-kappa B transcriptional regulatory pathway in *Chasmagnathus* was studied by Electromobility Shift Assay (EMSA), Western Blot, Immunoprecipitation, Ultraviolet Crosslinking and Immunohistochemistry.

In the crab, a protocol that induced LTM, is followed by a bifasic activation of the DNA binding activity of the TF, while a protocol that induces short term memory does not activate NF-kappa B. This TF is present at the synaptic terminals, where it is activated by the LTM inducing training protocols.

The temporal course of nuclear NF-kappa B activation in mice hippocampus, was studied by EMSA, after the one trial inhibitory avoidance training. Showing, when compared with naive animals, an inhibition 15 min. after training, followed by activation after 45 min., both in the animals that received shock and the ones only exposed to the context. In the same line of evidence, animals injected intra cerebro ventricular (icv) with sulfasalazine (an inhibitor of NF-kappa B activation) immediately after training impede the formation of LTM. What is more, an independent and more specific form of NF-kappa B inhibition, the icv injection of a double stranded DNA containing the TF consensus sequence (kB decoy), results amnesic.

When we studied EMSAs of hippocampal nuclear extracts, tetanized mice (a protocol that induces potentiation) shows, 15 min after, an augment in DNA binding activity, in contrast with low frequency stimulated and naive mice. Immunohistochemical analysis with an antibody against the active form of the transcription factor, showed the same tendency but with a more complicated cellular pattern of activation within the hippocampal structure.

These results indicate, first that the DNA binding activity of the TF is necessary for LTM and that the treatment with NF-kappa B specific inhibitors is sufficient to generate amnesia in the injected animals. At the same time it shows that a clear temporal pattern of activation is needed for consolidation.

Equally significant is the activation of TF after the induction of neural plasticity, showing a role in this process.

The second aspect suggested by this work, is that the Rel/NF-kappa B pathway is conserved in its physiological function between invertebrates and vertebrates.

Índice

	Página
Introducción general	1
Aprendizaje y Memoria	2
Fases de memoria y criterios de clasificación	3
Memorias de corto y largo término	4
La formación diferencial de memorias de corto, intermedio o largo término	5
Procesos que sustentan los distintos tipos de memoria	6
Plasticidad sináptica y memoria	8
Memoria de largo término y transcripción	9
NF-kappa B	11
La vía de transducción de señales Rel/NF-kappa B	11
La actividad de NF-kappa B es regulada por la interacción con la proteína inhibitoria IkappaB	14
NF-kappa B en el sistema nervioso central	17
Distribución en el cerebro	17
Funciones conocidas del NF-kappa B en el sistema nervioso	18
En respuesta a agresiones	19
Isquemia	19
Daño exitotóxico	19
Trauma	19
Apoptosis	20
NF-kappa B en enfermedades neurodegenerativas	20
NF-kappa B en crecimiento y desarrollo neuronal	21
NF-kappa B en modelos de plasticidad sináptica	21
NF-kappa B en memoria	21
En invertebrados	21
En vertebrados	22
<i>Chasmagnathus</i> como modelo	23
Anatomía del sistema nervioso central de los decápodos	23
El ganglio supraesofágico	26
Paradigma de aprendizaje y memoria	26

Presencia y activación del NF-kappa B en la consolidación de la memoria de largo término en <i>Chasmagnathus</i>	31
Modelo de memoria en ratón	33
Hipótesis y objetivos	35
Capítulo 1	37
Caracterización de NF-kappa B en <i>Chasmagnathus</i>	38
Introducción	38
Resultados	39
Caracterización del retardo electroforético para NF-kappa B de extractos proteicos provenientes del sistema nervioso del cangrejo <i>Chasmagnathus</i>	43
Caracterización de la vía de señalización del NF-kappa B	43
Caracterización inmunohistoquímica de la localización de NF-kappa B activo en el sistema nervioso de <i>Chasmagnathus</i>	45
Discusión	51
Capítulo 2	54
Participación del factor de transcripción NF-kappa B en la memoria de largo término en <i>Chasmagnathus</i>	55
Introducción	55
Resultados	56
Determinación de las condiciones de entrenamiento que no inducen memoria de largo término	57
El aumento de la actividad nuclear de NF-kappa B no se observa luego del entrenamiento masivo	57
La activación de NF-kappa B se correlaciona con el número de ensayos espaciados necesarios para formar una memoria de largo término	57
Curso temporal de la actividad de NF-kappa B luego de un entrenamiento espaciado	60
Un entrenamiento espaciado aumenta la actividad de unión al ADN del FT	
NF-kappa B tanto en extractos nucleares como en extractos sinaptosomales	62
Discusión	66
Capítulo 3	70

Participación del NF-kappa B en la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria en ratón	70
Introducción	71
Resultados	72
El inhibidor de NF-kappa B, sulfasalazina impide la formación de la memoria de largo término	74
El inhibidor de la ciclooxigenasa (COX), indometacina, no induce amnesia	75
La inhibición de NF-kappa B por kB decoy impide la formación de la memoria de largo término	75
Curso temporal de la activación de NF-kappa b en el hipocampo durante la consolidación de la memoria	78
Discusión	80
Capítulo 4	85
Activación de NF-kappa B después de la inducción <i>in vivo</i> de la potenciación de largo término	85
Introducción	86
Resultados	87
NF-kappa B se activa en la formación hipocampal luego de la estimulación de alta frecuencia de la vía perforante	90
Localización de la activación de NF-kappa B en la formación hipocampal luego de la inducción de LTP	92
Discusión	93
Conclusiones generales	97
Características de la vía Rel/NF-kappa B en el sistema nervioso.	99
NF-kappa B en Chasmagnathus	99
NF-kappa B en el hipocampo de ratón.	102
Materiales y métodos	106
Capítulos 1 y 2	106
Animales, procedencia y mantenimiento	106
Animales	106
Lugar de captura	106
Mantenimiento de los animales	106
Comportamiento y medición	107

La respuesta de escape	108
Estimulación y registro de la respuesta de escape	108
Ensayo de estimulación	108
Procedimientos de entrenamiento y evaluación	109
Criterio de selección de los animales	109
Protocolo de entrenamiento espaciado	109
Protocolo de entrenamiento masivo y continuo	110
Evaluación de la retención	111
Definiciones	111
Extractos proteicos y determinación de la actividad de unión al ADN	112
Estimación de la actividad relativa de NF-kappa B	114
UV crosslinking	114
Inmunoprecipitación	114
Western Blot	115
Inmunohistoquímica	115
Montado de cerebro entero	115
Secciones	116
Capítulo 3	116
Animales	116
Dispositivo y procedimientos comportamentales	117
Inyecciones i.c.v.	118
Extracción de proteínas y determinación de la actividad de unión al ADN	120
Grupos experimentales	121
Drogas	122
Análisis de datos	122
Capítulo 4	123
Animales	123
Electrofisiología	124
Extracción de proteínas y determinación de la actividad de unión al ADN	124
Inmunohistoquímica	125
Discusión y Conclusiones generales	126

Conservación funcional de NF-kappa B entre crustáceos y mamíferos	127
Características de la vía Rel/NF-kappa B en el sistema nervioso	128
NF-kappa B en <i>Chasmagnathus</i>	128
NF-kappa B en el hipocampo de ratón	131
Uso similar de las funciones fisiológicas de NF-kappa B, en Crustáceos y Mamíferos	132
Similitud temporal de activación	132
Farmacología similar	132
NF-kappa B y crecimiento neurítico	133
Dinámica de activación de NF-kappa B	133
Efectores de NF-kappa B posiblemente involucrados en la formación y expresión de la memoria	134
Referencias	136

Introducción general

Aprendizaje y Memoria

En el medio ambiente, los estímulos percibidos tienden a ser recurrentes, escasas veces en forma idéntica, pero muy frecuentemente en forma similar para los sentidos, en alguna categoría, ya sea cantidad, cualidad, relación o modalidad, o tal vez mas frecuentemente en la combinación de categorías (Kant I., 1781). Por esta razón, es altamente adaptativo poder predecir con alguna probabilidad de acierto el futuro, para poder modificar el comportamiento, de manera de obtener de una secuencia de eventos con desenlace previsible, la mayor ventaja o la menor desventaja posibles.

Si postulamos un caso extremo, en el cual un ser vivo experimenta una situación que amenaza con finalizar su vida y logra superarla adquiriendo la información útil para poder evitarla, nos queda evidenciado el valor adaptativo de la memoria. La única forma de poder predecir el futuro, es almacenar información referente al pasado, procesarla y usarla como predictora en circunstancias similares. En términos coloquiales cuando nos referimos a la memoria incluimos dentro de este concepto a varios procesos diferenciables, de los que hablaremos luego (adquisición, consolidación, retención, evocación y olvido) y que son parte de la memoria. Por eso es muy importante definirla en términos biológicos, con el objetivo de precisar nuestro objeto de trabajo.

Formalmente, la memoria es un cambio durable del comportamiento o del potencial de comportamiento, que resulta de la experiencia del individuo. Al acto de inducir estos cambios durables se lo llama aprendizaje. De esta definición de memoria se desprende el hecho de que este concepto agrupa dentro de si más de un aspecto del uso de esa información, ya que el procesamiento, la retención de estos cambios y el acto de reactivar la representación de esa información (evocación) son parte de la memoria (Dudai, 2002).

Fases de memoria y criterios de clasificación.

La memoria pasa por distintos estados o fases, entre los cuales se incluyen: **adquisición, consolidación, retención, evocación, reconsolidación y olvido**. Los estadios por los que ha de pasar cada memoria están determinados, en gran parte,

por el tipo de información que la compone y el uso que se le va a dar a esa información. Lo que sucede en cada una de estas fases a su vez, cambia las características de la memoria y su duración. La adquisición, es el estadio en que la información proveniente de una experiencia es analizada y relacionada. Analizada respecto de sus características e importancia relativa al sujeto y relacionada con los elementos propios del episodio (contexto) y con la información previamente almacenada. Para la adquisición es muy importante el estado interno del sujeto (Ej.: estado motivacional). La consolidación es la ventana temporal en la cual la memoria recién adquirida pasa a una forma más estable y no plausible de interrupción. Esta tesis se centra en procesos celulares de plasticidad que suceden durante la consolidación. La retención es el término con el que nos referimos a los mecanismos y lugares involucrados en la persistencia de las memorias ya consolidadas. Evocación, reconsolidación, extinción y olvido, parecen incluir dentro de cada una, más de un proceso, y lo que se sabe acerca de ellas se encuentra en constante revisión. Por esto último, solo diremos de la evocación, que es difícil separarla de otros procesos, ya que una vez afectada, no se tiene más acceso a la información.

Estudios en humanos han permitido identificar inicialmente la existencia de dos categorías de memorias con distintas propiedades y características de procesamiento (Squire, 1987): La memoria **explícita** o **declarativa**: es una forma de memoria consciente por la que se recuerdan personas, lugares, eventos,.. etc. Esta forma de memoria está principalmente bien desarrollada en mamíferos y su existencia nos resulta evidente en humanos, ya que es la memoria que evocamos para referirnos y ser conscientes de episodios del pasado.

La complejidad de los procesos declarativos ha llevado tradicionalmente desde un punto de vista humano a denominarlos como procesos de orden superior, y ha conducido a subestimar el poder y la riqueza de otras formas de memoria **no declarativas** o **implícitas** (Menzel, 2001). Estas son memorias de las cuales no somos conscientes hasta que se evidencian por ejemplo por la presencia de habilidades motoras adquiridas. La memoria no declarativa comprende formas de memoria **asociativa**, en las que el animal aprende la relación entre dos estímulos en el caso de un condicionamiento clásico, o entre un estímulo y un comportamiento en el caso de un condicionamiento operante; y memorias **no asociativas** como son la sensibilización y la habituación en las que el animal aprende las propiedades de un

único estímulo aumentando o disminuyendo respectivamente la respuesta ante ellos. La adquisición de la memoria no declarativa puede ocurrir sin ser conscientes de ello. En general son adquiridas por repetición y se evidencian de manera automática sin un proceso deliberado de evocación.

Memorias de corto y largo término.

Las memorias pueden durar desde segundos a días o una vida entera dependiendo de la relevancia de la información que codifican y de la fuerza de la experiencia que les dio origen. Así, una experiencia que será recordada por un tiempo largo, desencadena una secuencia de fases transientes y estables de memoria que cubren desde el momento inmediato a la adquisición y etapas intermedias hasta finalmente memorias estables o de largo término (Menzel, 1999). La existencia de al menos dos y tres fases de memoria con dinámicas temporales propias ha sido comprobada para distintas especies como ser la abeja *Apis mellifera* (Hammer y Menzel, 1995a), *Drosophila* (De Zazzo y Tully, 1995), el cangrejo *Chasmagnathus* (Maldonado et al., 1997), *Aplysia* (Carew et al., 1972; Byrne, 1987), ratas (McGaugh, 1966), ratones (Roberts y Flexner, 1969), primates (Goldman-Rakic, 1992) y humanos (Atkinson y Shrifin, 1968).

Sobre la base del análisis mecanístico, farmacológico, y de los requerimientos de inducción y de expresión, se han diferenciado tres fases de la memoria que resultan de interés desde el punto de vista neurobiológico. Estas tres fases definidas en base a su duración son la memoria de corto término (MCT), que se refiere a los sistemas que retienen la información desde el momento de la experiencia y temporalmente, mientras la información es transferida a formas más estables de almacenamiento como la memoria intermedia (MI) o a una forma de memoria potencialmente permanente como la memoria de largo término (MLT) (Squire 1987; Sedman et al, 1991; Hammer, 1995). A pesar de poder definir estas tres fases según características propias de cada una, es de utilidad e importancia, para poder estudiar la memoria, recordar que estas son parte de un proceso gradual, no discreto de adquisición y almacenamiento de información.

La secuencialidad de estas tres fases de memoria, sugiere un procesamiento de tipo serial, en el cual cada una de estas fases es dependiente de la anterior. Sin

embargo, existen ejemplos en los cuales las fases también pueden ser inducidas y procesadas en paralelo desde el momento del aprendizaje. El tipo de procesamiento serial o paralelo ha mostrado depender de la especie, del paradigma y de las fases de memoria en cuestión. Uno de los modelos más estudiados, como es el molusco *Aplysia*, muestra en detalle el fenómeno de sensibilización de una respuesta defensiva y los mecanismos celulares que subyacen la retención de este aprendizaje a corto, mediano y largo término. Se ha comprobado con respecto al procesamiento de estas tres fases de memoria que la memoria de largo término es dependiente de la existencia de una memoria intermedia. Sin embargo el procesamiento de estas es independiente o paralelo a la memoria de corto término (Sutton et al, 2001). En pollos que aprenden a asociar un estímulo a un refuerzo negativo se ha determinado un procesamiento serial de la memoria de corto y de largo término (Gibbs & Ng, 1977). En ratas la existencia de las distintas fases de memoria es independiente y son paralelamente inducidas por el aprendizaje (Frieder y Allewis, 1978; Izquierdo et al., 1998).

La formación diferencial de memorias de corto, intermedio o largo termino.

La formación diferencial de memorias de corto, intermedio o largo termino esta en gran parte determinada por la frecuencia de presentación de los ensayos de entrenamiento.

Estos tipos de memoria se forman diferencialmente según la frecuencia y número de presentaciones del estímulo. En general ensayos de entrenamiento distribuidos en el tiempo generan memorias mejores (respecto de su duración) que muchos ensayos presentados en un corto periodo de tiempo. Jost (1897) quien elaboro los descubrimientos originalmente realizados primero por Ebinhaus (1885), es el primero en formular una teoría conteniendo una contra-intuición, respecto de la interacción entre olvido a corto término y el fortalecimiento de la memoria a largo término. En palabras textuales, "*Dada una fuerza de asociación igual, cuanto mas antiguo el trazo de memoria al momento de la repetición del aprendizaje (menor frecuencia entre estímulos), menos se olvida a largo término*". Esta regla esta de acuerdo con los resultados obtenidos en trabajos de comportamiento de distintas

especies animales, con aprendizajes que requieren de múltiples ensayos, en los cuales una variable importante para la eficacia de acumular efectos del entrenamiento, es el intervalo entre ensayos (Carew et al. 1972; Fanselow y Tighe 1988; Tully et al. 1994; Spieler y Balota 1996; Kogan et al. 1997; Hermitte et al. 1999; Muzzio et al. 1999; Beck et al. 2000; Wu et al. 2001).

Algunos de estos trabajos y sus continuaciones indican que el intervalo entre ensayos es crítico para la formación de la memoria. Una presentación espaciada de ensayos producirá una memoria de largo término, mientras que la presentación masiva (con un intervalo entre ensayos corto) solo producirá una memoria de corto término o a lo sumo, si el número de ensayos es suficiente, una de término intermedio (Pedreira et al, 1998, Hermitte et al, 1999, Menzel et al, 1996, Tully et al, 1994). De este tipo de entrenamiento y de sus requerimientos moleculares subyacentes, nos valdremos para poder diferenciar entre las memorias de largo término y las de término intermedio o corto, en el paradigma de *Chasmagnathus*.

Procesos que sustentan los distintos tipos de memoria

Las memorias de corto, intermedio y largo término, están definidas primeramente por su duración. Sin embargo cuando realizamos un estudio comparativo de la memoria nos encontramos que la duración de las memorias varía entre especies, sobre todo en forma relativa al ciclo de vida de cada una. Amén de tener periodos de duración distintos, estas memorias se diferencian también por los mecanismos que las sustentan. Es por esto que en muchos casos las memorias de largo, intermedio y corto término se definen guiándose más por los procesos involucrados que por su persistencia en el tiempo.

Distintas observaciones de la naturaleza de la memoria, dirigieron la búsqueda de estos mecanismos. Hace mucho que se sabe que una persona que ante un trauma queda inconsciente, sufre una pérdida de memoria selectiva, que afecta a los eventos inmediatamente anteriores al desmayo (amnesia retrograda temporalmente graduada), así como a hechos sucedidos luego de recuperar la conciencia (amnesia anterógrada). Las amnesias han sido ampliamente documentadas en humanos luego de accidentes y en pacientes con lesiones en el cerebro y, en animales, usando distintos agentes disruptivos. Las amnesias

inducidas son una herramienta principal de la investigación de la memoria. Si bien los efectos sobre la memoria se pueden deber a que se vean afectadas dos partes de la memoria diferentes: la información que la conforma en sí y/o el sistema de evocación (por esto es que algunas memorias regresan gradualmente de la amnesia), queda en claro que, las memorias que no se recuperan, luego de mejorada la evocación, son en general memorias de adquisición reciente. Mientras que las memorias recientemente adquiridas se ven afectadas, las memorias más antiguas permanecen intactas, dejando en evidencia un periodo, la consolidación, en el cual las memorias son lábiles.

Hace unas pocas décadas, el descubrimiento de que algunos antibióticos, cuando eran administrados durante el aprendizaje, inhibían la formación de la memoria, mostró que la formación de la memoria de largo término requería de procesos biológicos tales como la síntesis proteica. Este dato atrajo mucho la atención y actualmente se sabe que un prerrequisito conservado para la formación de la memoria de largo termino en diferentes especies, desde invertebrados a mamíferos, es la expresión de genes durante e inmediatamente después del aprendizaje (Agranoff, 1967; Barondes, 1975; Castellucci et al., 1989; Tully et al., 1994; Rose, 1995; Davis y Squire, 1984; Flexner et al., 1963). Con esta nueva herramienta en mano, las investigaciones se concentraron en definir molecularmente los distintos tipos de memoria. Datos provenientes de trabajos en *Drosophila*, *Aplysia*, roedores y *Chasmagnathus*, entre otros, fueron agregando información acerca de los mecanismos que son propios de las memorias de término corto e intermedio (Tully et al, 1994; Carew et al, 1972; Pedreira et al, 1998). La memoria de corto término depende de modificaciones covalentes en proteínas preexistentes, varias protein-quinasa son necesarias para su formación (Waltz R. et al 1999; Sutton M.A et al, 2004) y la memoria de término intermedio, depende de la traducción de ARN mensajeros preexistentes, pero no de transcripción (Ghirardi et al, 1995; Crow et. al, 1999). Estos mecanismos moleculares y celulares que sustentan las memorias de largo, intermedio y corto término parecen servir a estos tipos de memoria de acuerdo con la necesidad temporal y la duración de los mismos.

Las memorias que persisten por periodos largos, requieren de síntesis de proteínas, que pueden provenir, como hemos resumido mas arriba, tanto de la traducción de ARNs mensajeros preexistentes o, como es exclusivo de la memoria

de largo término, de la traducción de ARNs mensajeros recién transcritos (Montarolo et al, 1986; Pedreira et al, 1996).

Plasticidad sináptica y memoria

Una aproximación a los procesos circuitales, celulares y moleculares que suceden durante el almacenamiento de información, lo aportan los modelos de plasticidad neuronal como la facilitación y la depresión y potenciación sinápticas. Las distintas fases temporales de estos fenómenos poseen un interesante paralelo con los requerimientos y características de la memoria. Por ejemplo, la participación de algunos receptores (serotonérgicos en el caso de la facilitación y glutamatergicos de tipo NMDA en el caso de la potenciación) (Mackey et al, 1989; Muller y Lynch, 1988), la activación de quinasas (Malinow et al, 1989), la necesidad de formar nuevas sinápsis (Toni, N. et al, 1999) y la dependencia de síntesis proteica y de mRNA en las fases más tardías (Nguyen y Kandel, 1996).

La potenciación de largo término se da en muchas zonas del cerebro. Tal vez una de las más caracterizadas sea la potenciación que se da en la vía perforante del hipocampo, entre la corteza entorinal y el giro dentado (Bliss y Lomo, 1973). Esta es la mayor aferencia cortical del hipocampo, y se sabe por distintos trabajos

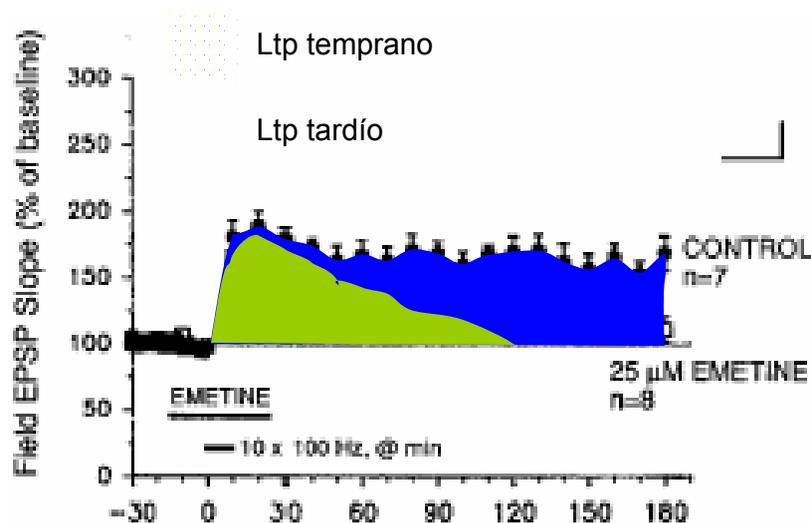


Figura 1: LTP temprano y tardío. Dependencia de la síntesis proteica de la fase tardía, del LTP, evidenciada por el uso de un inhibidor de síntesis proteica, la emetina. Nguyen y Kandel, 1996.

que juega un papel importante en la formación de la memoria (Ferbinteanu et al, 1999). La potenciación en la vía perforante posee dos fases principales: una temprana y otra tardía dependiente de la síntesis de proteínas y ARN (Nguyen y Kandel, 1996).

Estas dos fases se inducen diferencialmente según la intensidad y el número de presentaciones del estímulo tetánico.

Memoria de largo término y transcripción

La inducción de la transcripción se encuentra normalmente regulada por factores de transcripción activables, que son los encargados de inducir los genes a ser transcritos, dando especificidad, y a su vez plasticidad, al evento transcripcional. Por esta razón es que existe gran interés, en el estudio de la activación de los factores de transcripción durante el aprendizaje, ya que al ser estos los que definen el grupo de genes a ser expresados, su estudio y el de sus genes regulados, brinda información importante del tipo de modificaciones que son necesarias para la formación de la memoria, y de cuando dichas modificaciones deben suceder. La interacción entre los factores de transcripción, y los genes a expresarse, que poseen secuencias consenso para tales factores en su promotor, posee regulaciones de 2 orígenes diferentes: 1), provenientes del factor de transcripción y 2), provenientes de la cromatina, en particular de la secuencia consenso de ADN a la que se une el factor de transcripción.

Las regulaciones provenientes del factor de transcripción, que afectan su propia capacidad de transactivación, en general son modificaciones postraduccionales tales como fosforilación y acetilación o interacciones con otras proteínas (como otros factores de transcripción), subunidades, o cofactores. La variabilidad proveniente de la secuencia consenso de reconocimiento del factor de transcripción puede deberse a variaciones de secuencia (diferentes versiones de un mismo patrón con diferente afinidad por el factor) y la accesibilidad de la propia secuencia, ya sea por modificaciones en la cromatina o por oclusión de la misma por factores represores.

Este modelo sencillo se ha visto enriquecido, por gran cantidad de posibilidades de regulación; por ejemplo, distintas proteínas de la misma familia de

factores de transcripción pueden formar distintos dímeros en diferentes combinaciones. Algunas de estas combinaciones pueden incluso ser represores transcripcionales o unirse a distintas variantes de la secuencia consenso con distinta afinidad, agregando una enorme variabilidad al sistema. Por otra parte, estudios sobre eventos transcripcionales en distintos modelos muestran que, en general, la actividad concertada de varios factores de transcripción es necesaria para regular y definir la transcripción (Doucas V. et al, 2000; Yeh et al, 2002). Por eso es poco probable que la síntesis de ARN necesaria para la consolidación de largo término este regulada por un solo factor de transcripción.

La actividad de varios factores de transcripción se relaciona con la formación de memorias de largo término y las etapas tardías de la plasticidad neuronal. Como una muestra del tipo de trabajos que se realiza sobre los factores de transcripción mas estudiados en fenómenos plásticos y de memoria, es importante nombrar a los siguientes. El factor de transcripción C/EBP es necesario para la consolidación de memorias de largo termino en invertebrados y vertebrados (Alberini et al, 1994; Taubenfeld et al., 2001). Zif268 (factor de transcripción también conocido como Krox-24, Erg-1 o NGFI-A) esta involucrado en la fase tardía del LTP en el giro dentado así como también en la memoria de largo término para varias tareas (Jones et al, 2001; Ko et al, 2005). Las proteínas Fos y Jun, genes tempranos, que forman como dímeros al factor de transcripción AP1, están también relacionadas con el mantenimiento de las fases de largo término de la memoria y de la potenciación (Tischmeyer y Grimm, 1999). Por ultimo, CREB (Bourtchuladze et al, 2002) y NF-kappa B (Romano et al, 2006) son los únicos dos factores de transcripción constitutivos que se sabe hasta ahora que juegan un papel en la consolidación de la memoria de largo término, y de los cuales hablaremos mas extensivamente, de CREB como el primero estudiado y de NF-kappa B como objeto de esta tesis.

La mayoría de los estudios que trabajan sobre los factores de transcripción constitutivos en la consolidación de la memoria, se centran históricamente en el factor de transcripción “proteína de unión al elemento respondiente al AMP ciclico”, CREB (por sus siglas ingles). Los estudios sobre CREB dejan en claro la importancia de los factores constitutivos, en la formación de la memoria. CREB es una proteína nuclear que modula la transcripción de genes que poseen en sus promotores elementos que responden a variaciones en la abundancia del segundo

mensajero AMPc. CREB es un factor de transcripción constitutivo, o sea que no requiere de síntesis para su actividad. Aumentos en la concentración tanto del ión Ca^{++} intracelular como de AMPc pueden disparar la fosforilación y activación de CREB. Este factor de transcripción es un componente de los eventos de señalización intracelular que regula un amplio rango de funciones biológicas, desde la espermatogenesis hasta los ciclos circadianos y la memoria. Las evidencias de su función como regulador de la formación de la memoria provienen de trabajos en *Aplysia californica*, *Drosophila melanogaster*, ratón y rata, en los cuales la transcripción dependiente de CREB es requerida para los eventos celulares que subyacen a la formación de memorias de largo término, pero no para las de corto (Dash et al, 1990; Yin et al, 1995; Bourtchuladze et al, 1994). Mientras que los trabajos que involucran CREB en *Aplysia* y *Drosophila*, son en formas simples de condicionamiento, los estudios de este factor en rata y ratón demuestran que es necesario en una variedad de formas complejas de memoria cómo son los aprendizajes espaciales y sociales (revisado en Alberini, 1999; Silva A J et al, 1998). Esto implica que es posible que algunos factores de transcripción sean moduladores universales de los procesos requeridos para la formación de la memoria, y que a este nivel básico de respuesta celular, se mantengan conservados evolutivamente (Dudai, 2002).

Esta tesis se centra en el estudio de otro factor de transcripción constitutivo, NF-kappa B. Desde el inicio de la fase experimental nos propusimos como hipótesis que este factor cumple un papel central en la plasticidad neuronal y la memoria tanto en invertebrados como en vertebrados. Las primeras evidencias que apoyan esta hipótesis forman parte de esta tesis y posteriores trabajos de nuestro laboratorio, así como de otros grupos de investigación, constituyen actualmente un importante cuerpo de evidencias a favor de la misma (Romano et al., 2006).

NF-kappa B.

La vía de transducción de señales Rel/NF-kappa B.

El nombre NF-kappa B proviene de ser el factor nuclear que regula la expresión de las cadenas livianas **kappa** de inmunoglobulinas en los linfocitos **B**.

por un dominio de unión al ADN y de dimerización altamente conservado, llamado dominio de homología Rel (RHD) (**Figura 2**).

Las proteínas de la familia Rel/NF-kappa B pueden ser divididas en dos clases según las secuencias carboxiterminales que se encuentran más allá del RHD. La primera clase comprende a las proteínas p105, p100, en vertebrados y relish de *Drosophila*, con largas secuencias carboxiterminales que poseen repeticiones ankyrin, capaces de inhibir a la propia moléculas uniéndose a la zona de unión al ADN. Los miembros de este tipo se vuelven activos por proteólisis o fin de traducción (p105 a p50 y p100 a p52) y no son activadores de la transcripción, excepto cuando forman dímeros con miembros de la segunda clase (**Figura 2**). La segunda clase incluye a c-Rel (y su homólogo retroviral v-Rel), Rel B, Rel A (p65) y las proteínas de *Drosophila* Dorsal y Dif. Este segundo tipo de proteínas Rel contienen secuencias carboxiterminales con dominios de activación de la transcripción, que a menudo no están conservadas en secuencia entre especies, a pesar de ser capaces de activar la transcripción interespecíficamente (**Figura 2**).

Los factores de transcripción Rel/ NF-kappa B se unen como dímeros a

Estructura típica de la secuencia de los FT Rel/NF-kappa B

a) Secuencia canónica

5´-GGGRNTYYHC-3´

b) Secuencia usada en EMSA

5´-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3´

c) Relish

5´-TCGAGACACGGGGATTTTTTGCAC-3´

R:A/G M:A/C W:A/T H:A/T/C V:g/A/C D:g/A/T Y:C/T K:g/T S:g/C B:g/T/C
N:A/G/C/T

Figura 3: a) Secuencia canónica del sitio kappaB, b) secuencia kappaB perteneciente al virus de HIV, que posee 3 secuencias en una, en distintos marcos y las secuencias kappaB pueden tener mayor afinidad por proteínas de una determinada familia en particular.

secuencias consenso de ADN, de 9 a 10 pares de bases llamadas sitios kappaB (**Figura 3**).

Todos los factores de transcripción Rel de vertebrados e invertebrados pueden formar tanto hetero como homodímeros, excepto Rel B que solo puede formar heterodímeros, como ejemplos: Dorsal funciona como homodímero en embriones, mientras que p65/p50 es el heterodímero mas frecuente en vertebrados (Jia et al., 2002). Esta diversidad combinatoria contribuye a regular grupos

diferentes, pero superpuestos, de genes en donde cada dímero tiene una especificidad de unión distinta por un subgrupo de sitios kappaB relacionados (revisado en Chytil y Gregory, 1996) (**Figura 3**). El termino NF-kappa B se refiere comúnmente al heterodímero p50-p65, que es el que mas ávidamente se forma y el mas abundante en la mayoría de las células.

La actividad de NF-kappa B es regulada por la interacción con la proteína inhibitoria IkappaB.

Así como las proteínas Rel/NF-kappa B, las IkappaB son varias, con distintas afinidades por los Rel/NF-kappa B individuales, con regulaciones ligeramente diferentes y con expresiones tejido-específicas. Las proteínas IkappaB incluyen por lo menos a p105, p100, IkappaB alfa, IkappaB beta, IkappaB gamma, IkappaB epsilon, IkappaB z, Bcl-3, y la proteína de *Drosophila* Cactus.

La interacción NF-kappa B-IkappaB más estudiada es la de p50-ReA con IkappaB α . Esta interacción bloquea la capacidad de unión al ADN de NF-kappa B y es responsable de que el complejo se encuentre mayoritariamente en el citoplasma, debido a la fuerte señal de exportación nuclear de IkappaB α . El complejo NF-kappa B-IkappaB α se transporta continuamente entre el núcleo y el citoplasma, pero su exportación excede su importación, de esta manera el complejo es mayoritariamente citoplasmático (Carlotti et al, 2000).

De estudios bioquímicos y de determinaciones estructurales se sabe que IkappaB α hace contactos múltiples con NF- κ B. Estas interacciones cubren secuencias del NF-kappa B que son importantes para la unión al ADN. En cambio, cuando IkappaB β es el que interactúa con NF-kappa B, este es retenido en el citoplasma (no se transporta del citoplasma a núcleo y viceversa). Así, no todas las interacciones NF-kappa B-IkappaB son iguales. En la mayoría de las células, NF-kappa B esta presente como un complejo inactivo, latente y unido a I- κ B en el citoplasma. Cuando una célula recibe una de las múltiples señales, que activan NF-kappa B, (O'Neill y Kaltschmist, 1997; Kaltschmidt et al., 1999; Muller et al., 1993; Pande y Ramos, 2003) tales como despolarización, aumento de la concentración intracelular de Ca⁺⁺, glutamato, factor de necrosis tumoral (TNF), IL1, etc., el factor de transcripción se transloca al núcleo y activa la expresión

génica (Beg y Baltimore, 1996; Brown et al.1993). Por eso, un paso clave para controlar la actividad de NF-kappa B es la regulación de la interacción I- κ B-NF-kappa B. Muchos de los detalles moleculares de este control se conocen ahora (**Figura 4**). La actividad del factor de transcripción no solo es importante cuando es inducida, ya que un porcentaje del NF kapa B, en algunas neuronas se encuentra activo en forma constitutiva (Rattner et al, 1993; Kaltschmidt et al, 1994; Schmidt-Ullrich et al, 1996; Freudenthal et al, 1998; Bhakar et al, 2002; Freudenthal et al, 2004).

Casi todas las señales que activan NF-kappa B convergen en la activación de un complejo de alto peso molecular que contiene una quinasa específica para serina, la I- κ B quinasa (IKK).

IKK es una quinasa inusual, que en la mayoría de las células contiene al menos tres subunidades distintas: IKK α , IKK β e IKK γ . IKK α e IKK β son subunidades catalíticas mientras que IKK γ es regulatoria y funciona como sensor para las catalíticas.

En la activación clásica de la vía, el complejo IKK fosforila a través de la subunidad IKK β , dos serinas específicas cerca del amino terminal de I- κ B, que lo hacen blanco de ubiquitinización, por un complejo llamado β -TrCP, y degradación por el proteosoma 26S (**Figura 4**).

En la vía de activación no canónica, el complejo p100-ReB es activado por la fosforilación carboxiterminal de p100 por un homodímero de IKK α , lo cual conduce a la ubiquitinización y posterior degradación de la parte similar a IkappaB de p100, que genera al complejo p52-ReI β .

En ambas vías, el complejo NF-kappa B activado puede entrar al núcleo para activar la expresión de genes blanco. En la vía canónica, uno de los genes blanco activado por NF-kappa B es el IkappaB α . IkappaB α recién sintetizado puede entrar al núcleo, remover NF-kappa B del ADN, y exportar el complejo al citoplasma, restaurando el estado latente original. De esta manera la activación de la vía de NF-kappa B es generalmente un proceso transiente, que dura entre 30 y 60 minutos en muchos sistemas.

Evidencia reciente sugiere que el control de la vía de NF-kappa B es más complejo que simplemente la regulación de la interacción entre el IkappaB y NF-kappa B mediada por IKK. Por ejemplo, Rel A y p50 pueden ser regulados por acetilación y

prolisisomerización y la actividad de transactivación de RelA puede ser afectada por fosforilación (Quivy y Lint, 2004; Schmitz et al, 2004; Jang et al, 2001). Más aún, como consecuencia de la activación de NF-kappa B (al menos por TNF) IKK alfa es inducida a entrar al núcleo donde en asociación con sitios kappaB, fosforila a la histona 3, que su vez aumenta de transcripción de los genes dependientes de sitios kB (Anest et al, 2003).

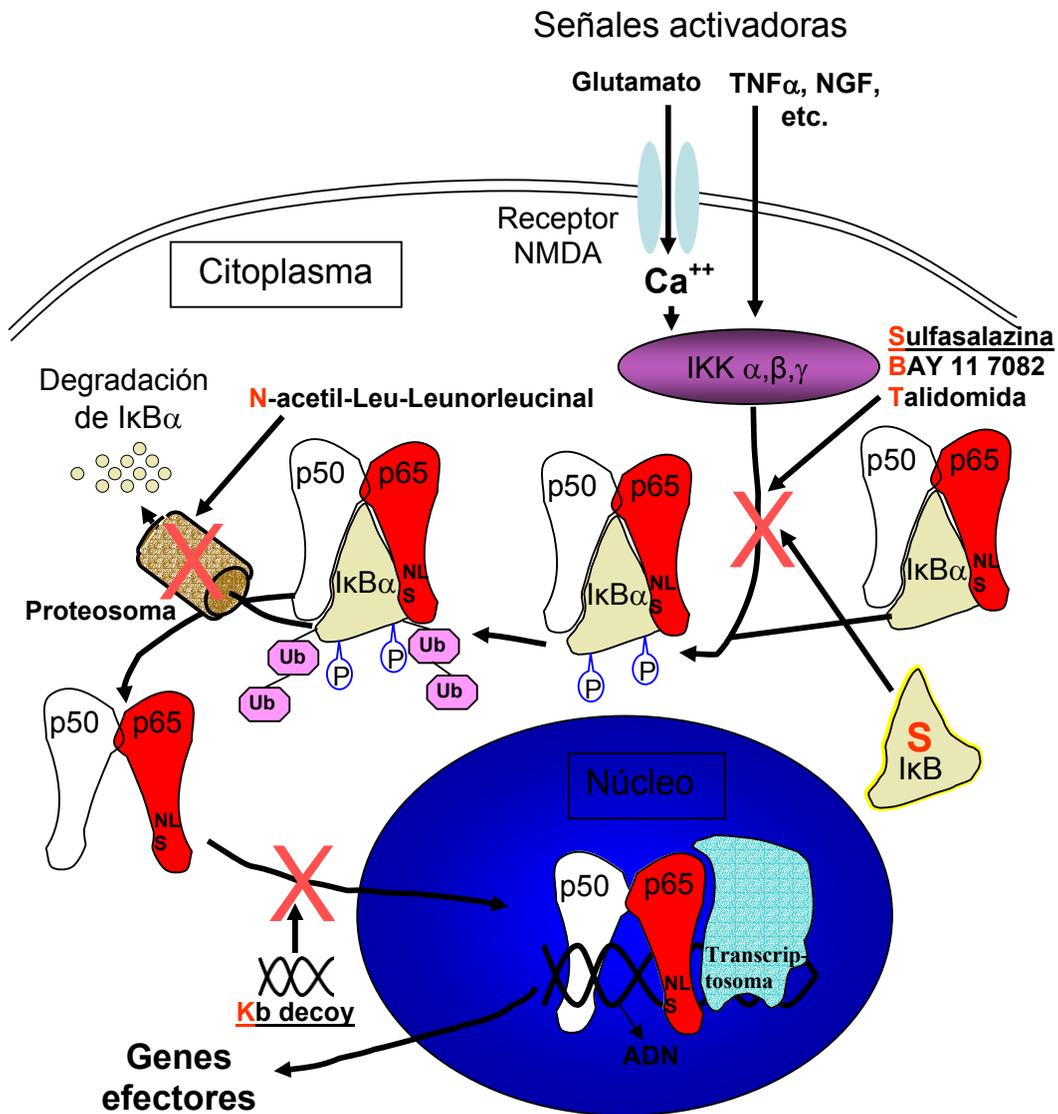


Figura 4: Activación canónica del NF-kappa B mostrando los inhibidores usados y los citados. Los inhibidores utilizados se encuentran subrayados. NLS: secuencia de localización nuclear, S Ikb: Ikb superrepressor, Ub: Ubiquitina, P: fosforilaciones.

NF-kappa B en el sistema nervioso central

Distribución en el cerebro.

NF-kappa B se encuentra expresado ubicuamente en el sistema nervioso (Bhakar et al., 2002; O'Neill y Kaltschmidt, 1997; Yalcin et al., 2003), mostrando una gran actividad constitutiva, en algunos tipos neuronales, (**Figuras 5**) como son algunas neuronas del cluster 9-11 en ganglio supraesofágico de

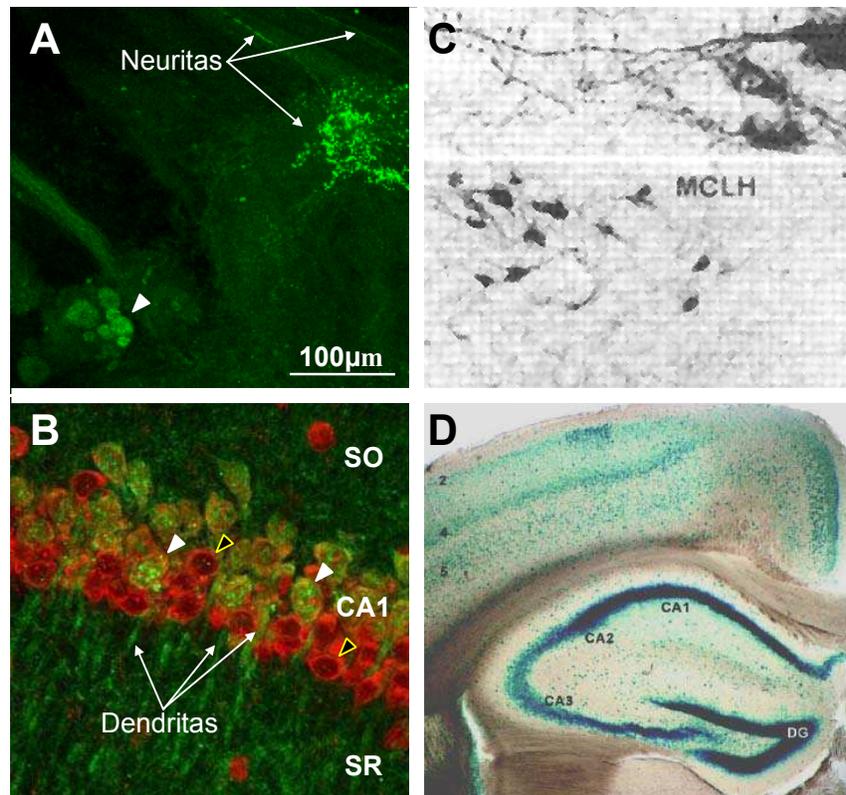


Figura 5: Localización de NF-kappa B en el sistema nervioso.

A: Inmunohistoquímica del ganglio supraesofágico de *Chasmagnathus*, con un anticuerpo anti p65 NLS, mostrando neuronas y neuritas con p65 activo. **B:** Inmunohistoquímica contra p65 NLS (alexa 488)/propidio (rojo, núcleos), de un corte coronal de cerebro de ratón. SO, stratum oriens; CA1, capa de células piramidales; SR, stratum radiatum (dendritas de CA1). Triángulos blancos neuronas con p65 constitutivamente activo. Triángulo negro-amarillo neurona sin p65 activo. **C:** Localización axónica de p65 en rata (Sulejczak y Skup, 2000). **D:** Actividad transcripcional constitutiva de NF-kappa B en un ratón transgénico, con un gen reportero de β -galactosidasa regulado por sitios kB. Células piramidales: CA1, CA2 y CA3; granulares: GR, giro dentado; capas de la corteza: 2, 4 y 5 (Bhakar, et al 2002).

Chasmagnathus (**Figura 5 A**) y en ratón las neuronas: piramidales (**Figura 5 B y D**) y granulares del hipocampo, del cortex piriforme y las neuronas de algunas capas

de la corteza (principalmente 2, 4 y 5). En el soma de las neuronas el factor de transcripción posee una distribución perinuclear y en menor proporción nuclear, mientras que se encuentra fuertemente presente en dendritas, reportándose su presencia en sinaptosomas de ratón, rata y cangrejo (Kaltschmidt et al, 1993; Meberg et al, 1996; Freudenthal et al, 2000) y densidades post sinápticas (Suzuki et al, 1997). Algunos poco reportes lo ubican en axones de rata, (**Figura 5 c**).

Funciones conocidas del NF-kappa B en el sistema nervioso.

En el sistema nervioso central, los factores de transcripción de la familia REL/NF-kappa B se asocian a varias funciones conocidas relacionadas con las respuestas a agresiones (isquemia, excitotoxicidad y trauma), regulación de la apoptosis, desordenes neurodegenerativos, desarrollo y crecimiento, plasticidad sináptica y memoria. También se sabe activado por algunas vías de transducción de señales asociadas a receptores de neurotransmisores como el glutamato, $TNF\alpha$, ligando de Fas, factor de crecimiento nervioso (NGF) y la forma secretada de la proteína precursora del β -amiloide (β APP). Otra forma de activación de importancia a tener en cuenta es la capacidad de ser activado por actividad eléctrica y transmisión sináptica a la que se responsabiliza por la actividad constitutiva en el sistema nervioso (O'Neil y Kaltschmidt, 1997). Llama la atención el gran número de reportes recientes que involucran a factores de transcripción de la familia REL/NF-kappa B actuando en variados procesos, como neurogénesis (Denis-Donini et al, 2005), en el sistema circadiano (Marpegan et al, 2004) y asociado a las células madre neurales (Lidera et al, 2006).

Si bien el NF-kappa B se ha identificado en varias especies distintas, desde invertebrados (incluyendo al cangrejo cacerola, un fósil viviente), hasta mamíferos, y se lo ha estudiado en profundidad en el sistema inmune de *Drosophila*, muy pocos trabajos hablan de este factor de transcripción en el sistema nervioso de invertebrados. Todos los estudios de las funciones del NF-kappa B en el sistema nervioso que se describen a continuación, a excepción de los trabajos en *Chasmagnathus*, se han realizado en vertebrados. En muy pocas excepciones se describe a proteínas de la familia REL/NF-kappa B en invertebrados: en nervios de *Aplysia*, relacionado con daño (Povelones et al, 1997), en la placa neuromuscular

de *Drosophila*, activándose por la actividad neuronal (Bolatto et al, 2003) y en el desarrollo post embrionario del músculo (Beramendi et al, 2005).

En respuesta a agresiones:

Isquemia.

Tres minutos de isquemia, (isquemia sub-lethal: pre-condicionamiento para la isquemia) son suficientes para que el NF-kappa B aumente en forma significativa en el núcleo. Este procedimiento hace menos sensibles a las neuronas al daño posterior por una segunda isquemia o *status epilepticus*. Tanto la activación del factor de transcripción como la tolerancia al daño desaparecen si se inyectan los animales con inhibidores de NF-kappa B como dietilditiocarbamato y kB decoy (Blondeau et al, 2001).

Los receptores ionotrópicos de glutamato NMDA y no NMDA y los canales de Ca⁺⁺ voltaje dependientes son importantes para el aumento de NF-kappa B en el núcleo inducido por la isquemia transiente (Shen et al, 2002). Estos datos indican que la vía de señalización de este factor de transcripción es importante para que exista una respuesta a este tipo de daño en el sistema nervioso central.

Daño excitotóxico.

El sistema nervioso central es capaz de responder al daño excitotóxico a través de la vía de señalización de NF-kappa B. Esto se evidencia por algunos de los genes efectores de esta vía, y por experimentos que involucran cambios en la capacidad de respuesta del sistema nervioso central y que se probó requieren de componentes del sistema de señalización de NF-kappa B.

Animales sin la subunidad p50 o animales *wild type* inyectados con kB decoy (p50/p65 es en vertebrados la variedad de NF-kappa B mas abundante con actividad transcripcional) muestran un incremento en el daño a las neuronas piramidales del hipocampo luego de la administración de kainato (Yu et al, 1999).

Trauma.

La actividad de NF-kappa B en el cerebro aumenta luego de una hora de sucedido un trauma por contusión y este aumento aun es detectable hasta una semana después del trauma en neuronas y hasta un año después en células gliales y

endoteliales. Este aumento prolongado de la actividad del factor de transcripción ocurre en zonas que sufren atrofia persistente, sugiriendo que el NF-kappa B puede ser el responsable de los procesos inflamatorios de largo término que suceden después de un trauma al cerebro (Monaka et al, 1999).

Apoptosis.

La vía de señalización Rel/NF-kappa B y los factores de transcripción a los que activa son reguladores críticos de la respuesta apoptótica. Mientras que al NF-kappa B se lo asocia más a la supresión de la apoptosis, activando la expresión de genes anti apoptóticos, se ha probado recientemente que es capaz de promover la muerte celular programada cuando es regulado bajo ciertas señales de inducción de muerte y en algunos tipos de células particulares (Kucharczak et al, 2003).

NF-kappa B en enfermedades neurodegenerativas.

Estudios post mortem de tejido cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) muestran un incremento en la actividad de NF-kappa B en las células involucradas en el proceso degenerativo. La inmunoreactividad de p65 se ve aumentada en neuronas y astrocitos inmediatamente vecinos a las placas amiloides, consistente con el aumento de actividad en esas células (O'Neill y Kaltschmidt, 1997). Otros estudios muestran que el NF-kappa B puede ser activado en neuronas en cultivo si se aplica β -amiloide, sugiriendo un mecanismo por el cual el péptido podría estar actuando en la EA (Barger et al, 1995).

Un análisis inmunohistoquímico, de secciones de cerebro de pacientes con enfermedad de Parkinson mostró que, comparando con controles de la misma edad, las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra poseían 70 veces más inmunoreactividad contra p65 (Hunot et al, 1997).

En otros reportes un aumento de NF-kappa B es asociado con ciertos estadios de esclerosis lateral amiotrófica. En todos estos casos una de las hipótesis propuestas, toma en cuenta la posibilidad de que NF-kappa B este jugando un rol neuroprotector (Mattson y Camandola, 2001).

NF-kappa B en crecimiento y desarrollo neuronal.

Si se impide la activación del NF-kappa B ya sea con el IkappaB- α super represor, con BAY 11 7082 (inhibidor de fosforilación de IkappaB), N-acetil-Leu-Leu-leucinal (inhibidor de la degradación por proteosoma) o se inhibe su actividad transcripcional con kB decoy, los árboles neuríticos de las neuronas así tratadas reducen sustancialmente su tamaño y complejidad.

Este efecto de la inhibición de la vía de NF-kappa B sucede durante un periodo restringido del desarrollo, después de la fase en que muchas neuronas mueren naturalmente y cuando los procesos y conexiones de las neuronas remanentes ya se encuentran refinadas y modificadas (Gutierrez et al, 2005).

NF-kappa B en modelos de plasticidad sináptica.

La estimulación eléctrica de baja y alta frecuencia de la vía perforante del hipocampo de ratas, aumenta la expresión de las subunidades del NF-kappa B p65 y p50, en todos los grupos neuronales del hipocampo. Pero p65 (la subunidad con dominio de transactivación) aumenta más su expresión en la estimulación tetánica que induce LTP que en la estimulación de baja frecuencia utilizada como control (Meberg et al, 1996)

En ratones knock-out para los receptores de TNF α , p55 y p75, que activan la vía del NF-kappa B, no es posible inducir LTD, mientras que la aplicación de kB decoy en secciones de hipocampo de ratón *wild type* impide la formación de LTD y LTP (Albensi y Mattson, 2000).

Este efecto del kB decoy sobre el LTP no esta circunscrito a las potenciaciones en el hipocampo. La aplicación de kB decoy en secciones de cerebro inhibe la inducción de la fase tardía de la potenciación en la amígdala de ratas, (Yeh et al, 2002) indicando que es posible que sea un mecanismo común entre los procesos de plasticidades sináptica de largo término.

NF-kappa B en memoria.

En invertebrados.

En 1998 nuestro grupo publicó un trabajo (Freudenthal et al, 1998) que fue el resultado inicial de la búsqueda de factores de transcripción responsables de la actividad transcripcional necesaria para la consolidación de la memoria de largo término en *Chasmagnathus granulatus*. En mi tesis de licenciatura (Freudenthal, 1999) y en este trabajo, estudiamos mediante EMSA varios factores de transcripción candidatos para regular la actividad transcripcional luego de un entrenamiento que genera memoria de largo término. Las familias de factores de transcripción de las cuales se encontró un retardo específico en el sistema nervioso de *Chasmagnathus* fueron C/EBP (CAATT element binding proteins), CREB/ATF, AP1 (fos, jun) y REL/NF-kappa B (Freudenthal, 1999). De entre estos candidatos se siguió una línea de investigación que involucro al NF-kappa B. Este factor de transcripción ubicuo en el sistema nervioso de *Chasmagnathus*, se activa inmediatamente después de un entrenamiento que induce una memoria de largo término, proceso que veremos mas adelante en el marco del modelo de memoria en el cangrejo. El trabajo realizado en *Chasmagnathus* nos permitió emprender estudios comparativos en modelos de memoria y plasticidad en vertebrados, con hipótesis basadas en nuestros resultados previos.

En vertebrados.

La inhibición de NF-kappa B en la amígdala antes del entrenamiento, ya sea por inhibición de la actividad de IKK (talidomida) o por el uso de kB decoy, impide la formación de la memoria y de la potenciación de largo término, indicando un papel del NF-kappa B en la amígdala, en la consolidación de las memorias de miedo (Yeh et al, 2002). Esta función del NF-kappa B se encuentra regulada por la acetilación de p65 que es una de las formas de regulación de la capacidad de transactivación del factor de transcripción (Yeh et al, 2004).

Chasmagnathus como modelo

El cangrejo *Chasmagnathus granulatus* es el primer animal utilizado como modelo en esta tesis para evaluar el papel de NF-kappa B en memoria. *Chasmagnathus granulatus* (Figura 6) es un cangrejo semiterrestre eurihalino, que habita en zonas intermareales. Taxonomicamente se ubica en la siguiente clasificación:

Superclase: Crustacea

Clase: Malacostraca

Orden: Decapoda

Familia: Grapsidae

Genero: *Chasmagnathus*

Especie: *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851)

Chasmagnathus granulatus es un cangrejo de respiración bimodal, o sea que es capaz de obtener oxígeno tanto en el agua como en el aire (Halperin et al, 2000), gracias a esto, pasa largos períodos de tiempo forrajeando fuera del agua, sobre todo con mareas bajas (Figura 6 B). Durante gran parte de su de su vida adulta, entre sus predadores más importantes se encuentran las gaviotas (Beron M.P et al, 2004; Petracci et al, 2004) y otras aves costeras, quienes lo capturan empleando una variedad de estrategias de aproximación diferentes (Figura 6 C). Es posible que esta sea la razón por la cual *Chasmagnathus* muestra una gran agudeza visual y una excelente capacidad para detectar objetos que se desplazan por encima de él, diferenciando entre aquellos que involucran un posible daño de los que son inocuos y recordando a largo término dichos objetos. Dado que el paradigma de memoria que se utiliza en esta tesis es principalmente visual y que el asiento de las habilidades cognitivas de *Chasmagnathus* que vamos a describir es el sistema nervioso central, es importante repasar la anatomía, morfología y localización de éste, para describir adecuadamente cómo están diseñados los experimentos.

Anatomía del sistema nervioso central de los decápodos

El sistema nervioso central de los artrópodos está dividido en tres regiones principales: protocerebro, deutocerebro y tritocerebro (**Figura 6 D**), que reflejan los tres ganglios que se fusionaron para formarlo. Estas estructuras son las que originan el sistema nervioso del animal adulto (Nassel y Lofsson, 1987). En los crustáceos

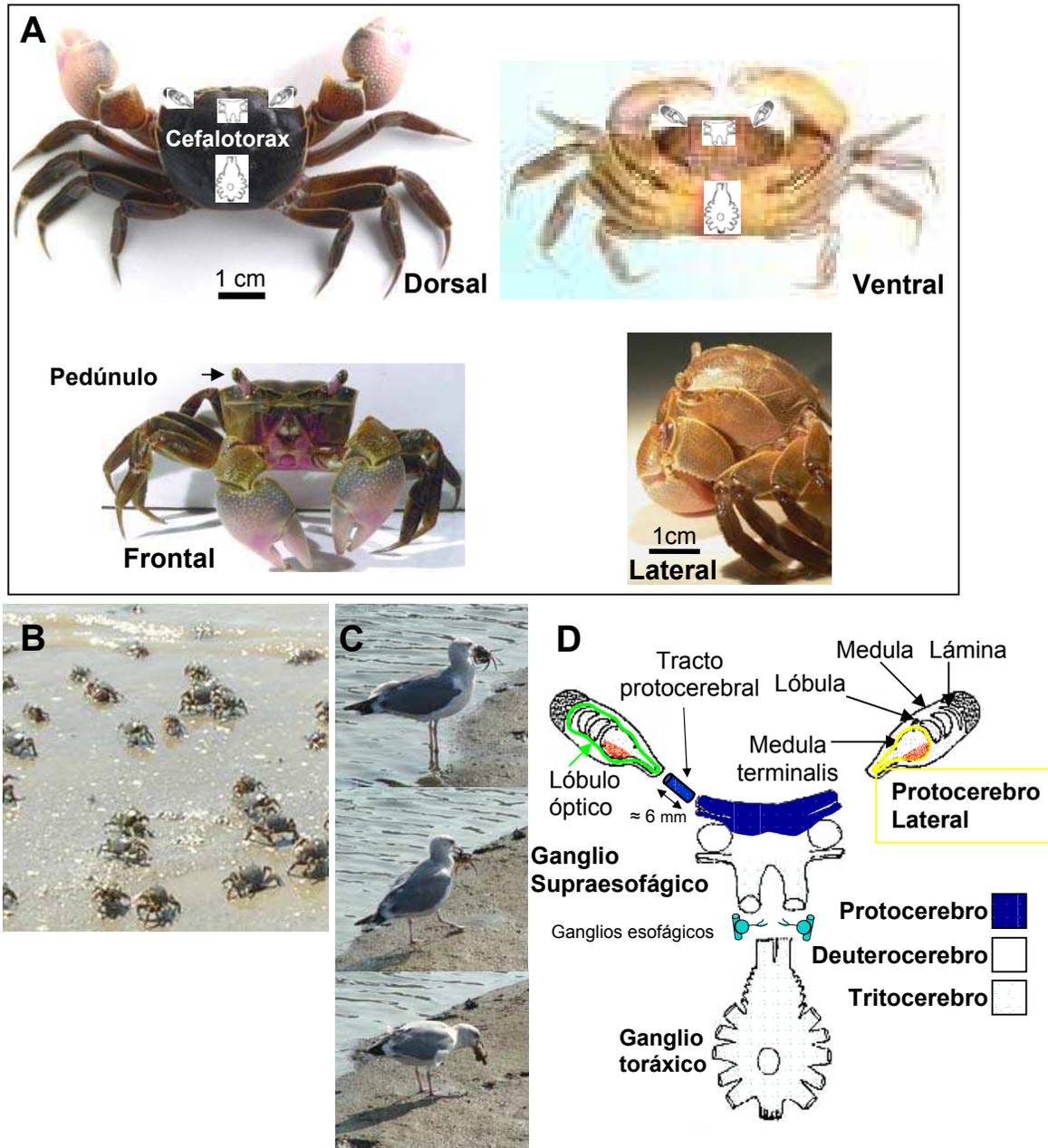


Figura 6: *Chasmagnathus granulatus*. **A.** Morfología del cangrejo y localización del sistema nervioso y de los ganglios utilizados en *Chasmagnathus*, vistas dorsal, ventral, frontal y lateral. **B.** Ejemplares de *Chasmagnathus* en la zona intermareal. **C.** Predación del cangrejo en su medio ambiente por una gaviota. **D.** Morfología del sistema nervioso central y localización de los ganglios utilizados en los experimentos (en negrita), **protocerebro lateral**, **ganglio supraesofágico** y **ganglio torácico**.

de cápodos el protocerebro está dividido en ganglios ópticos, protocerebro lateral y protocerebro medial. Los neuropilos de los ganglios ópticos y el protocerebro lateral se encuentran en los pedúnculos ópticos y el protocerebro medial, el deutocerebro y parte del tritocerebro dan origen al resto del ganglio supraesofágico que se encuentra en una posición medial. El ganglio torácico, se origina totalmente a partir del tritocerebro, encontrándose también en una posición medial pero más posterior en el cefalotórax (Harzsch et al., 1999b). En *Chasmagnathus* encontramos, entonces, tres centros nerviosos mayores: los lóbulos ópticos, el ganglio supraesofágico y el ganglio torácico. Cada lóbulo óptico se encuentra conectado con el ganglio supraesofágico por el tracto protocerebral. Estos dos centros nerviosos, conforman el cerebro y cumplen, funciones fundamentalmente de percepción sensorial y cognitivas, mientras que el ganglio torácico cumple principalmente funciones vegetativas y motoras (Sandeman et al., 1993).

Cada uno de los centros nerviosos está compuesto por un conjunto de núcleos o neuropilos que se conectan entre sí a través de tractos. En cada neuropilo los somas neuronales se encuentran agrupados en la periferia del mismo (**Figura 7**). Los neuropilos pueden tener una estructura geoméricamente ordenada o no (Sandeman, 1982).

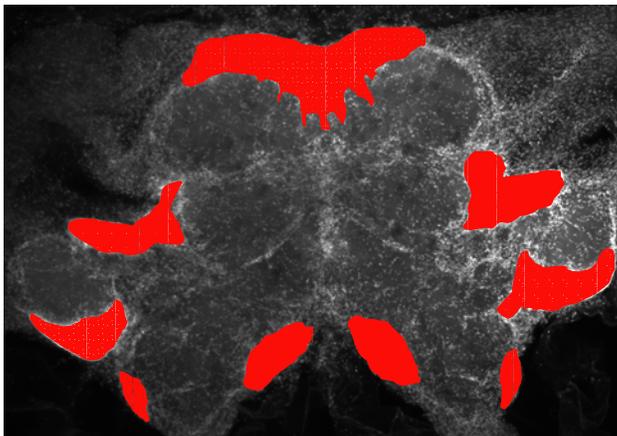


Figura 7: Grupos neuronales del ganglio Supraesofágico.

Los somas de las neuronas del ganglio supraesofágico están resaltadas en rojo, agrupadas en puntos periféricos de los neuropilos (neuropilo protocerebral anteromedial en verde-amarillo), mientras que la glía (en blanco) no se encuentra en grupos y delinea los neuropilos. Tinción con Ioduro de propidio.

Las funciones primarias de algunos de estos neuropilos se pueden deducirse a partir de sus aferencias y eferencias, desde y hacia los órganos sensoriales o motores, que son fácilmente reconocibles. Sin embargo, esta nomenclatura puede llevar a confusiones, ya que las funciones de los neuropilos no se restringen únicamente a lo que su nombre refiere (Ej. neuropilos olfatorios), ya que en

realidad estos son núcleos altamente complejos y presentan diversas conexiones con distintas áreas del sistema nervioso, centros motores y órganos sensoriales (Sandeman et al., 1992).

Para referirnos a las distintas estructuras del sistema nervioso del cangrejo, utilizamos la nomenclatura propuesta por Sandeman y colaboradores (Sandeman et al., 1992).

El ganglio supraesofágico

El ganglio supraesofágico constituiría el principal centro nervioso de procesamiento de información sensorial e integración de funciones cognitivas. Se ubica ventralmente en la región frontal anterior del cefalotórax del animal (**Figura 6 A**). El neuropilo anterior medial protocerebral, el neuropilo posterior medial protocerebral, el puente protocerebral y el cuerpo central carecen de aferencias primarias de órganos sensoriales. Tampoco se observó que estuvieran directamente involucrados con funciones motoras del animal (Sandeman, 1982). De acuerdo a su configuración, se postuló que cumplirían funciones asociativas y de procesamiento superior de la información (Sandeman, 1982; Utting et al., 2000).

En cuanto al procesamiento de información sensorial algunos de los neuropilos mejor descritos son: el lóbulo olfatorio que recibe aferencias directas de los quimiorreceptores de la antena I (Sandeman y Denburg, 1976; Sandeman et al., 1993); el neuropilo lateral de la antena I que recibe aferencias primarias mecanosensoriales, propioceptivas y olfatorias (Yoshino et al., 1983; Roye, 1986; Mellon y Murger, 1990) y el lóbulo accesorio que recibe aferencias del lóbulo olfatorio y aferencias del sistema visual (Sandeman y Sandeman 2000; Sullivan y Beltz, 2001).

El ganglio torácico se ubica ventralmente sobre la región medial del cefalotórax (**Figura 6 A y C**). Este ganglio posee glándulas neuroendocrinas y neuropilos que constituyen centros de regulación visceral y centros motores del animal (Sandeman, 1982).

Paradigma de aprendizaje y memoria

Chasmagnathus es la presa preferida de muchas gaviotas, en consecuencia, un objeto que se aproxima o mueve por encima del animal provoca en éste una reacción de escape. Si bien la respuesta de escape es la reacción más común, el cangrejo posee al menos otras dos estrategias defensivas en su repertorio, una respuesta agresiva, en la cual expone sus quelas, y un comportamiento de inmovilidad o congelamiento.

La respuesta de escape del cangrejo frente a un estímulo visual de peligro (EVP) es fácilmente evocable y cuantificable de manera muy confiable en el laboratorio. Esto, junto a otras ventajas experimentales que ofrece *Chasmagnathus*, algunas de las cuales serán descritas a lo largo de esta tesis, fueron las razones para que cerca de 1984 el Dr. Maldonado iniciara, junto a un grupo de becarios, un programa de investigación sobre las bases fisiológicas del comportamiento utilizando como modelo experimental este cangrejo. Veinte años (no es nada) más tarde, el paradigma de *Chasmagnathus* para estudios de aprendizaje y memoria constituye un modelo de investigación reconocido internacionalmente (Maldonado, 1998; Romano et al, 2006b).

El EVP que se utiliza en este paradigma consiste en el desplazamiento de una pantalla por encima del animal, que no conlleva aparejado ningún daño inmediato para el cangrejo. Frente a este estímulo *Chasmagnathus* despliega una típica respuesta de escape que decae con una curva de forma característica luego de unas pocas presentaciones del EVP. La reducción de la respuesta durante la presentación repetida del EVP no puede ser explicada en términos de fatiga motora o adaptación sensorial (Lozada et al., 1990). De hecho, la reducción de la respuesta de escape frente al EVP es el resultado de un proceso mnésico que persiste por al menos 5 días luego de concluido el entrenamiento (Maldonado et al., 1997).

Primeramente este proceso mnésico fue considerado un ejemplo más de habituación de largo término y así se lo denominó (Romano et al., 1990; Tomsic y Maldonado, 1990). Sin embargo, resultados posteriores demostraron que se trata de un aprendizaje asociativo determinado por la asociación del EVP (señal) con el contexto de entrenamiento (Tomsic et al., 1998). A la memoria adquirida se la denominó memoria contexto-señal (MCS) (**Figura 8 A**). Esta memoria se adquiere siempre que se aplique un entrenamiento espaciado, que consiste en 15 o más ensayos con un intervalo entre ensayos mayor a 30 segundos (Pedreira et al., 1998). La capacidad de adquisición de la MCS en *Chasmagnathus* es sensiblemente

superior a la de otras especies de cangrejos filogenéticamente emparentadas pero que difieren en las características de su hábitat. Este fenómeno evidencia una adaptación de las capacidades cognitivas de *Chasmagnathus* frente a las presiones ecológicas que debe enfrentar en su entorno natural (Tomsic et al., 1993).

En términos generales la MCS es de adquisición rápida y robusta. La

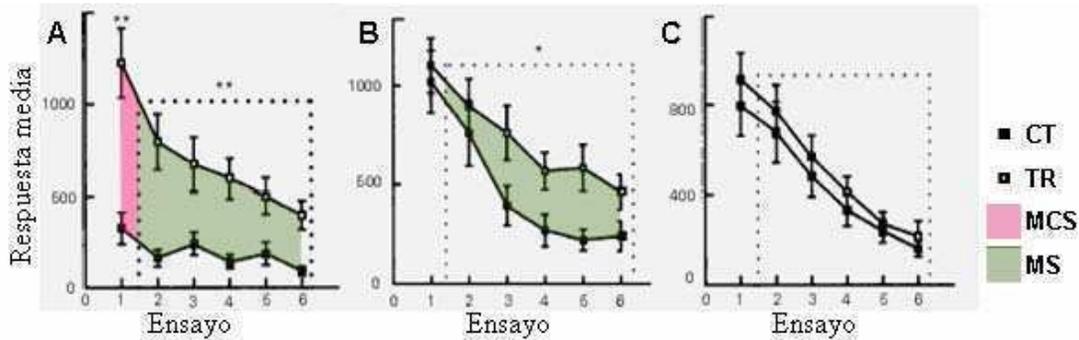


Figura 8: Sesión de evaluación de animales entrenados 24 horas antes en forma espaciada y masiva. Ordenadas, medias del nivel de respuesta de cada ensayo \pm el error estándar. CT, grupo control (que permaneció durante todo entrenamiento en los actómetros pero que no recibió el EVP); TR grupo entrenado. **A.** Entrenamiento espaciado de 15 ensayos con un intervalo entre ensayos de 171 seg. **B.** Entrenamiento masivo de 300 ensayos con un intervalo entre ensayos de 2 seg. **C.** Entrenamiento masivo de 15 ensayos con un intervalo entre ensayos de 2 seg. * $P < 0.01$ entre TR y CT en el primer ensayo de evaluación o en el reentrenamiento (caja de línea punteada); **ídem pero $P < 0.005$. Maldonado et al, 1997.

evocación de memoria es específica del tipo de estímulo visual utilizado, del intervalo entre estímulos y de la fase circadiana en la que ésta fue adquirida (Romano et al., 1990; Pedreira et al., 1998; Pereyra et al., 1996). A nivel comportamental se observa que el entrenamiento con el EVP provoca el reemplazo de la respuesta de escape por otra respuesta defensiva de inmovilidad, el congelamiento (Pereyra et al., 2000).

Cabe señalar que si el intervalo entre ensayos es menor a 9 segundos, lo que se conoce como un entrenamiento masivo, se produce una pronunciada reducción de la respuesta de escape, que no da lugar a retención de largo término (con un número de ensayos igual al entrenamiento espaciado **Figura 8 C**), llamada memoria señal (MS) (**Figura 8 B**) (Pedreira et al., 1998). En el capítulo 1 de esta tesis y siguiendo estas características de la adquisición en *Chasmagnathus*, diseñamos un entrenamiento continuo ($IEE \cong 0$) con la misma duración que el espaciado, pero que no genera memoria de largo término, aun con un gran número de iteraciones (**Figura 1 A** del capítulo 2).

Las características propias de la formación de la memoria en *Chasmagnathus* se enumeran a continuación:

1. La memoria de largo término se puede adquirir con 15 o más presentaciones del estímulo y con un intervalo entre estímulos de al menos 30 segundos (**Entrenamiento Espaciado**) (Pedreira et al., 1997).
2. Si el intervalo entre estímulos está entre 9 y 2 segundos, por lo menos 100 presentaciones son necesarias para inducir una retención a 24 horas (**Entrenamiento Masivo**) (**Figura 8 B**) (Pedreira et al., 1997).
3. La memoria de largo término inducida por un **Entrenamiento Espaciado** se establece por una asociación entre el contexto y la repetición del estímulo (Tomsic et al., 1998). Su evocación es inducida por la sola reinstalación en el contexto de entrenamiento y por lo tanto se evidencia como una disminución de la respuesta de escape desde la primera presentación del estímulo durante la evaluación (**Figura 8 A**).
4. El **Entrenamiento Masivo** induce una retención que se evidencia recién desde la segunda presentación del estímulo durante la evaluación, siendo necesaria la primera presentación como recordatorio.
5. La reducción del nivel de escape inducido por un **Entrenamiento Espaciado** se produce por un cambio de la estrategia defensiva desplegada por el animal ante la presentación del estímulo: El animal deja de escapar y exhibe una respuesta críptica (permanece inmóvil) o "freezing". El descenso de la respuesta de escape producido por el **Entrenamiento Masivo** no se debe a la adopción de una estrategia defensiva sino a la adquisición de un estado de "indiferencia" al estímulo (Pereyra et al., 2000).
6. El caso extremo en el cual los intervalos entre ensayos se eliminan completamente, se denomina **entrenamiento continuo** y solo induce un descenso de la respuesta de escape a corto término y la recuperación completa a las 24 horas (**Figura 8 C**).

Estas características permitieron determinar que la reducción en la respuesta de escape inducida por la presentación reiterada del estímulo, inicialmente denominada habituación, se debe a la existencia de dos procesos aislados:

Memoria Contexto-Señal (MCS): adquirida por Entrenamiento Espaciado: 15 o mas ensayos separados por intervalos de al menos 30 segundos

Memoria Señal (MS): adquirida por un Entrenamiento Masivo; 100 o más ensayos con intervalos menores de 9 y mayores de 2 segundos

Hoy en día estos dos paradigmas han sido caracterizados y diferenciados de manera mecánica y farmacológica, y existen evidencias de que ambos son inducidos paralelamente por un entrenamiento espaciado y de manera simultánea contribuyen a la evocación.

En la **Tabla 1** se enumeran las principales características de ambos paradigmas

	<u>Memoria Contexto-Señal</u>	<u>Memoria Señal</u>
<u>Adquisición y Evocación</u>		
<u>Adquisición</u>	<u>≥15 ensayos</u> <u>>30 seg de intervalo entre ensayos</u>	<u>>100 ensayos</u> <u>2 seg < intervalo entre ens. < 9 seg</u>
<u>Evocación</u>	<u>Desde el primer ensayo en una sesión de evaluación y toda la fase de re-entrenamiento</u>	<u>Desde el segundo ensayo y fase de re-entrenamiento</u>
<u>Contexto especificidad</u>	<u>Memoria específica y asociada al contexto</u>	<u>Memoria no asociada al contexto (evocación contexto-inespecífica)</u>
<u>Persistencia</u>	<u>Al menos por 5 días</u>	<u>Hasta 48 horas</u>

(Hermitte et al., 1999; Pedreira et al., 1997; Pereyra et al., 1996, 2000).

La **Tabla 2** resume las características farmacológicas y las principales vías de señalización involucradas en estos dos tipos de memoria.

	Memoria Contexto-señal	Memoria señal
Características farmacológicas		
Neurotransmisores y neuropéptidos		
Angiotensinas	Modulado positivamente por las angiotensinas endógenas. ⁽¹⁾ (Angiotensina = facilitadora) (Saralasin = Amnésica).	Modulado positivamente por las angiotensinas endógenas. ⁽¹⁾
β- Amiloide	Bloqueada por fibrillas β-amiloide secretadas naturalmente. ⁽²⁾	-
Acetilcolina	Dependiente de mecanismos muscarínicos. ⁽³⁾ (bloqueada por escopolamina y facilitada por oxotremorina)	No es afectada por escopolamina. ⁽³⁾
Glutamato	Dependiente de receptores de Glutamato tipo NMDA. ⁽⁴⁾ (bloqueado por APV y MK801)	Independiente de receptores tipo NMDA. ⁽⁴⁾
Octopamina	Amnésica hasta ½ hora post-entrenamiento. ⁽⁵⁾	-
Serotonina	Amnésica hasta 3 horas post-entrenamiento. ⁽⁶⁾	-
Quinasas		
PKA	Dependiente de la actividad de PKA durante el entrenamiento y entre las 4 y 8 hs. post- entrenamiento ⁽⁷⁾	Independiente de la actividad de PKA. ⁽⁷⁾
ERK	Dependiente de la actividad de ERK a los 45 min. Post-entrenamiento. ⁽⁸⁾	-
Transcripción y síntesis de proteínas		
Cicloheximida Actinomicina D	Dependiente de la síntesis de ARN y proteínas. ⁽⁹⁾	Independiente de la síntesis de ARN y proteínas. ⁽¹⁰⁾
Activación de FT	Dependiente de la activación de factores transcripción Rel/NF-kappa B. ⁽¹¹⁾ (bloqueada por sulfasalazina inhibidor de la activación de NF-kappa B. ⁽¹²⁾	No induce activación de Rel/NF-kappa B. ⁽¹¹⁾

Tabla 2: Vías de transducción involucradas en la consolidación de la memoria en *Chasmagnathus*.

Delorenzi & Maldonado, 1999⁽¹⁾; Romano et al 2003⁽²⁾; Berón de Astrada y Maldonado ⁽³⁾; Troncoso & Maldonado, 1999⁽⁴⁾; Kacser, 2006⁽⁵⁾; Pedeta, 2006⁽⁶⁾; Locatelli et al, 2002⁽⁷⁾; Feld et al, 2005⁽⁸⁾; Pedreira et al., 1996⁽⁹⁾; Hermitte et al., 1999⁽¹⁰⁾; Freudenthal & Romano, 2000⁽¹¹⁾; Merlo et al., 2002, ⁽¹²⁾.

Presencia y activación del NF-kappa B en la consolidación de la memoria de largo término en *Chasmagnathus*.

El NF-kappa B se encuentra distribuido en forma ubicua en el sistema nervioso de

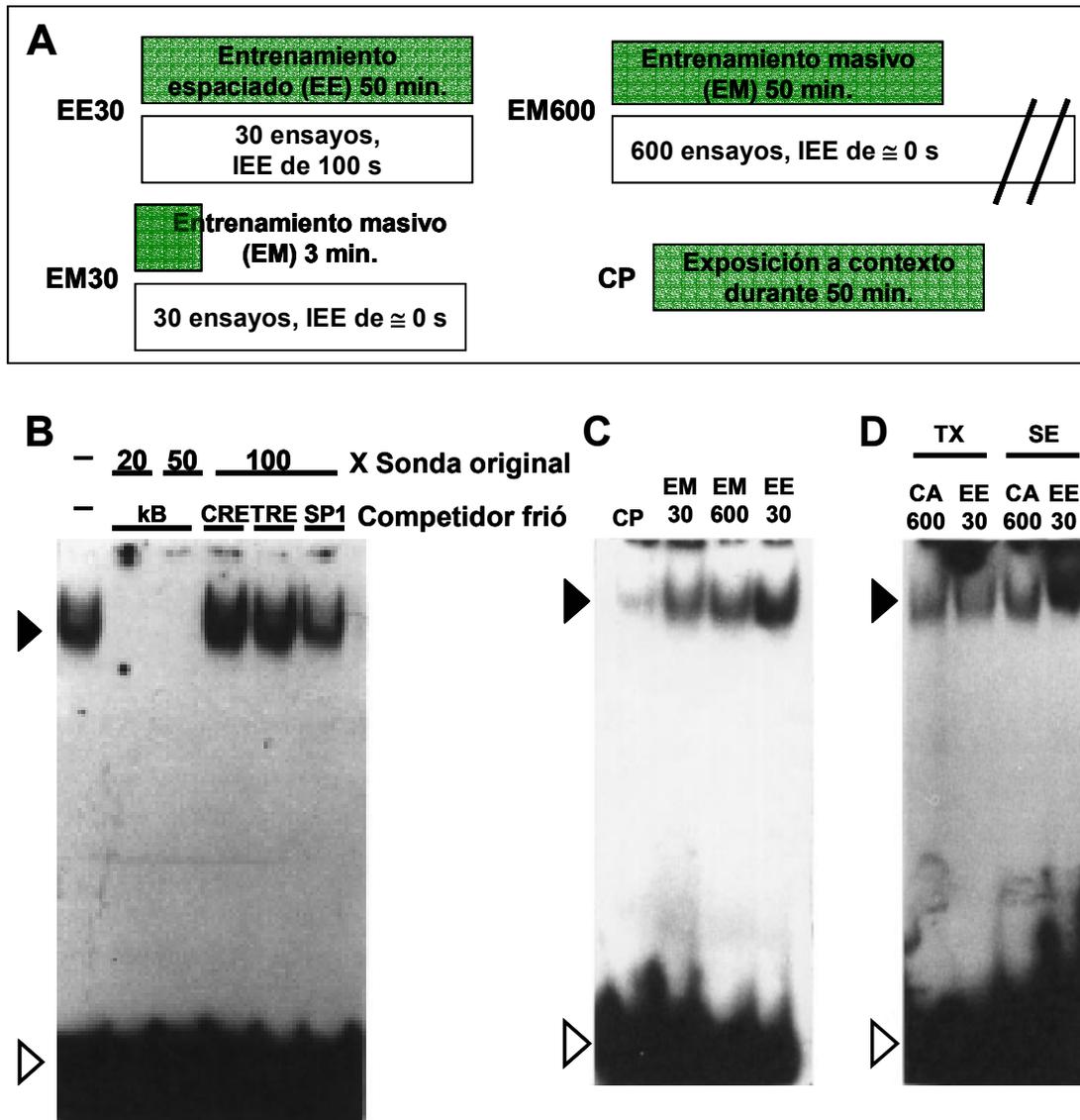


Figura 9: El entrenamiento espaciado induce una mayor activación del NF-kappa B que un entrenamiento masivo. A. Diagrama de los protocolos de entrenamiento y control utilizados en **C**; los ensayos duran 5 seg. cada uno. **B.** Ensayo de especificidad para retardos electroforéticos de extractos nucleares de ganglio supraesofágico, competidos con secuencias consenso no relacionadas. **C.** Retardo electroforético de extractos nucleares del ganglio supraesofágico correspondientes a los 4 grupos descritos en **A**. **D.** Comparación de los retardos electroforéticos de extractos nucleares de ganglio torácico y supraesofágico de grupos de animales CA y EE. Los extractos se realizaron inmediatamente después de finalizado el entrenamiento (grupos de 20 animales). Los triángulos negros marcan los retardos específicos correspondientes al complejo ADN-factor de transcripción, y los triángulos blancos señalan el ADN marcado no unido a proteína.

Chasmagnathus, y puede ser detectado en forma específica utilizando la técnica de

retardo electroforético (EMSA). La **Figura 9 B** muestra un ensayo de competencia utilizando extractos nucleares obtenidos a partir del ganglio supraesofágico. NF-kappa B se activa en el cangrejo luego de un entrenamiento espaciado que induce una memoria de largo término, pero esto no sucede ni en los entrenamientos continuos de igual número de ensayos o igual duración, ni tampoco en los animales expuestos al mismo contexto pero no entrenados (**Figura 9 A y C**). Esta activación del NF-kappa B ocurre en el ganglio supraesofágico, principal centro nervioso de procesamiento de información sensorial e integración de funciones cognitivas, pero no en el ganglio torácico (**Figura 9 D**) encargado de coordinar la regulación visceral y centros motores del animal (Sandeman, 1982). Estos resultados de mi tesis de licenciatura mostraron que la activación del factor es específica del tipo de entrenamiento que induce una memoria de largo término, al mismo tiempo que es específica de al menos una región del SNC.

Todo el trabajo de esta tesis doctoral se basa en este estudio inicial y de los estudios que derivaron en una mayor profundización del análisis del fenómeno. El trabajo realizado en *Chasmagnathus* nos condujo a emprender estudios comparativos en modelos de memoria y plasticidad en vertebrados.

Modelo de memoria en ratón

El condicionamiento clásico requiere de la presencia de un refuerzo de cierta intensidad aportado por el estímulo incondicionado para obtener la respuesta condicionada. El refuerzo puede ser en términos generales de dos tipos: apetitivos, que tienen un refuerzo de signo positivo, o aversivos, con refuerzo de signo negativo. En esta tesis se utilizó una tarea de evitación inhibitoria (inhibitory avoidance) en ratón, un aprendizaje asociativo que utiliza un refuerzo aversivo. En esta versión, el ratón se coloca en una plataforma en la entrada de un compartimiento que se encuentra a oscuras, y una vez que el ratón traspone la entrada con sus cuatro patas, se le aplica un choque eléctrico suave en las patas (Kopf y Baratti, 1994). Una descripción más detallada de esta tarea de aprendizaje se encuentra en materiales y métodos. El ratón aprende en un solo ensayo de entrenamiento a asociar la entrada al compartimiento con una descarga eléctrica generando una memoria de largo término que puede durar hasta por lo menos un mes (Kopf y Baratti, 1996). En este entrenamiento, el animal debe realizar la

respuesta de entrada a la cámara, antes de que se le administre el choque eléctrico. Como resultado es posible que el choque eléctrico actué como un condicionamiento clásico Pabloviano, asociando el contexto a la cámara oscura y también como un condicionamiento operante, castigando el comportamiento de entrada a la cámara, al mismo tiempo (Tinsley et al, 2004).

Se sabe que en este tipo de memorias están involucradas ciertas áreas del cerebro, siendo las que mas se han estudiado, la amígdala y el hipocampo.

La amígdala cumple un rol importante para el procesamiento de las memorias que involucran emociones y en particular miedo (revisado en Fendt y Fanselow 1999). Si bien esta área del cerebro cumple un papel en la evitación inhibitoria, lesiones en la amígdala solo atenúan la retención, pero no la hacen desaparecer (Cahill y McGaugh, 1990).

En el caso del hipocampo, su papel en la evitación inhibitoria parece similar al que cumple en el condicionamiento de miedo (Fear Conditioning). Lesiones pre y post entrenamiento en el hipocampo, ya sea en la región CA1 o en la región CA3, reducen la consolidación del aprendizaje de evitación inhibitoria (Martinez et al, 2002). En concordancia con los datos de lesiones, infusiones post entrenamiento de inhibidores de PKA (Rp-cAMPs), de calcio calmodulina quinasa II (KN-62), y el antagonista de receptores de tipo NMDA (AP5), reducen la consolidación del aprendizaje de evitación inhibitoria (Vianna et al, 2001). Adicionalmente, infusiones post-entrenamiento indican que el hipocampo está involucrado en la consolidación de aspectos contextuales pero no aversivos del aprendizaje de evitación inhibitoria. La preexposición de los animales al contexto de entrenamiento bloquea el efecto amnésico de inyecciones intra-hipocampal post entrenamiento de AP5, pero este bloqueo no sucede si las inyecciones son intra-amígdala, indicando que el hipocampo es necesario para formar la representación contextual, pero no la asociación aversiva (Roesler et al. 2003).

El papel de NF-kappa B en este paradigma se abordó estudiando la cinética de activación del factor de trascrición en el hipocampo e interfiriendo con la actividad de NF-kappa B utilizando los inhibidores sulfasalazina y kB decoy mediante administración intracerebroventricular.

Hipótesis y objetivos.

El marco teórico que agrupa las hipótesis y objetivos planteados en esta tesis comprende, conforme a lo explicado a lo largo de esta introducción, a la activación de factores de transcripción específicos y sus vías de señalización como partes fundamentales en la construcción de la representación neural de la memoria. En particular, regulando la transcripción de genes blanco, en forma espacial y temporalmente controlada.

Los objetivos generales de esta tesis son dos:

1^º) Estudiar la participación de la vía de transducción de factores de transcripción de la familia Rel/NF-kappa B en la formación de la memoria de largo término y comparar su conservación evolutiva entre dos modelos de memoria, uno en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus* y otro en el ratón *Mus musculus*.

2^{do}) Comparar la participación de este tipo de factores de transcripción entre dos formas de plasticidad neuronal en una misma estructura, el hipocampo de ratón. Estos dos procesos, son la memoria de evitación inhibitoria y la potenciación de largo termino de la vía perforante del hipocampo. De esta manera tratamos de abordar primero el interrogante acerca de la generalidad de la función de NF-kappa B como regulador de la transcripción necesaria para la memoria de largo termino entre especies filogenéticamente alejadas y, segundo, mediante una aproximación “top-down”, generalizar el uso de la transcripción dependiente de NF-kappa B entre la memoria de largo término y la potenciación de largo termino, modelo de plasticidad cuyos mecanismos podrían también ser parte de al menos algunas fases de la memoria, como sugieren un conjunto importante de evidencias.

Los antecedentes que indican un posible rol de factores de transcripción de la familia Rel/NF-kappa B en la formación de la memoria en *Chasmagnathus* pertenecen a los resultados obtenidos durante mi tesis de licenciatura y son el punto de partida de esta tesis.

La hipótesis de esta tesis propone que el factor de transcripción NF-kappa B es parte de los mecanismos necesarios y específicamente involucrados en el proceso de consolidación de fenómenos de plasticidad neuronal, permitiendo su duración en el tiempo.

En el caso de la memoria de largo término, se propone que NF-kappa B es un fenómeno intrínseco del proceso mnésico, inducido por el propio patrón de estímulos que induce la formación de la memoria y no un efecto de eventos accesorios o concomitantes a la misma. En esta misma línea argumental, la activación de este factor de transcripción es parte de la inducción de la potenciación de largo término y no solo una respuesta a la estimulación eléctrica.

A continuación resumiré los objetivos particulares planteados para esta tesis, los cuales serán luego explicados en detalle a lo largo de los siguientes capítulos en los que esta organizada:

- a. El primer objetivo de esta tesis fue caracterizar el factor de transcripción en *Chasmagnathus*. Identidad y localización utilizando EMSAs, Western Blot e inmunohistoquímica.
- b. La segunda serie de objetivos responde a preguntas de orden descriptivo, que surgen de la ausencia de conocimiento previo acerca de las características de la activación del NF-kappa B durante la consolidación de la memoria. 1) Establecer los requerimientos comportamentales para la activación del factor de transcripción (número de ensayos y forma de presentación del entrenamiento); 2) describir la cinética de la activación del factor de transcripción; y 3) evaluar la distribución de su activación a nivel subcelular.
- c. El tercer objetivo fue determinar si el factor de transcripción se encontraba involucrado en la consolidación de la memoria en vertebrados, utilizando como modelo a la evitación inhibitoria en ratón.
- d. El último objetivo de esta tesis fue determinar si existe una correlación entre la actividad del NF-kappa B y la inducción de la potenciación de largo termino, utilizando como modelo a la potenciación de la vía perforante del hipocampo del ratón *in vivo*.

Capitulo 1.
Caracterización de NF-
kappa B en
Chasmagnathus.

Introducción

Para el momento del inicio de esta tesis se habían obtenido evidencias sobre la ventana temporal de dependencia de síntesis proteica durante la consolidación de la memoria de largo término en *Chasmagnathus* (Pedreira et al, 1995) y sobre el requerimiento de síntesis de ARN mensajero (Pedreira et al., 1996). Al mismo tiempo, habíamos obtenido las primeras evidencias sobre la activación de NF-kappa B después de un entrenamiento que memoria de largo termino (Freudenthal et al, 1998). Considerando estos antecedentes, comenzamos a trabajar en la caracterización de este factor de transcripción en *Chasmagnathus* durante la consolidación de la memoria.

Con este objetivo se eligió la técnica de retardo de la movilidad electroforética de ADN unido a proteína (EMSA), que ya habíamos utilizado. Esta técnica es ideal para identificar factores de transcripción y para determinar su actividad de unión a secuencias específicas de ADN (secuencias consenso). También es un método adecuado para estimar la activación de factores de transcripción como NF-kappa B cuya activación permite su translocación al núcleo y su unión a secuencias consenso. La translocación al núcleo puede ser estimada utilizando extractos nucleares. Este primer capitulo se centra en caracterizar el complejo proteico detectado mediante EMSA, que se obtuvo inicialmente, utilizando para tal fin varias técnicas independientes. De los factores de transcripción de la familia Rel/NF-kappaB, pocos se encuentran identificados en invertebrados y ninguno en crustáceos. Por lo tanto este estudio presenta también un interés comparativo.

La comprobación de que la memoria largo término depende de síntesis proteica y de síntesis de ARN mensajero proviene de experimentos farmacológicos en los cuales las inyecciones fueron administradas de manera sistémica. Por este motivo, no se disponía en el momento de iniciar estos trabajos de información sobre las áreas del sistema nervioso en las que tienen lugar los cambios en la expresión génica necesarios para la

consolidación y, en particular, en las que se encuentra el FT NF-kappa B. Por esta última razón se decidió realizar EMSAs con extractos nucleares provenientes de distintas áreas del sistema nervioso central y, por otro lado, inmunohistoquímica del protocerebro lateral y el ganglio supraesofágico.

Resultados.

Caracterización del retardo electroforético para NF-kappa B de extractos proteicos provenientes del sistema nervioso del cangrejo *Chasmagnathus*.

Se realizaron EMSAs utilizando la secuencia consenso para NF-kappa B como sonda. Se encontró un retardo específico en todos los extractos nucleares de los tejidos nerviosos evaluados: protocerebro lateral, ganglio supraesofágico, ganglio torácico y tracto protocerebral (para este último, se utilizó un homogenato total ya que de obtener extractos nucleares, hubieran provenido exclusivamente de glia, considerando que no hay grupos de neuronas en el tracto protocerebral), Figura 1 A. La especificidad del retardo electroforético se comprobó compitiendo el retardo con oligonucleótidos no marcados (dato no mostrado), tal como se describió previamente en la introducción. Una vez establecida la distribución del NF-kappa B entre los distintos ganglios del sistema nervioso central de *Chasmagnathus*, nos abocamos a definir su distribución subcelular. En la Figura 1 B, podemos observar, que el factor de transcripción se encuentra tanto en el citoplasma como el núcleo, pero los complejos ADN-proteína en cada fracción difieren en su retardo, siendo de mayor retardo el complejo más abundante en el citoplasma y de menor retardo el complejo nuclear, posiblemente reflejando una diferencia en el peso molecular. Usando un protocolo modificado (ver materiales y métodos) se pudieron obtener también extractos proteicos provenientes de sinaptosomas, observándose aquí también un retardo específico (Figura 1 B).

Posteriormente, se realizaron extractos de distintas áreas del ganglio supraesofágico, dividiéndolo en tres zonas diferentes: grupo neuronal 6,

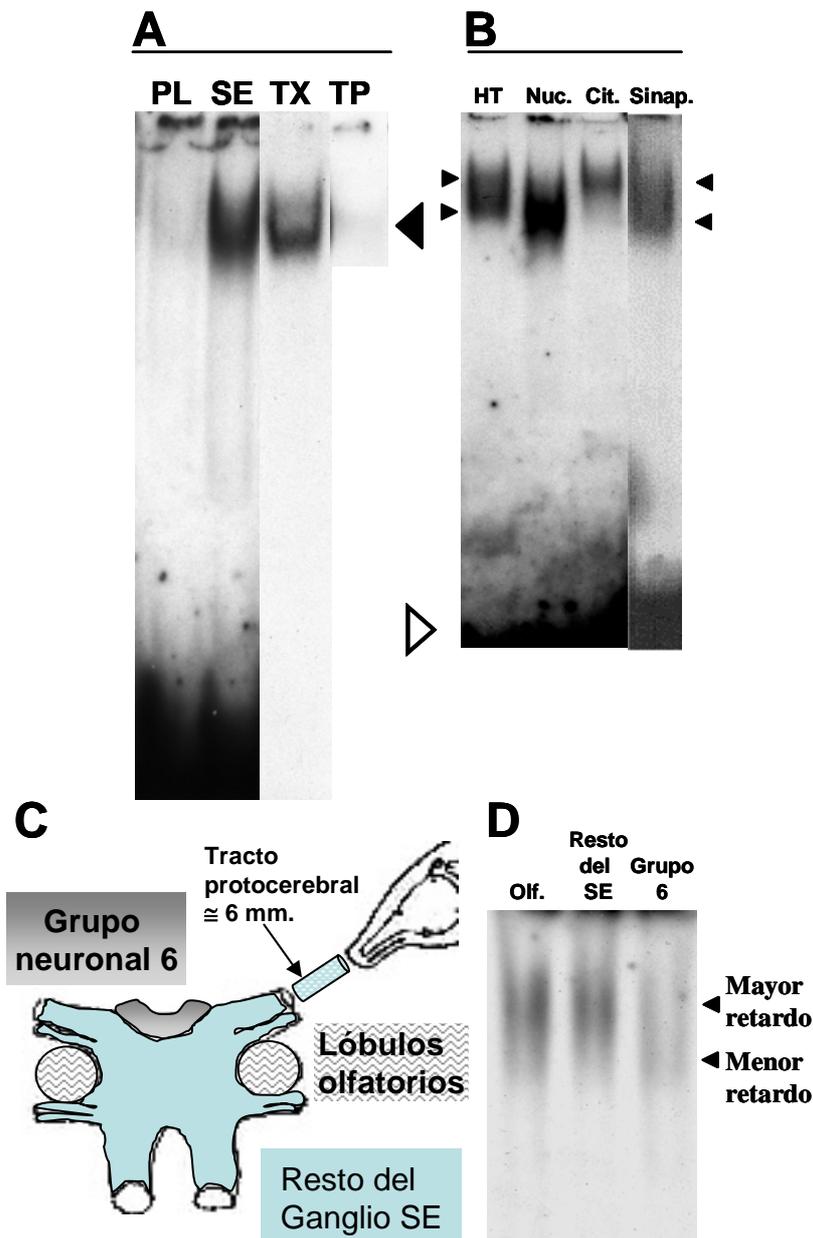


Figura 1: Localización de retardos electroforéticos específicos de NF-kappa B en el sistema nervioso de *Chasmagnathus*. **A.** NF-kappa B en el sistema nervioso de *Chasmagnathus*: el protocerebro lateral (PL), el ganglio supraesofagico (SE), el ganglio torácico (TX) y el tracto protocerebral (TP) entre el ganglio supraesofagico y protocerebro lateral, poseen retardos para NF-kappa B. **B.** Localización subcelular de la actividad de retardo, en homogenato total (HT), extracto nuclear (Nuc.), extracto citoplasmático (Cit.) y en extractos sinaptosomales (sinap.) **C.** Morfología del ganglio supraesofágico mostrando el lóbulo olfatorio, el grupo celular 6 y el protocerebro lateral. **D.** Retardos electroforéticos de extractos totales de las 3 zonas del SE usadas: lóbulos olfatorios (principalmente neuropilo con pocas neuronas), grupo celular 6 (principalmente neuronal) y resto del SE. Los triángulos negros marcan los retardos específicos correspondientes al complejo ADN-factor de transcripción, y los triángulos blancos marcan el ADN marcado no unido a proteína.

lóbulo olfatorio y el resto del ganglio supraesofágico. La primera zona contiene una proporción mayor de núcleos neuronales mientras que las dos últimas zonas resultan enriquecidas en citosol dado que contienen una mayor proporción de neuropilos (áreas sin somas neuronales) (Figura 1 C). De acuerdo con ello, estos tres homogenatos totales vuelven a mostrar dos retardos del complejo ADN-proteína, siendo proporcionalmente mayor la cantidad del complejo de mayor retardo en los extractos de lóbulo olfatorio y resto de ganglio, mientras que en el extracto proveniente del grupo neuronal 6 se ve enriquecido en el complejo de menor retardo (Figura 1 D).

El tamaño del factor de transcripción se estimó realizando ensayos de unión covalente ADN-proteína, por exposición a luz ultravioleta (UV crosslinking, $\lambda=254$ nm). La Figura 2 A muestra un ensayo de crosslinking. Un ensayo de unión típico de incubación de ADN marcado con extractos nucleares es expuesto a distintos tiempos de radiación ultravioleta. La radiación ultravioleta convierte las interacciones ADN-proteína en uniones covalentes, y de esta manera estos complejos, normalmente lábiles, ahora se pueden analizar en el medio desnaturizante de un gel SDS page (Molnar et al, 1995). Muchas de las interacciones inespecíficas ADN-proteína también pasan a ser uniones covalente, por eso hay gran cantidad de bandas que no son de interés. Para identificar la banda específica se utilizaron dos criterios. El primero es que la banda es competida específicamente por un exceso de sonda no marcada (últimas dos calles de la Figura 2 A, señaladas por los triángulos amarillo y negro), y el segundo es la intensidad de la señal del complejo ADN proteína, en función del tiempo de exposición a luz ultravioleta, (Figura 2 A). La banda específica competida, posee una pendiente claramente distinta de las otras bandas no específicas señaladas en la Figura 2 B. Se determinó un peso molecular aproximado de 61 kD, considerando que la proteína está unida a un oligonucleótido.

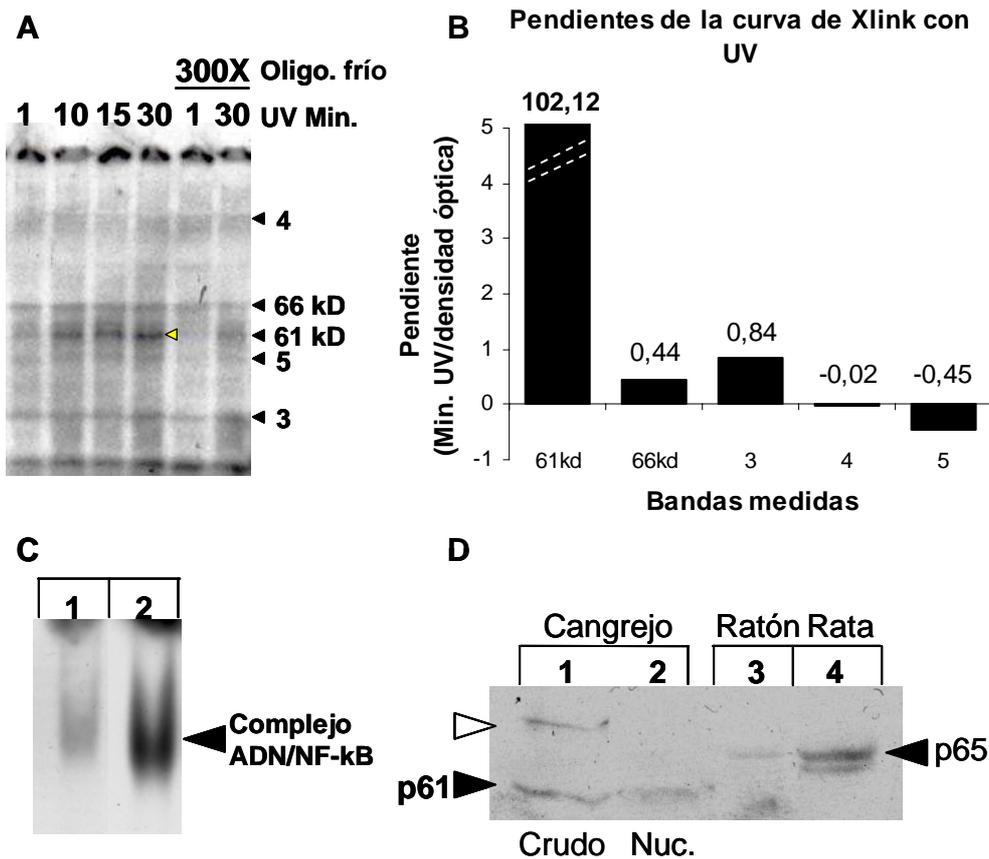


Figura 2: A. Unión al ADN a distintos tiempos de exposición a luz ultravioleta. Evaluado en un gel SDS page (desnaturalizante), calles 1-30 min. Las calles finales 1 y 30 están competidas con exceso de ADN frío. **B.** Pendientes de intensidad de las distintas bandas en función del tiempo de exposición a UV (254 nm). La banda correspondiente al tamaño de 61 kd se une al ADN con una cinética diferente de otras bandas, a su vez es la única que se compete (flechas amarillas). **C.** EMSA con la secuencia consenso kB, línea 1 inmunoprecipitación de IκB de extractos citoplasmáticos; coimmunoprecipitación de NF-κappa B. Calle 2 unión al ADN en extractos nucleares. **D.** WB con anticuerpo contra p65 NLS. Calle 1, extracto nuclear crudo, 2 extracto nuclear lavado, 3 extracto total de hipocampo de ratón y 4 hipocampo de rata.

Caracterización de la vía de señalización del NF-kappaB.

Como NF-kappa B se encuentra en el citoplasma unido a una subunidad reguladora el Ikb, esto nos daba la oportunidad de confirmar la identidad del factor de transcripción a través de una evidencia diferente a la competencia de los retardos. Con un anticuerpo que se une específicamente a la subunidad Ikb (anticuerpo anti Ikb, SC 847) se incubaron extractos citoplasmáticos, con el objetivo de coimmunoprecipitar el factor de transcripción. Con estos extractos se realizaron retardos electroforético, desplazando a Ikb con un exceso de la secuencia consenso de NF-kappaB, Figura 2 C, logrando un retardo en la (calle 1) de características similares al obtenido de a partir de un extracto nuclear (calle 2). Este resultado indica que el complejo que vemos en el retardo de los extractos proteicos se encuentra en el citoplasma unido a una proteína que es reconocida por el anticuerpo anti Ikb. Como una tercera evidencia de la existencia de un factor de transcripción similar a NF-kappa B en *Chasmagnathus*, encontramos un anticuerpo (p65 NLS, mab3026, Chemicon) que reconoció en western blot una banda similar a la encontrada en roedores, Figura 2 D. Este anticuerpo se une, en roedores, a la secuencia de localización nuclear o NLS de la subunidad p65 de NF-kappa B. Esta secuencia se encuentra ocluida por el Ikb en una gran proporción de los complejos citoplasmáticos (complejo inactivo de NF-kappa B), lo cual impide la translocación del factor de transcripción al núcleo e impide la unión al ADN (también oculta la zona de unión al ADN). El anticuerpo detectó dos bandas con gran intensidad (Figura 2 D, calle 1), resultando ser la banda de mayor tamaño una unión inespecífica a la hemocianina del cangrejo. Esta banda inespecífica desapareció cuando se lavaron los núcleos precipitados dos veces en buffer de homogenización antes de ser utilizados para la obtención de extractos nucleares (Figura 2 D, calle 2). La segunda banda, que no desapareció luego de los lavados, posee un tamaño aproximado de 61 kd. Este tamaño es cercano a los 65 kd mostrados en las banda reveladas en las calles 2 y 3, de la Figura 2 D, correspondientes a extractos de ratón y rata,

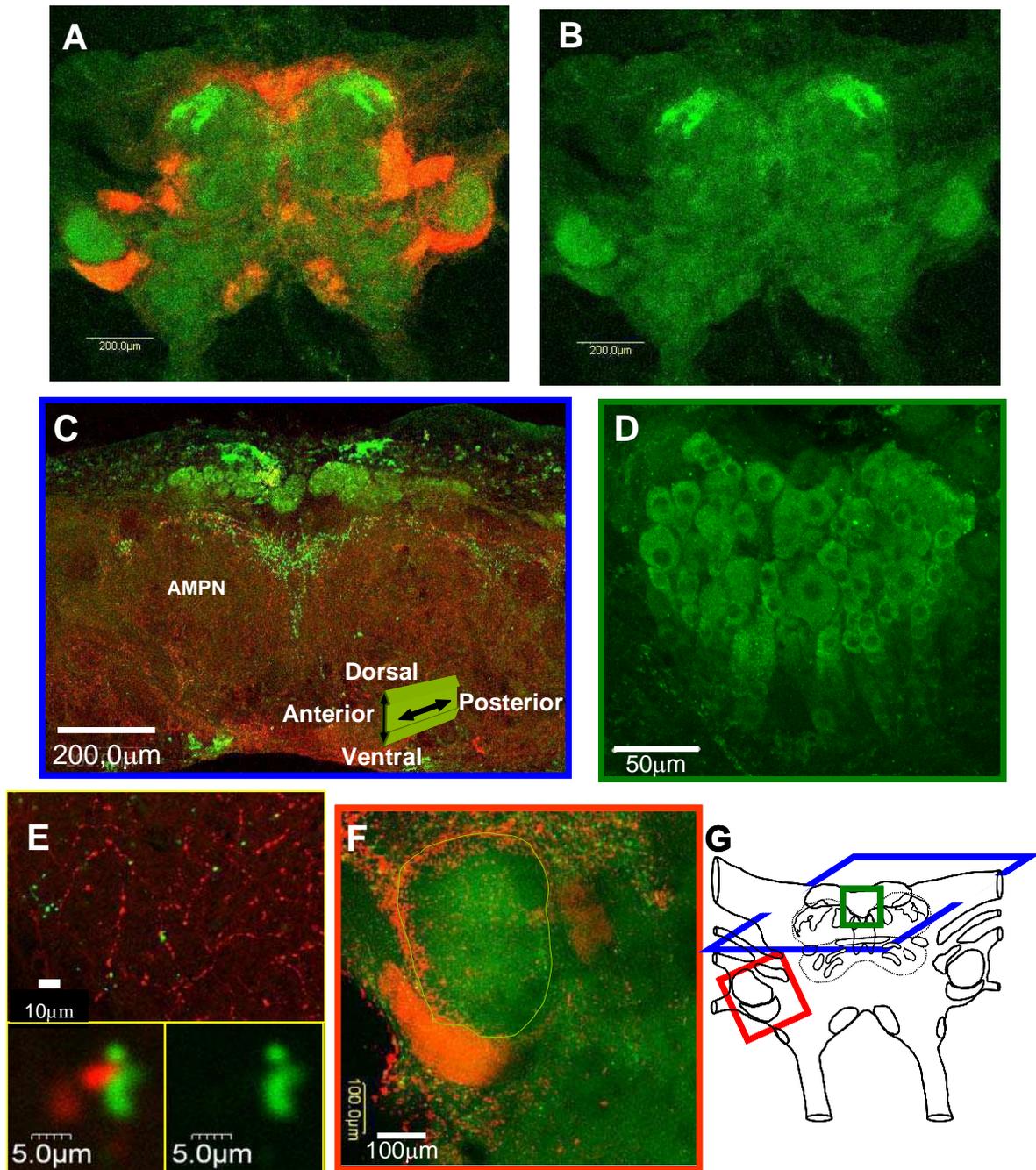


Figura 3: Distribución de señal tipo p65 en el ganglio supraesofágico. **A.** Tinción para p65 y núcleos marcados con ioduro de propídio. **B.** Distribución del 65 sólo. **C.** Tinción con anticuerpos contra p65 y serotonina en una en un corte transversal lateromedial. **D.** grupo neuronal 6 sección dorsal, con una tinción para p65. **E.** Detalle botones sinápticos con serotonina y p65. **F.** Detalle el lóbulo olfatorio con señal tipo p65 e ioduro de propídio. **G.** Esquema del ganglio supraesofágico señalando la posición de las imágenes. El color de los recuadros de cada imagen, indica la posición de las secciones en el esquema.

respectivamente. A su vez, el tamaño de proteína revelado por este anticuerpo se corresponde bastante bien con el tamaño indicado por el ensayo de UVcrosslinking.

Caracterización inmunohistoquímica de la localización de NF-kappa B activo en el sistema nervioso de *Chasmagnathus*.

Utilizando el anticuerpo anti p65 NLS se caracterizo la distribución del factor de transcripción en el pedúnculo óptico y el ganglio supraesofágico del sistema nervioso de *Chasmagnathus*. En todas las imágenes de inmunofluorescencia presentadas entre las figuras 3 a 7 la distribución de NF-kappa B se muestra en verde (Alexa 488) o, por inversión, en negro y la señal en rojo corresponde a ioduro de propídio (Marca células y núcleos) o a serotonina (rodamina), según se indica en cada epígrafe. Inicialmente, se observó marca en los vasos de sistema nervioso (datos no mostrados) que podría corresponder al pegado inespecífico a hemocianina. Sin embargo, ésta desapareció cuando los animales se perfundieron o cuando los ganglios se lavaron exhaustivamente antes de utilizarlos para la inmunohistoquímica, quedando en los controles (tejido sin anticuerpo primario) solo una tenue autofluorescencia atribuible a la fijación con paraformaldehido (datos no mostrados). Una vez eliminado este problema quedo a la vista la localización de marca específica del factor de transcripción, en el ganglio supraesofágico, en el tracto protocerebral y en los ganglios del pedúnculo óptico. Lo primero que resulta notable es que la mayoría del factor de transcripción se encuentra en el protocerebro (Figuras 3, 4, 5, 6, y resumido en 7). Respecto de la distribución a nivel celular, es considerable la proporción de la señal que se encuentra en los neuropilos, en procesos y marcas globulares que recuerdan a sinápsis (Figura 3 E). En co-marcaciones con serotonina, no hay colocalización aparente, pero ambas marcas se encuentran en cuerpos globulares del mismo tamaño, muchas veces en una disposición que recuerda a pre- y post-sinapsis (Figura 3 E). Las Figuras 3 A y B muestran la señal típica del factor de transcripción en el ganglio supraesofagico,

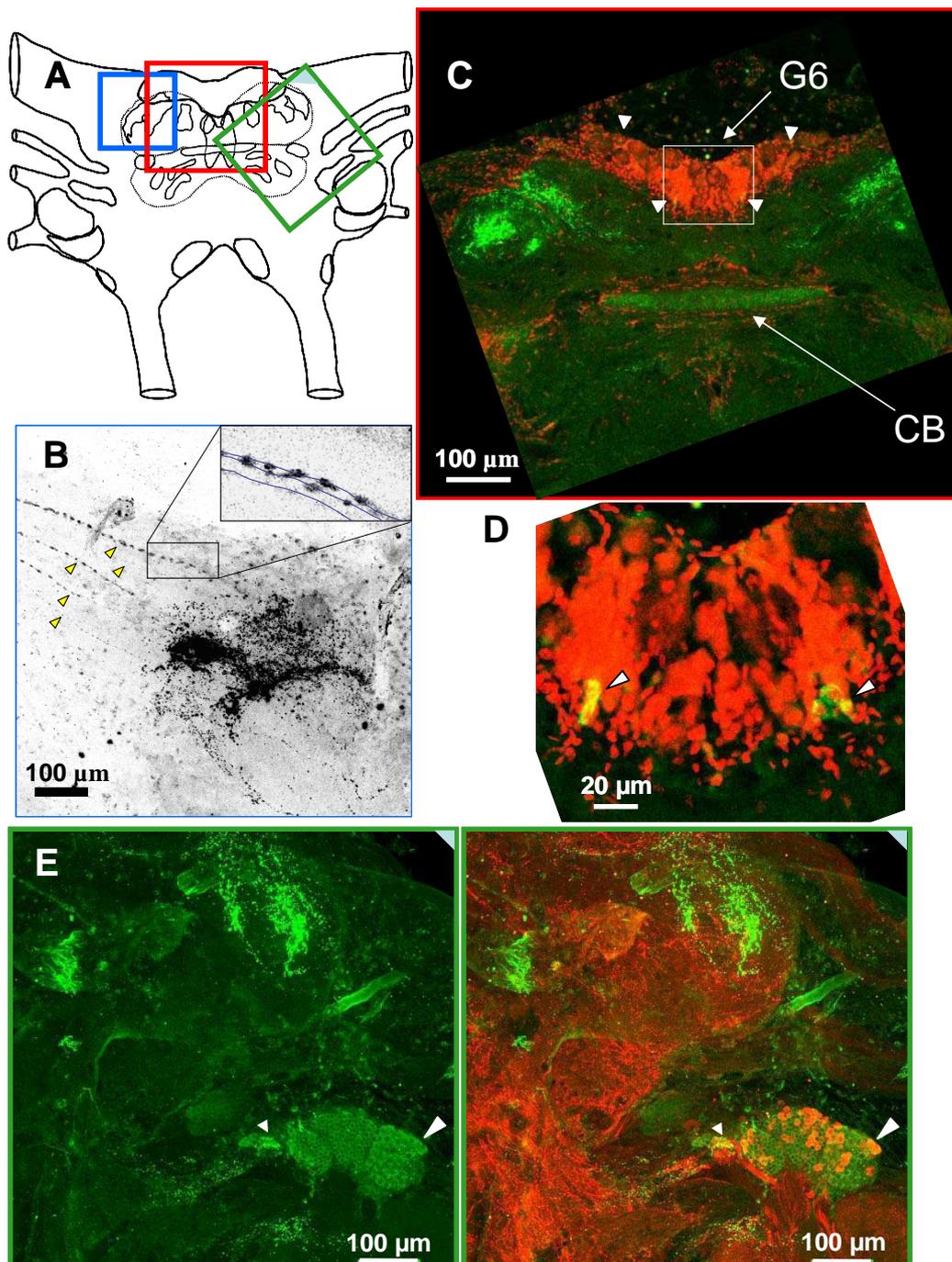


Figura 4: Localización de p65 en el ganglio supraesofágico, imágenes con mayor detalle. A. Esquema del supraesofágico mostrando la posición de las fotos. B. Detalle de la marca obtenida con el anticuerpo anti p65. Los triángulos amarillos señalan los somas de procesos que conectan el protocerebro lateral con el ganglio supraesofágico. C. Imagen mostrando el grupo neuronal 6 con la posición de neuronas p65 positivas señaladas por triángulos blancos, los núcleos se hallan teñidos con ioduro de propidio. D. P65 y propidio en neuronas del grupo neuronal 6. E. Tinción para p65 y serotonina mostrando en el grupo neuronal 11 neuronas que coexpresan ambos marcadores (triángulo blanco grande) y neuronas con altos niveles de señal tipo p65 (triángulo blanco pequeño). A, B, C y D, verde o negro es p65 y rojo ioduro de propidio. E, verde ídem, rojo serotonina.

contrastada con yoduro de propidio que muestran los grupos neuronales del ganglio (las neuronas se diferencian de la glia por la morfología de los núcleos, Basu y Kravitz, 2003) y la morfología general por tinción de la glia. Las dos localizaciones más importantes del factor de transcripción en el cerebro son terminales sinápticas y procesos que se encuentran en el neuropilo anteromedial del protocerebro (AMPN) y en la medula terminalis (MT) en el protocerebro lateral del pedúnculo óptico. La zona del AMPN que posee altos niveles de NF-kappa B activo se observa en mayor detalle en las Figuras 3 A, B y Figura 4 B, mientras que la marca en la MT se observa en las Figuras 5 y 6 D. Algo notable de esta marca es que por lo menos una neurona, trazada en parte en el esquema de la Figura 7 A, forma parte de la marca en la MT izquierda, y se la puede seguir a lo largo de todo el tracto protocerebral, en el AMPN izquierdo, derecho y en la MT derecha. De manera que todo el protocerebro se encuentra arborizado por neuronas que poseen NF-kappa B activo, en condiciones basales. Así mismo, en la entrada del trato protocerebral al ganglio supraesofágico se pueden contar hasta 7 procesos con marca para NF-kappa B (Figura 3 B y 4 B). Esta marca, que llama la atención por su extensión e intensidad, no es la única en el AMPN, encontrándose un complejo patrón que se puede observar en parte en la Figura 3 C, que es un corte transversal del ganglio supraesofágico mostrando la marca en la comisura del AMPN. Se encuentra señal un poco más débil en otros neuropilos como en el neuropilo posterior medial del protocerebro (PMPN) (Figura 7 A), en el tracto principal que conecta al lóbulo olfatorio, (visto en detalle en la Figura 3 F) y en el cuerpo central (central body, CB) (Figura 4 C). Esta distribución de la señal se encuentra, con mayor o menor intensidad, en todos los ganglios supraesofágicos analizados hasta el momento. La señal de NF-kappa B se encuentra también perinuclear en los somas de las neuronas (Figura 3 D y 4 D). Es de destacar que algunas neuronas tienen una señal muy por encima de las demás del mismo grupo, y estas se encuentran distribuidas muy estereotípicamente en el grupo neuronal 6 (Figura 4 C y D) y en el 11 (Figura 4 E), repitiéndose también en la mayoría de las tinciones. En el

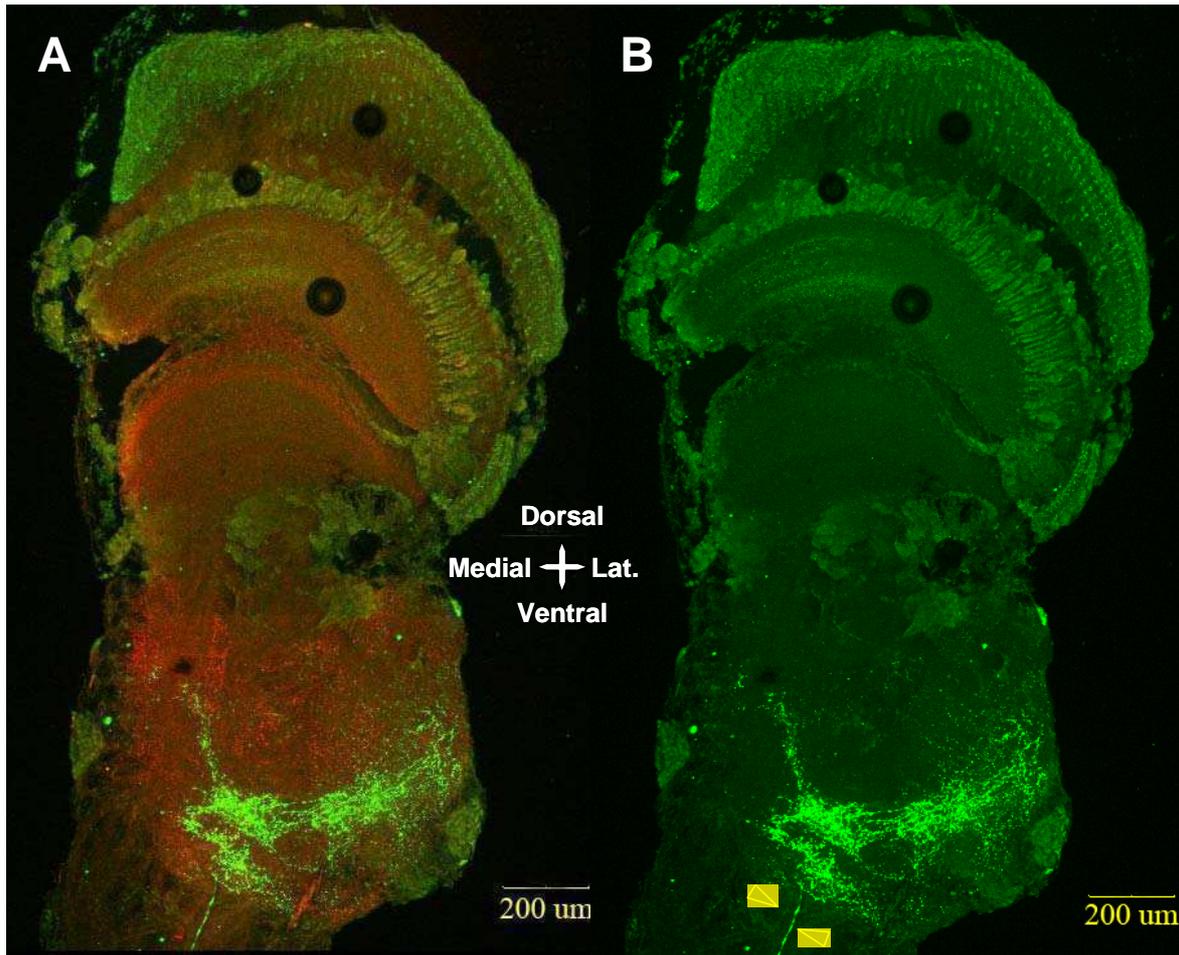


Figura 5: Localización de señal tipo p65 en el pedúnculo óptico. A: Marcación conjunta con anticuerpos anti p65 y anti serotonina. **B:** Señal de tipo p65. Triángulos amarillos procesos con p65.

grupo 6 las neuronas con alta concentración de NF-kappa B activo se encuentran en 4 pequeños grupos distribuidos en forma simétrica respecto del eje medial. En el grupo neuronal 11, por otro lado, las neuronas con abundancia del factor de transcripción se encuentran en la parte más heterogénea del grupo neuronal (triángulos blancos pequeños de la Figura 4 E).

La distribución de NF-kappa B en el pedúnculo óptico se encuentra menos caracterizada que en el ganglio supraesofágico. Encontrándose la mayoría del factor en los neuropilos de la medula terminalis y la medula (Figuras 5, 6 y resumido en 7 B) y en menor medida en los grupos neuronales (Figura 6 F). En la medula terminalis la arborización esta formada por al menos dos procesos con gran diferencia de intensidad entre si (Figura 5 B triángulos amarillos y 7 B). Las arborizaciones con NF-kappa B se encuentran en la parte más ventral, poseen una forma de copa, en la que se apoya la MT (Figura 5 y 6 D). En la medula, NF-kappa B parece estar distribuido en capas (Figura 6 B y E). En los grupos neuronales del pedúnculo óptico aparece esporádicamente señal del factor de transcripción, como en la medula (Figuras 6 B) y en la MT (Figura 6 F). Finalmente, todos los detalles de la distribución del NF-kappa B se encuentran resumidos en la Figura 7 A para el supraesofágico y B para el pedúnculo óptico. En estos resúmenes se prestó más atención al protocerebro, que es donde se observa la mayoría de la marca. Sin embargo, la distribución del factor de transcripción tiene gran complejidad en todo el sistema nervioso del cangrejo.

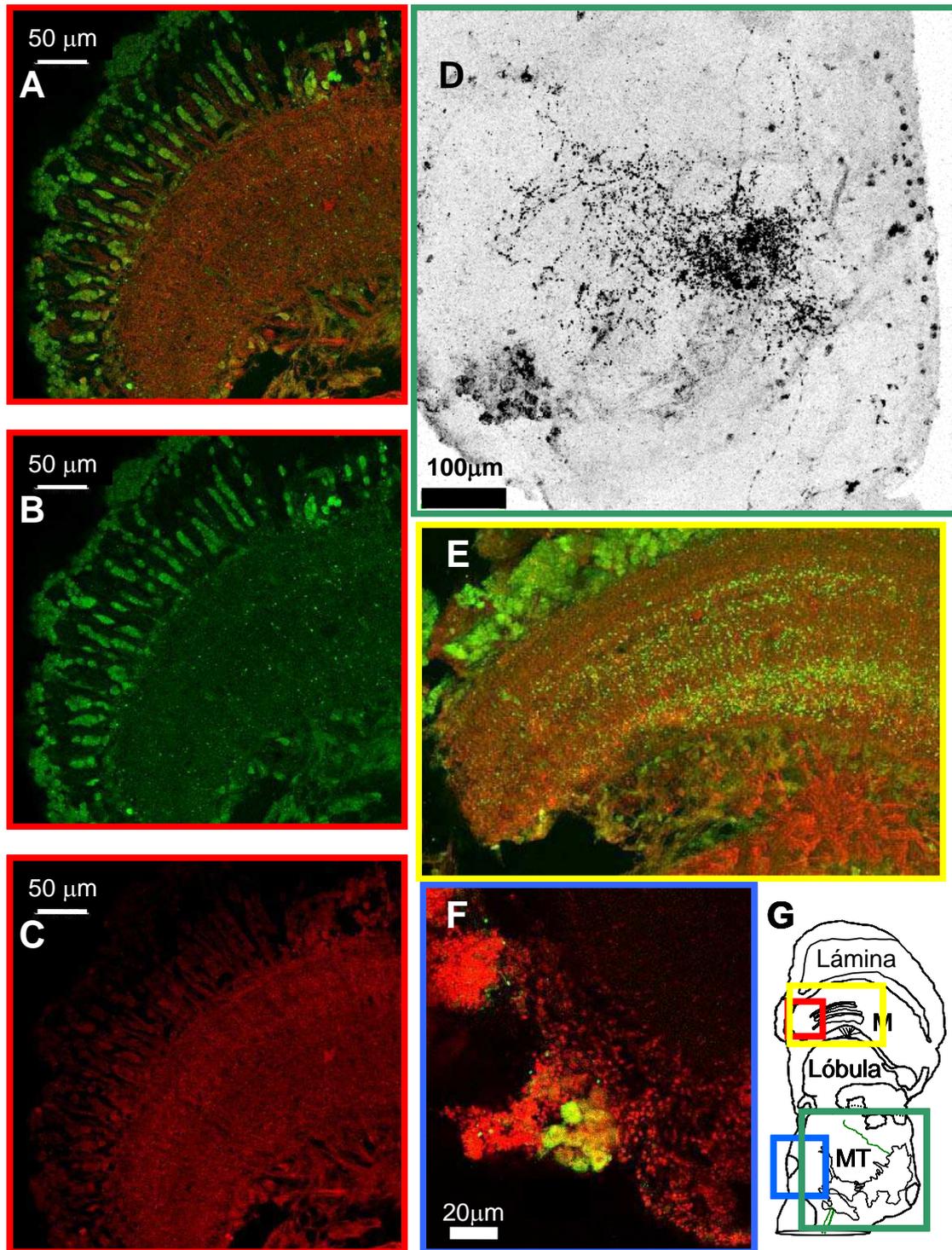


Figura 6: Detalles de la marca de p65 en el pedúnculo óptico. En las imágenes A, B, E y F la localización demarca tipo p65 se observa en verde, y en D, en negro. En A, C y E la señal en rojo es serotonina, y en F son núcleos con ioduro de propídido. A. Detalle de la señal de p65 en la medula, mostrando la morfología del neuropilo con una tinción conjunta para serotonina. B. p65 solo. C. Serotonina sola. D. Distribución de p65 en la medula terminalis, mostrando una arborización en forma de cáliz de por lo menos una neurona. E. Marca en capas en la medula. F. Grupo neuronal de la medula terminalis con p65. G. Mapa indicando la localización de las fotos.

Discusión

Retardos electroforéticos específicos para NF-kappa B se encuentran en todo el sistema nervioso evaluado, dando una idea de lo ubicuo del factor de transcripción (Figura 1 A). Es de notar que el factor de transcripción es abundante (dado el pequeño tamaño del tejido) aún en partes del sistema nervioso central que carecen de somas neuronales, como es el caso del tracto protocerebral. Esta presencia podría deberse a células de la glía o del tejido conectivo, sin embargo los resultados de los retardos en extractos sinaptosomales y de la inmunohistoquímica muestran, gran cantidad de señal de tipo p65 en neuritas y botones sinápticos, indicando que muy posiblemente sean de origen neural.

La señal específica de NF-kappa B obtenida por EMSA consta de dos complejos, uno de mayor retardado, abundante en el citoplasma y uno de menor retardo, abundante en los núcleos (Figura 1 B). Esto mismo puede verse al realizar extractos enriquecidos en proteínas nucleares o citoplásmicas al utilizar la distinta distribución en grupos de somas de las neuronas en el SNC del cangrejo, como se observa en la Figura 1 D.

Como los geles donde se corren los EMSAs no son desnaturizantes, no se puede adjudicar esta diferencia solamente a una diferencia en tamaño, pero es posible que estas se deban a modificaciones postraduccionales específicas de los compartimientos.

Los retardos electroforéticos están compuestos de por lo menos una proteína de aproximadamente 61 kD de peso (Figura 2 A), tamaño estimado por UV crosslinking de la secuencia consenso kB con la proteína y por western blot con un anticuerpo anti p65 (Figura 2 D). La proteína que forma parte de los retardos electroforéticos puede ser precipitada utilizando un anticuerpo contra Ikb (Figura 2 C), indicando que esta se encuentra unida al Ikb en el citoplasma, característica específica de NF-kappa B.

La inmunohistoquímica muestra señal de tipo p65 tanto en los ganglios del pedúnculo óptico como en el ganglio supraesofágico, localizada

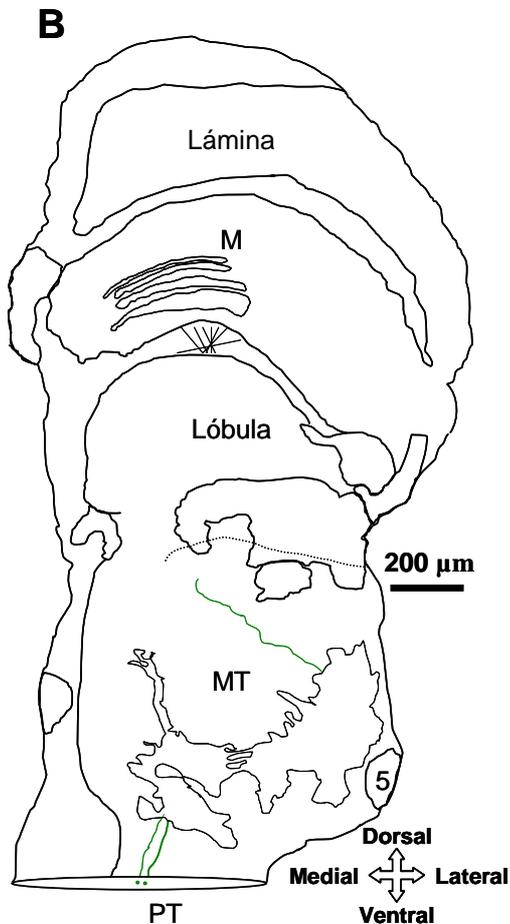
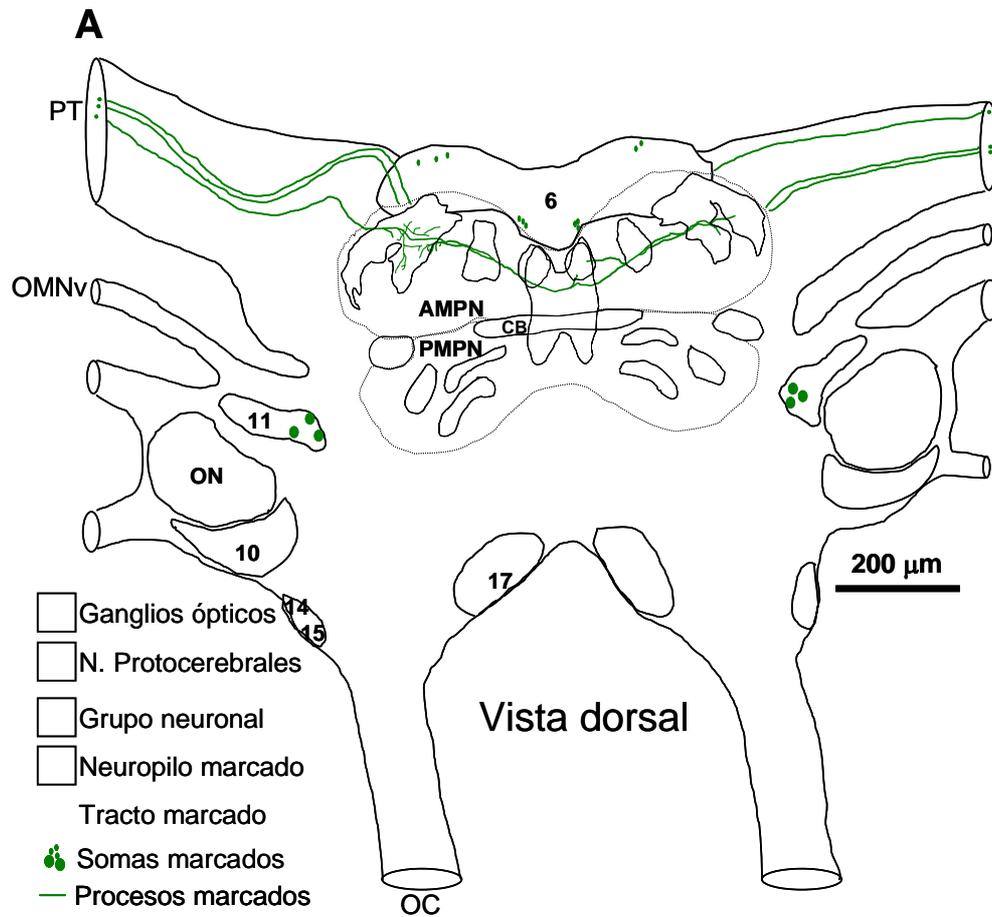


Figura 7: Mapa de la señal de p65 en: A. el ganglio supraesofágico y B. en el pedúnculo óptico. Abreviaturas en el **ganglio supraesofágico**: tracto protocerebral (PT), Nervio oculomotor (OMNv), conectivos esofágicos (OC, que conectan con el ganglio torácico), neuropilo olfatorio (ON), neuropilo protocerebral medial anterior (AMPN) y posterior (PMPN). **Pedúnculo óptico**: medula terminalis (MT) y medula (M). La numeración de los grupos neuronales y la nomenclatura de neuropilos, sigue los lineamientos de Schmidt M. et al, 1992.

en núcleos, citoplasma perinucleo, neuritas y terminales sinápticas (Figuras 3-7). La mayoría de la marca se encuentra en unos pocos procesos y estructuras de los neuropilos. La marca en somas neuronales posee una clara diferencia de intensidades entre citoplasma y núcleo en muchas de las neuronas observadas (Figura 3 D, 4 E y 6 A y F), pero unas pocas muestran una densidad claramente mayor de señal tipo p65. Estos pequeños grupos se encuentran en los grupos neuronales 6 (Figuras 4 C y D) y 9-11 (Figura 4 E) del ganglio supraesofágico, mostrando un patrón simétrico respecto del eje medial del animal. Parte de la marca se encuentra en lo que parecen ser terminales sinápticas. Como evidencia de esta localización tenemos dos fuentes independientes. Primero, el tamaño promedio de la marca granular no somática de tipo p65 en los neuropilos coincide con el rango de tamaño de los sinaptosomas que se usaron en experimentos posteriores. Segundo, para obtener mayor información anatómica, algunas de las inmunohistoquímicas, son co-tinciones de p65 con un anticuerpo anti serotonina. En estas tinciones aparece el mismo tamaño de marca corpuscular para serotonina que para p65, y en algunos casos estas marcas aparecen en una disposición que recuerdan a pre y post sinapsis (Figura 3 E), no encontrándose prácticamente co-localización. Este tipo de inmunoreactividad es la de mayor intensidad. Siendo las más intensas las del neuropilo anteromedial (Figuras 3 A, B y 4 B) y de la MT en el pedúnculo óptico (Figura 5 y 6 D). Estas dos estructuras se hallan en neuropilos de procesamiento superior de la información (Sandeman, 1982; Utting et al., 2000) y se encuentran conectadas por neuritas p65 positivas que recorren todo el trato protocerebral (Figura 7 A y B). Marca más débil de este tipo se encuentra en otras partes del ganglio supraesofágico (Figuras 3 A y F) así como en otros ganglios del pedúnculo óptico, en la medula en forma de capas (Figura 6 E), y en forma mas difusa en la lóbula.

CAPITULO 2

Participación del factor de
transcripción NF-kappa B en la
memoria de largo término en
Chasmagnathus.

Introducción

Los objetivos de este capítulo son establecer si los requerimientos comportamentales para la inducción de la memoria de largo término en *Chasmagnathus* se correlacionan con los necesarios para la activación del factor de transcripción, describir el perfil temporal de la activación de NF-kappa B luego del entrenamiento y estudiar la distribución de la activación a nivel subcelular.

Para correlacionar el comportamiento con la activación del factor de transcripción se utilizaron distintos entrenamientos espaciados con un rango de número de ensayo que incluyen el umbral de la formación de la memoria de largo término y entrenamientos con distintas frecuencias de estimulación, incluyendo aquellas que no inducen memoria de largo término.

La dinámica de activación del factor de transcripción se estudió después de un entrenamiento espaciado de 30 ensayos y se lo comparó en cada punto temporal con un grupo control de animales expuestos al mismo estímulo pero recibiendo 600 ensayos con un intervalo entre ensayos de 0 seg. Como se mencionó en la introducción, este protocolo de entrenamiento denominado estimulación continua no induce ningún tipo de retención a largo término a pesar del gran número de ensayos presentados y del hecho que los animales muestran una rápida caída de la respuesta durante el entrenamiento (Freudenthal et al, 1998). Este grupo, denominado control activo, permite estimar cambios moleculares inespecíficos debido a la estimulación visual, la actividad motora, el estrés, la novedad, etc., que pueden inducir al factor de transcripción de una manera no directamente relacionada con la formación de la memoria de largo término.

La presencia del factor de transcripción NF-kappa B había sido descrita previamente en extractos sinaptosomales (Kaltschmidt et al, 1993 y Meberg et al 1996) y en densidades post sinápticas (Suzuki et al, 1997). Sin embargo hasta la realización de este trabajo no se había reportado la activación de este factor de transcripción en terminales sinápticas. El

objetivo de estos experimentos fue determinar si había cambios en la actividad de unión al ADN de NF-kappa B. Luego de un entrenamiento espaciado, en preparaciones sinaptosomales purificadas provenientes del cerebro de cangrejo.

En la preparación de estos extractos, normalmente se obtienen terminales pre y post sinápticas (Figura 1 c, d, e), con una estructura bastante conservada y en algunos casos, estas siguen unidas. Fue en los extractos proteicos de estos sinaptosomas en los que se probó si el nivel de actividad cambia luego de un entrenamiento espaciado de 15 ensayos, protocolo que es capaz de inducir una memoria largo término (Lozada et al, 1990).

Resultados

El aumento de la actividad nuclear de NF-kappa B no se observa luego del entrenamiento masivo.

El efecto de distintos intervalos entre ensayos sobre la memoria ha sido estudiado previamente en *Chasmagnathus*, (Pedreira et al. 1995; Freudenthal et al, 1998). En base a estos resultados se postuló una distinción entre dos componentes distintos de la memoria (Hermitte et al., 1999). Un análisis más detallado reveló que el componente inducido por un entrenamiento masivo, aquí llamado memoria de término intermedio, no es dependiente de la síntesis proteica y probablemente no requiera inducción de la expresión génica. Por el contrario, el componente inducido por entrenamiento espaciado, la memoria largo término, es dependiente de síntesis proteica durante la consolidación, proceso que dura más de 2 hs. después de terminado el entrenamiento (Pedreira et al, 1995). Los experimentos de esta sección están diseñados para evaluar si la activación del NF-kappa B, que sucede luego un entrenamiento espaciado, también sucede luego de entrenamiento masivo. Es decir, se estudió si la activación del factor de transcripción luego un entrenamiento espaciado está

relacionada con la inducción de la memoria largo término o simplemente es el resultado de una activación inespecífica debido a los factores antes mencionados que están presentes durante el entrenamiento.

Para este propósito se realizaron en forma independiente dos replicas del siguiente experimento: 20 animales por grupo fueron entrenados simultáneamente con 30 ensayos espaciados o 300 ensayos masivos (intervalo entre ensayos, cuatro segundos) o 600 ensayos de estimulación continua (para la descripción comportamental ver la **Figura 8** de la introducción). Inmediatamente después del entrenamiento los animales se sacrificaron y se obtuvieron los extractos nucleares de cerebro. El nivel de actividad de NF-kappa B encontrado en el retardo electroforético luego del entrenamiento masivo fue marcadamente menor que luego del entrenamiento espaciado y similar al encontrado luego de un entrenamiento continuo, **Figura 1**. Estos resultados se correlacionan con el hecho de que la memoria de largo término, pero no la memoria de término intermedio, depende de la maquinaria de expresión génica, sugiriendo que la transcripción dependiente de la secuencia consenso kB podría ser necesaria para la formación de la memoria largo término.

La activación de NF-kappa B se correlaciona con el número de ensayos espaciados necesarios para formar una memoria de largo término.

Dado que la activación de NF-kappa B es específica del tipo de entrenamiento que induce la memoria de largo término, se decidió correlacionar el número de ensayos necesarios para generarla con la actividad del factor de transcripción luego de entrenamientos espaciados de distinto número ensayos. Se realizaron dos réplicas independiente es de este experimento de la siguiente manera: 8 grupos de 20 animales por grupo se entrenaron simultáneamente, para cada replica, con 5, 10, 15 o 30 ensayos espaciados o con 600 ensayos de entrenamiento continuo. Obteniendo un grupo de animales entrenados de forma continua juntamente con cada grupo entrenado con distinto numero de ensayos espaciados. Los extractos nucleares de cerebro se realizaron inmediatamente de terminados los

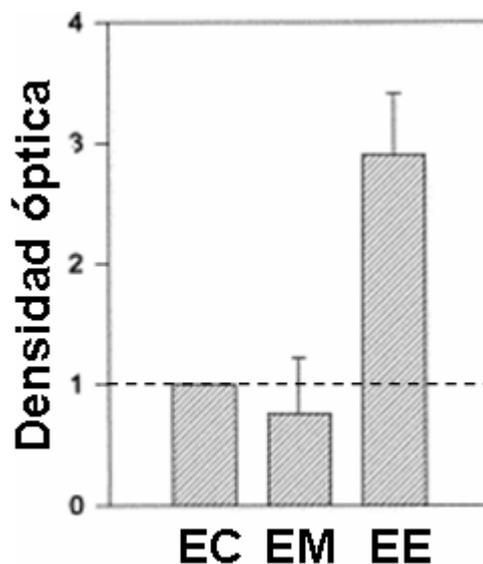


Figura 1: El entrenamiento espaciado, pero no el masivo, ni el continuo, induce la activación de NF-kappa B inmediatamente después del entrenamiento. La actividad de unión al ADN se determinó por retardo electroforético. Los valores de densidad óptica de las bandas de retardo específicas para cada entrenamiento están relativizadas al valor de EC: densidad óptica relativa = (E)/EC. Los grupos fueron entrenados simultáneamente. Cada valor corresponde a la media +/- el error estándar de replicas de cada experimento completo (muestras independientes). EC: entrenamiento continuo grupo que recibe 600 EVP en forma continua (IEE=0s), EM 300 EVP (IEE=4s) y EE 30 EVP (IEE= 100s).

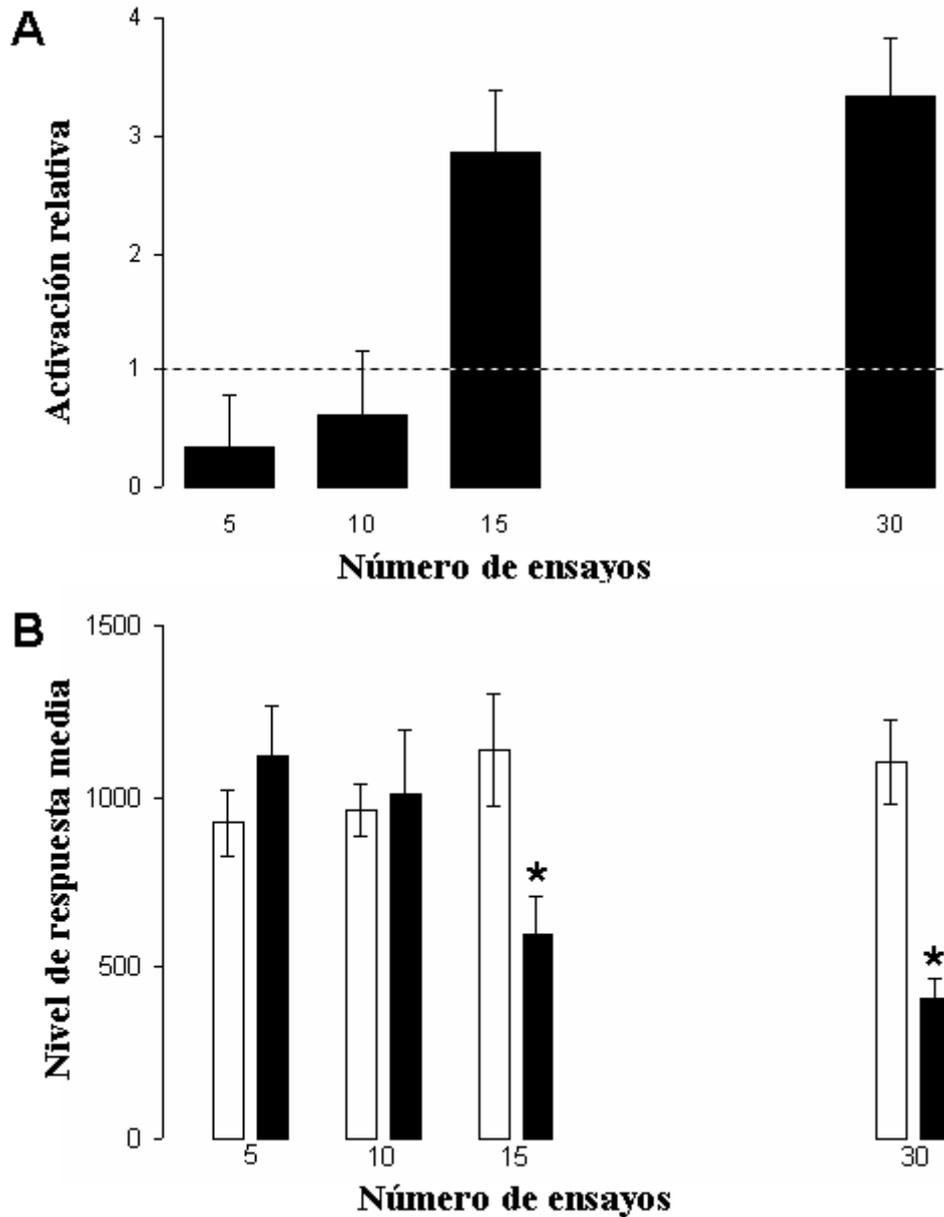


Figura 2: El umbral de ensayos para la inducción de la memoria de largo término y la activación del NF-kappa B es el mismo. 15 ensayos o más, pero no menos, inducen la activación del NF- κ B y la memoria de largo término. A. Los valores densitométricos están relativizados al grupo control correspondiente a cada experimento, entrenado con un número distinto de ensayos. Los grupos control y entrenado fueron corridos simultáneamente y los extractos nucleares se obtuvieron inmediatamente después de finalizado el entrenamiento (tiempo 0). Cada valor corresponde a la media \pm el error estándar de 2 experimentos independientes. La línea punteada indica el valor de activación de los animales control. **B.** Los datos son el nivel de respuesta media de los cangrejo \pm error estándar. El ensayo de evaluación se realizó 24 horas después de finalizado el entrenamiento y consistió de un ensayo de presentación de estímulo. Los animales control de este experimento se colocaron en los actómetros pero no se les presentó el EVP; la evaluación fue igual y simultánea a la de los animales entrenados. Las barras blancas corresponden a animales control, mientras que las negras a animales entrenados. * indican diferencias significativas con su correspondiente grupo control ($\alpha = 0,01$, $F = 7,2$ y $9,4$ respectivamente en comparaciones planeadas).

entrenamientos, y se determino la actividad de unión al ADN mediante EMSA. En los entrenamientos de 5 y 10 ensayos espaciados el nivel de actividad de NF-kappa B resultó similar al observado luego de 600 ensayos entrenamiento continuo (**Figura 2 A**). Por el contrario en los entrenamientos de 15 y 30 ensayos espaciados el nivel de actividad de NF-kappa B fue claramente mayor. El gráfico de los datos sugiere una curva sigmoidea con un marcado escalón entre los entrenamientos de 10 y 15 ensayos espaciados (**Figura 2 A**).

Para realizar los experimentos de respuesta comportamental, se completaron ocho grupos de 40 animales cada uno, cuatro experimentales entrenados con 5, 10, 15 o 30 ensayos espaciados por 100 segundos y cuatro grupos control que permanecieron en los actómetros durante toda la sesión de entrenamiento pero sin estimulación. Todos los grupos se evaluaron 24 hs. después del entrenamiento, con un solo ensayo. Sólo se observaron diferencias entre los grupos control y los entrenados luego de 15 y 30 ensayos espaciados, pero no luego de cinco o diez.

La forma de la curva de activación del NF-kappa B en función de los ensayos, muestra una coincidencia notable con la de retención obtenida a las 24 hs., con los mismos entrenamientos espaciados (**Figura 2 B**).

Curso temporal de la actividad de NF-kappa B luego de un entrenamiento espaciado.

Para conocer la cinética de activación del factor de transcripción luego de un entrenamiento espaciado, se realizaron tres réplicas independientes de los siguientes experimentos: 5 pares de grupos de 20 animales cada uno se entrenaron y sacrificaron a 0, 3, 6, 12 y 24 hs. luego del entrenamiento y se obtuvieron los extractos nucleares de cerebro. Para cada uno de los tiempos, uno de los grupos del par fue entrenado con 30 ensayos espaciados y el otro grupo con 600 ensayos de estimulación continua, **Figura 3**. A tiempo cero después del entrenamiento se encuentra un pico de actividad nuclear de unión al ADN (usado para las demás caracterizaciones de la

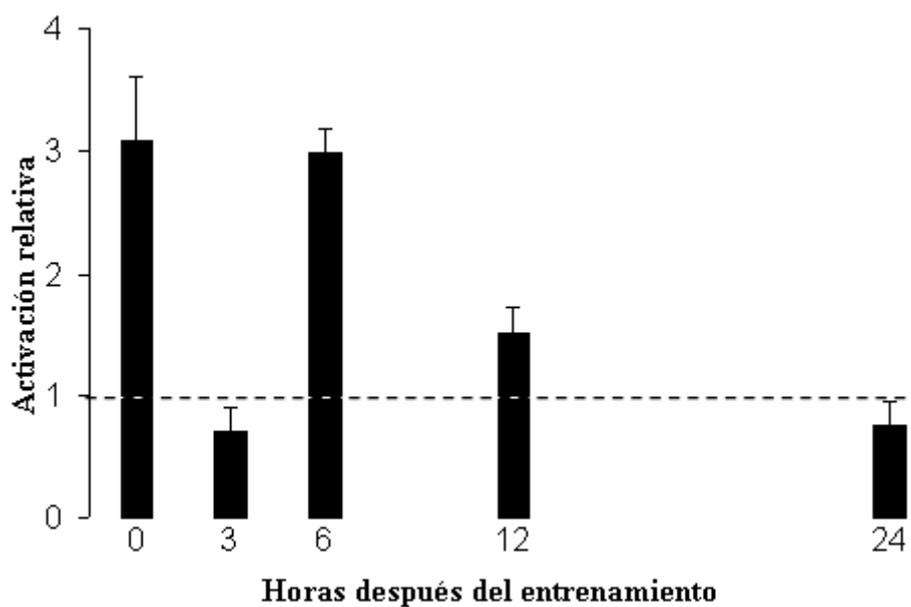


Figura 3: Curso temporal de activación de NF- κ B después de un entrenamiento espaciado. La actividad específica de unión al oligonucleótido consenso kb se determinó por retardo electroforético. Grupos de 20 cangrejos se sacrificaron a los tiempos indicados en el gráfico, luego de recibir un entrenamiento de 30 ensayos espaciados o de 600 continuos. Los valores densitométricos de la banda específica de cada tiempo se relativizaron al grupo control. Los valores corresponden a la media \pm el error medio estándar, de tres experimentos de muestras independientes. La línea punteada indica el valor de actividad del NF-kappa B en el grupo control de cada tiempo.

activación del NF-kappa B, hasta ahora), que cae rápidamente hasta un nivel igual o menor al del grupo de estimulación continua, luego de 3 hs. de terminados los entrenamientos. Una segunda ola de actividad de NF-kappa B se observa luego de 6 hs., mostrando un nivel de actividad casi tan alto como el primer pico. Esta segunda ola de actividad decrece gradualmente alcanzando un nivel basal 24 hs. después de terminado el entrenamiento.

Un entrenamiento espaciado aumenta la actividad de unión al ADN del factor de transcripción NF-kappa B tanto en extractos nucleares como en extractos sinaptosomales.

Para corroborar la presencia de NF-kappa B en terminales sinápticas se realizaron retardos electroforético en extractos sinaptosomales purificados y se los comparó con el retardo específico presente en extractos nucleares que cerebro, (**Figura 4 A y B**). La señal encontrada corresponde a un complejo proteico que se une específicamente a la secuencia consenso kB, especificidad demostrada por los ensayos de competencia (**Figura 4 C**).

Veinte animales por grupo fueron entrenados simultáneamente con 15 ensayos espaciados con un intervalo entre ensayos de 100 segundos o con 300 ensayos de entrenamiento continuo (EC). Inmediatamente después del entrenamiento los animales fueron sacrificados y se obtuvieron los extractos de cerebro. Cuando se comparó el grupo entrenado con ensayos espaciados con el grupo control de estimulación continua (**Figura 4 A**) se encontró una actividad de unión al ADN en los extractos nucleares tres veces mayor, sugiriendo que este incremento de la translocación de NF-kappa B al núcleo está específicamente relacionado con la formación de una memoria de largo término.

Previamente el nivel de actividad en el grupo control con entrenamiento masivo, había sido comparado con un control pasivo cuyos animales permanecían en el dispositivo experimental sin estimulación, mostrando un nivel de actividad dos veces mayor (**Figura 9 C** de la

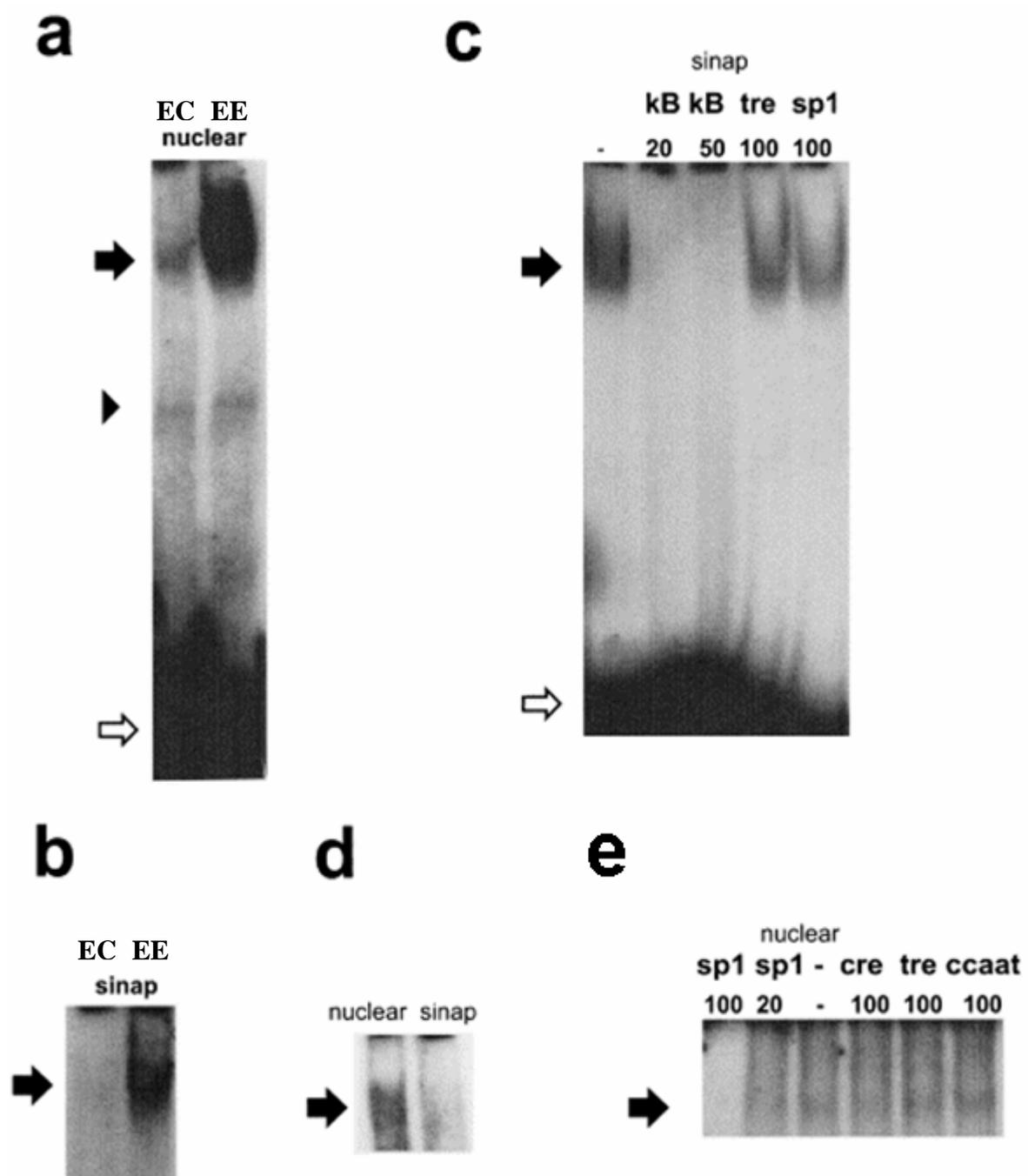


Figura 4: Retardos electroforéticos (EMSA) en extractos nucleares y sinaptosomales para NF-kappa B y SP1. Como sonda se utilizó un oligonucleótido conteniendo, ya sea la secuencia consenso kB o SP1 marcadas con P³². El grupo de entrenamiento continuo **EC** recibió 300 ensayos sin intervalo entre estímulos (IEE) y el de entrenamiento espaciado (**EE**) 15 ensayos con un IEE de 100 seg. Los ensayos de competencia se realizaron con el oligonucleótido consenso correspondiente a la sonda marcada y otras secuencias consenso no relacionadas. **(a)** Actividad de la unión específica al oligonucleótido kB en extractos nucleares de cerebro luego de un **EC** comparada con la de un **EE**. **(b)** y **(c)** EMSA en extractos sinaptosomales; comparación **EC** vs. **EE** en **(b)** y ensayo de especificidad en **(c)**. **(d)** Unión específica a la secuencia de consenso de SP1 se encuentra en extractos nucleares de EE, pero no en extractos sinaptosomales. La especificidad de esta unión se verifica en **(e)**. La flecha negra indica la banda de retardo, la flecha blanca la sonda no unida y la cabeza de flecha señala un retardo no específico.

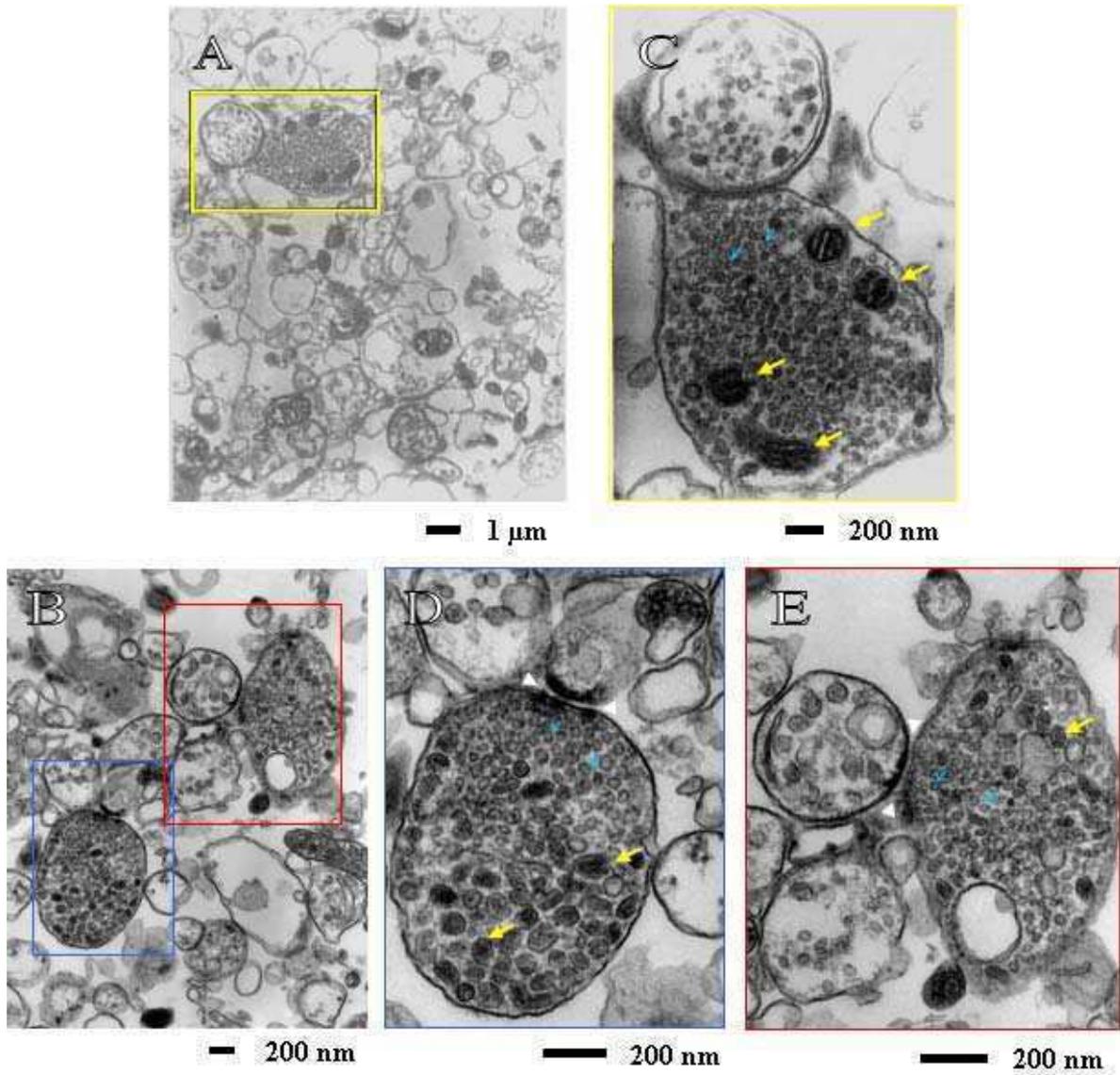


Figura 5: Microscopia electrónica de la fracción sinaptosomal ganglio supraesofágico de *Chasmagnathus*. A y B. Ejemplos de campos visuales. Los rectángulos resaltados, son sinaptosomas representativos mostrados en más detalle en C, D y E.

D y E son pre y post sinapsis juntas mostrando el espacio intersináptico (flechas blancas), mitocondrias (flechas amarillas) y vesículas sinápticas (flechas azules). Cuerpos sinápticos de diferente tamaño y preservación son identificados por la presencia de vesículas y mitocondrias.

introducción). Una banda de retardo electroforético se encontró también en extractos sinaptosomales purificados. La identificación de los sinaptosomas se realizó mediante microscopía electrónica (**Figura 5**). En la microscopía se pudo constatar la presencia de estructuras tipo sinaptosoma conteniendo vesículas y mitocondrias (**Figura 5 C, D y E**). Algunos sinaptosomas se encuentran unidos entre sí, mostrando lo que parecen sitios activos y densidades post sinápticas (**Figuras 5 D y E**). En los campos visuales de las **Figuras 5 A y B** se observan muchas membranas que aun contienen sus estructuras internas, indicando la preservación de los sinaptosomas luego de la purificación. La banda de retardo en el extracto proteico de los sinaptosomas probó ser específica para la secuencia consenso kB, ya que fue desplazada por un exceso 20X de la misma sonda no marcada en un ensayo de competencia, mientras que un exceso 100 X de las secuencias consenso CRE, TRE y SP1, no relacionadas con kB, no fueron capaces de desplazar a la sonda marcada (**Figura 4 C**). Utilizando un oligonucleótido que contiene la secuencia consenso de SP1, un factor de transcripción nuclear, se obtuvo un retardo específico en los extractos nucleares. Este factor de transcripción no tiene localización sinaptosomal descrita, dato que comprobamos también en *Chasmagnathus* (**Figura 4 D**). El hecho de no encontrar esta banda al utilizar extractos sinaptosomales sugiere que el aporte de proteínas nucleares a los extractos sinaptosomales fue pequeño, mientras que en los extractos nucleares sí se encontró un retardo para SP1 (**Figura 4 D y E**). En la **Figura 4 B**, se muestra un EMSA representativo del aumento de la actividad de unión a la secuencia kB, en extractos sinaptosomales obtenidos del cerebro de animales entrenados con 15 ensayos espaciados en comparación con animales entrenados con 300 ensayos continuos. Este resultado sugiere que la activación de NF-kappa B ocurre localmente en las terminales sinápticas durante la sesión de entrenamiento que induce la memoria de largo término.

Discusión

En este capítulo se presentan evidencias que muestran la participación del sistema de regulación transcripcional Rel/NF-kappa B en la memoria de largo término en *Chasmagnathus*. El aumento de unión al ADN de NF-kappa B muestra una marcada correlación con la formación de la memoria de largo término:

1. La activación se encuentra luego de un entrenamiento espaciado, que induce una memoria de largo término, pero no luego de un entrenamiento masivo que induce una memoria de término intermedio no dependiente de síntesis proteica.
2. La activación solo se observo después de un número de ensayos suficiente para inducir la memoria de largo término. Los resultados que se muestran en la **Figura 2**, acerca del efecto del incremento del número de ensayos sugiere que hay un mecanismo del tipo todo o nada involucrado en la activación del factor de transcripción durante la formación de la memoria de largo término, que se activa luego de pasado un umbral de estimulación. Un hecho similar se observa a nivel comportamental: 15 ensayos de entrenamiento espaciado pero no 10, son suficientes para la retención a largo término.

La activación bifásica de NF-kappa B que se encontró (**Figura 5**), ya había sido descrita en otros sistemas. Por ejemplo el TNF- α en cultivos de promielocitos induce una activación con picos a 4 minutos y 3 hs. (Hohmann et al, 1992), ambos dependientes de vías de activación distintas.

La primera fase de activación transiente, se cree que es causada por la rápida fosforilación y posterior proteólisis del IkappaB en respuesta a las señales de transducción. La proteólisis del IkappaB permite al NF-kappa B preexistente, normalmente inactivo en el citoplasma, translocar al núcleo. Este proceso es independiente de la síntesis proteica y puede inducir un

feedback negativo, debido a que el I κ B α posee secuencias kB en su promotor; siendo esta la posible causa de la terminación de la primera ola de NF-kappa B.

La larga segunda ola de activación de NF-kappa B, entre 6 y 12 hs., sucedería luego de depletado el factor de transcripción preexistente y se considera dependiente de síntesis proteica (Hohmann et al, 1992).

La inducción de los genes por NF-kappa B podría estar regulada por sus propios productos proteicos en forma autorregulatoria y las proteínas de la familia Rel/NF-kappa B sintetizadas de novo podrían estar formando en esta ola dímeros con combinaciones distintas de las de la primera, con afinidades distintas por los sitios kB.

Los resultados obtenidos en este experimento coinciden con estudios previos en otros modelos de memoria que muestran dos ventanas temporales de dependencia de la síntesis proteica, uno inmediato y otro entre 4 y 6 hs. después del entrenamiento (Bernabeu et al, 1997; Bourtchuladze et al 1998; Freeman et al, 1995). El primer periodo de síntesis proteica se asocia con la expresión de genes tempranos (immediate early genes) (Alberini et al, 1994; Anokhin et al, 1991; Tischmeyer et al, 1990). El segundo periodo de síntesis puede ser explicado, al menos en parte, por una segunda ola de activación de factores de transcripción como el NF-kappa B, que es constitutivo, pero cuya expresión también puede ser inducida. El resultado obtenido en este experimento también es coincidente con estudios previos en *Chasmagnathus*, en los que inhibidores de síntesis proteica como la cicloheximida, tienen una ventana temporal de acción luego del entrenamiento (Pedreira et al, 1995). En estos experimentos el efecto amnésico de la cicloheximida se observó cuando se la inyectaba inmediatamente o 2 hs. después del entrenamiento, pero desaparecía si la inyectaba después de 6 hs., sugiriendo que luego de 6 hs. suficiente cantidad de proteína se había sintetizado y que la síntesis de novo luego de este tiempo no se necesita para la consolidación de la memoria.

La presencia de NF-kappa B en sinaptosomas había sido reportada previamente a este trabajo en cerebelo e hipocampo. Para explicar esta

localización inesperada, se propuso un modelo en el que el NF-kappa B citoplasmático, dendrítico y axónico alcanza el núcleo con distintas cinéticas (Kaltschmidt et al, 1993; Meberg et al, 1996). En este capítulo se reportan evidencias que sugieren una activación sináptica de NF-kappa B luego de un protocolo de entrenamiento que induce la memoria largo término. Este mecanismo de activación en la sinápsis y luego transporte retrógrado al núcleo podría estar contribuyendo la segunda fase de activación que se observó luego de 6 hs. de terminado el entrenamiento (**Figura 3**).

Descubrimientos recientes en los procesos moleculares involucrados en la activación de NF-kappa B en la vía TNF α -interleuquina indican que el NF-kappa B posee largos períodos de activación (Albensi y Mattson, 2000). Un mecanismo de "memoria molecular" similar al propuesto para la activación independiente de Ca⁺⁺ de la CaMKII (calcio calmodulina quinasa II) que permanece activa por períodos prolongados, podría postularse también para esta vía en base a los cambios de actividad prolongados de la quinasa trímero que activa al NF-kappa B (NIK, IKK α , IKK β) (Baldwin, 1996).

Todas las evidencias presentadas en este capítulo apoyan la hipótesis de que la activación de la vía de regulación transcripcional de NF-kB participa en formación la memoria de largo término en *Chasmagnathus*. Trabajos posteriores de nuestro grupo utilizando un inhibidor de IKK, sulfasalazina, constituyeron una evidencia adicional para esta hipótesis, considerando que esta droga resultó amnésica solamente cuando se administró poco tiempo antes del los períodos de activación descriptos en este capítulo (Merlo, Freudenthal y Romano, 2002). Así, la sulfasalazina afectó la memoria de largo término en *Chasmagnathus* cuando fue administrada pre-entrenamiento o 5 horas después del mismo, pero no afectó la memoria cuando fue administrada inmediatamente o 12 horas post-entrenamiento.

La asociación entre proteínas Rel/NF-kappa B e I κ B constituye una vía rápida, eficaz y finalmente controlada para poder responder a las complejas combinaciones de estímulos tales como las involucradas en el

aprendizaje. Estas propiedades hacen del sistema Rel/NF-kappa B un candidato a ser un importante componente de los mecanismos subyacentes a la consolidación de la memoria.

Participación del NF-kappa B en la
consolidación de la memoria en
ratón.

Introducción

Un número creciente trabajos, con distintas aproximaciones apoyan la participación de este factor de transcripción en la potenciación de largo término en el hipocampo de ratón (Meberg et al., 1996; Albenis y Mattson, 2000; Freudenthal et al., 2004). La primera evidencia indicando que el NF-kappa B es activado durante la consolidación de la memoria proviene de nuestros trabajos en el paradigma de memoria contexto señal en el cangrejo *Chasmagnathus*. En el que como hemos visto en el capítulo correspondiente, hay una marcada correlación entre la formación de memoria y la activación de NF-kappa B (Freudenthal et al., 1998; Freudenthal & Romano, 2000).

Más aún la inhibición de este factor de transcripción, con un inhibidor específico de la IKK como es la sulfasalazina, induce amnesia (Merlo et al., 2002). Se ha propuesto que este factor de transcripción puede jugar, un papel dual, actuando como una molécula de señalización después de su activación en la sinapsis y como un iniciador de la transcripción luego de su llegada al núcleo (Kaltschmidt et al., 1993). NF-kappa B activado se encuentra en terminales sinápticas luego de la inducción de una memoria de largo término (Freudenthal y Romano, 2000) y evidencia de su transporte retrógrado al núcleo ha sido encontrada principalmente en cultivo de neuronas (Wellmann et al., 2001; Meffert et al., 2003), dando apoyo fisiológico la hipótesis de su función como señalizador entre la sinápsis y el núcleo. Estudios recientes en roedores aportan evidencias acerca de la función del NF-kappa B en la memoria. Este factor de transcripción es requerido en la amígdala de ratas para la formación de memorias de miedo (Yeh et al., 2002; Yeh et al., 2004) y ratones dobles knockout para p65 y el receptor del factor de necrosis tumoral mostró un déficit en memoria espacial (Meffert et al., 2003). La expresión dependiente de NF-kappa B parece ser un mecanismo conservado y necesario para el almacenamiento de memoria. En éste capítulo se estudia la participación del NF-kappa B en la formación de la memoria utilizando una tarea de evitación inhibitoria, la cual en parte es dependiente de la función hipocampal. Con este propósito se

analiza, 1º) el efecto de la inhibición del NF-kappa B sobre la memoria con dos estrategias independientes: la administración de inhibidor sulfasalazina y del oligonucleótido doble cadena de ADN kB decoy, y 2º) el curso de la actividad del NF-kappa B en el hipocampo durante la consolidación de memoria.

Resultados

El inhibidor de NF-kappa B sulfasalazina impide la formación de la memoria de largo término. La sulfasalazina es un inhibidor de NF-kappa B (Wahl et al., 1998) que actúa por inhibición directa de IKK α y IKK β , interfiriendo con el sitio de unión a ATP (Weber et al., 2000). Los trabajos previos realizados en el modelo de memoria de largo término en *Chasmagnathus* mostraron que la sulfasalazina induce amnesia (Merlo et al, 2002). En esos trabajos utilizaron dos dosis de sulfasalazina, 1 y 5 mM.

Para evaluar el efecto amnésico de la sulfasalazina en ratones, en un primer experimento se administro a los animales un shock eléctrico luego de que transpusieran la entrada al compartimiento oscuro del dispositivo experimental y se los inyectó con vehículo (VEH) o con concentraciones de 1, 3, 5, 7 o 10 mM de sulfasalazina. 48 horas después los animales se evaluaron, para determinar la latencia de entrada al compartimiento oscuro. Como se muestra en la **Figura 1 A**, las dosis de 5 y 7 mM presentan latencias significativamente menores que las del grupo inyectado con vehículo ($U=11.50$, $p<0.01$ y $U=14.5$, $p<0.05$), sugiriendo que esas dosis poseen un efecto amnésico. No hay diferencias con el grupo inyectado con vehículo en las dosis de 1 y 3 mM de sulfasalazina, indicando que estas dosis, son demasiado bajas para inducir amnesia. De forma similar 10 mM no causa diferencias significativas en las latencias cuando se lo compara con el grupo control inyectado con vehículo. Estos resultados sugieren una curva de dosis respuesta con forma de U en la que sólo las dosis intermedias son efectivas. Aunque no significativas las diferencias que se observan a 1 comparar 1 mM con 10 mM, puede interpretarse como un efecto inespecífico causado por la reducción general de la actividad.

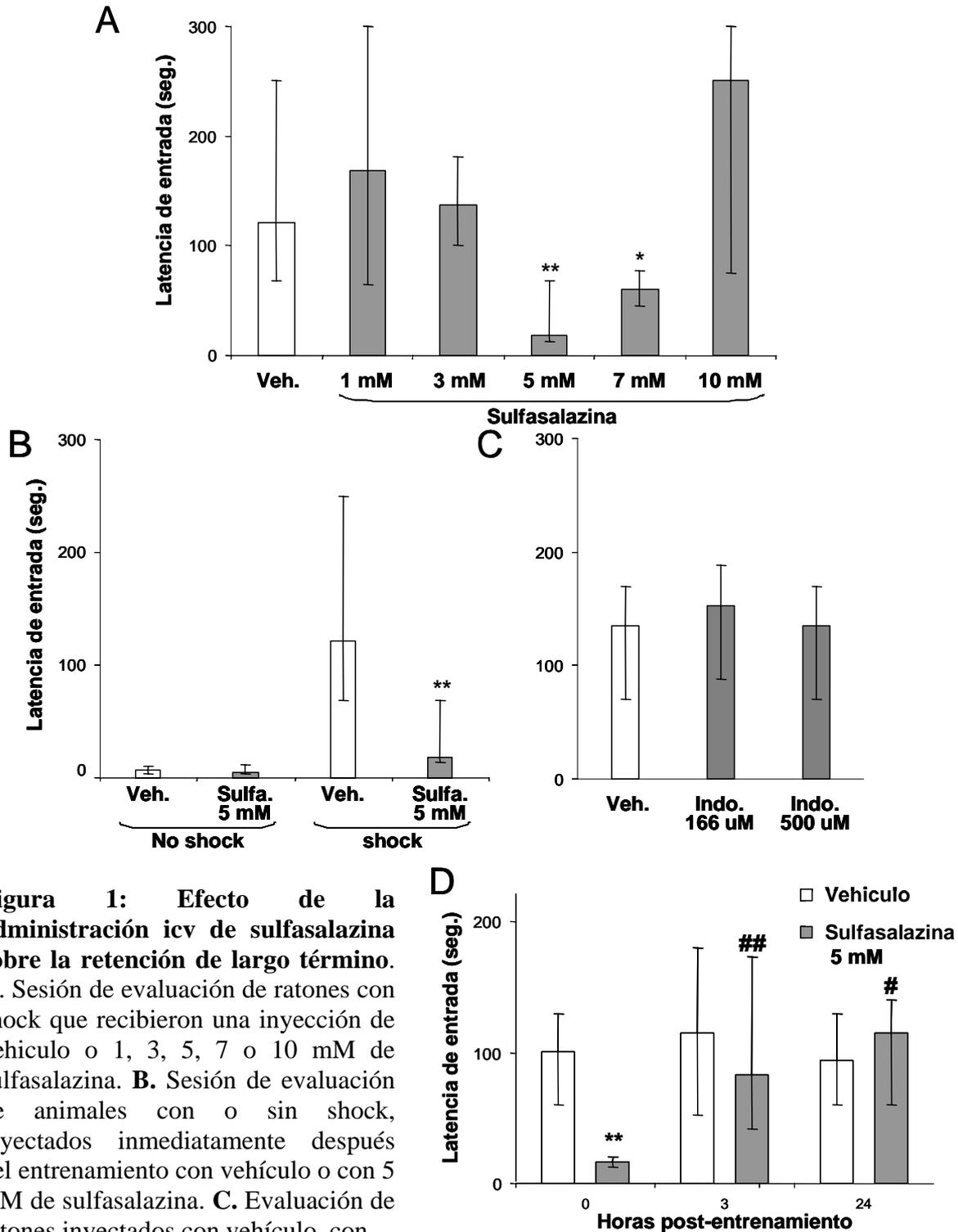


Figura 1: Efecto de la administración icv de sulfasalazina sobre la retención de largo término.

A. Sesión de evaluación de ratones con shock que recibieron una inyección de vehículo o 1, 3, 5, 7 o 10 mM de sulfasalazina. **B.** Sesión de evaluación de animales con o sin shock, inyectados inmediatamente después del entrenamiento con vehículo o con 5 mM de sulfasalazina. **C.** Evaluación de ratones inyectados con vehículo, con vehículo, con 166 o 500 mM de indometacina inmediatamente después del entrenamiento. **D.**

Evaluación de animales que recibieron shock durante el entrenamiento y que fueron inyectados con 5 mM de sulfasalazina inmediatamente, luego de 3 hs. o de 24 hs. después del entrenamiento. Los valores son la mediana +/- los rangos intercuartiles de las latencias a entrar en el compartimiento oscuro. N=10 por grupo. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ respecto del grupo control inyectado con vehículo; #: $p < 0.05$; ##: $p < 0.01$ respecto de la administración de la droga inmediatamente después del entrenamiento.

Para estudiar el efecto amnésico se eligió la dosis 5 mM, que había mostrado el efecto más claro, y se diseñó un experimento completo en el que los animales se dividieron primero en dos grupos los que recibieron un shock eléctrico (grupo S) y los que no (grupo NS). La mitad de los animales de cada grupo se inyectaron, a su vez, con vehículo (Veh) o con sulfasalazina 5 mM (SSZ). Formando de esta manera cuatro grupos: S-SSZ, S-VEH, NS-SSZ y NS-VEH. La **Figura 1 B** muestra los resultados de la sesión de evaluación. El grupo S-SSZ muestra un nivel de latencias significativamente menor que el grupo S-VEH ($U=13,50$ $p<0,01$), indicando un efecto amnésico. Por el contrario el grupo NS-SSZ mostró latencias bajas similares a las del grupo NS-VEH, indicando que la sulfasalazina no causa de efectos inespecíficos en la respuesta comportamental de los animales.

Para desestimar posibles efectos no específicos de la droga que no fueran evaluables con el grupo de animales sin shock, se realizó un estudio temporal del efecto de la sulfasalazina utilizando inyecciones a 3 y 24 hs. después del entrenamiento.

El razonamiento para este experimento fue que si el efecto de la droga es específico sobre la formación de la memoria, su acción debe ser restringida al período de consolidación, mientras que un efecto inespecífico no tendría una ventana temporal, y sucedería con cada inyección sin importar el tiempo pasado desde el entrenamiento. Con este propósito, se administro shock eléctrico a seis grupos de 10 animales cada uno, después de entrar al compartimiento oscuro y se los inyectó con vehículo o con 5 mM de sulfasalazina a 0, 3 y 24 hs. después del entrenamiento. Como se esperaba para un efecto específico de la droga sobre la consolidación de la memoria, sólo el grupo inyectado con sulfasalazina inmediatamente después del entrenamiento mostró en latencias significativamente menores que el grupo inyectado con vehículo ($U=4.5$ $p<0.01$) (**Figure 1 D**). Más aún, las latencias de los grupos inyectados con sulfasalazina a 3 y 24 hs. fueron significativamente más altas que las del grupo inyectado con sulfasalazina inmediatamente después del entrenamiento ($U=7.0$ $p<0.01$ y $U=14.5$ $p<0.01$ respectivamente).

Los resultados obtenidos en estos experimentos indican que la sulfasalazina impide la retención cuando se administra inmediatamente después de entrenamiento, sugiriendo que la memoria de largo término es impedida en forma dependiente de la dosis y del momento de inyección de la droga.

La indometacina inhibidor de la ciclooxigenasa (COX) no induce amnesia.

Los experimentos a continuación apuntan a evaluar si el efecto amnésico de la sulfasalazina puede ser explicado por un efecto sobre la actividad de la ciclooxigenasa. Ya que se encuentra descrito para la sulfasalazina un efecto leve y controvertido sobre la actividad de esta enzima. Con este objetivo se utilizó la indometacina, un inhibidor de la ciclooxigenasa y prostaglandinas que se sabe no interfiere con la vía del NF-kappa B (Yin et al, 1998). Los animales se distribuyeron en 3 grupos, uno se inyectó luego del entrenamiento con vehículo, otro con 166 μM de indometacina y el tercer grupo con 500 μM de indometacina. Dosis más altas no se utilizaron con el objetivo de evitar los efectos inespecíficos sobre el comportamiento (Merlo et al., 2002). Todos los animales recibieron shock durante el entrenamiento. Los resultados de la sesión de evaluación se muestran en la **Figura 1 C**. Todos los grupos mostraron niveles altos y similares de latencias, sin diferencias significativas, indicando que la indometacina no impide la retención en las dosis examinadas.

La inhibición de NF-kappa B por kB decoy impide la formación de la memoria de largo término.

Para continuar evaluando la participación de la vía de NF-kappa B en la formación de la memoria se decidió utilizar otra estrategia de inhibición independiente. Con éste objetivo se realizó una inhibición directa de la activación de NF-kappa B utilizando un DNA de doble cadena que contiene la secuencia consenso kB (kB decoy), para desplazar al factor de

transcripción de sus sitios normales unión en el ADN genómico. Primero evaluamos si el kB decoy era capaz de inhibir al NF-kappa B en el hipocampo, un área del cerebro involucrada en esta tarea. De acuerdo con trabajos previos (Freudenthal et al., 2004), los retardos electroforético utilizando en los extractos nucleares hipocampales rinden tres bandas específicas caracterizadas como tales, por ensayos de competencia en la **Figura 2 A**. Estas bandas se compiten con un exceso de oligonucleótido kB no marcado, mientras que un exceso 100 veces mayor de secuencias no relacionadas (CRE y AP-1), es incapaz de competir las. La banda de mayor retardo corresponde a los complejos: al heterodímero p65/p50 y al homodímero p50/p50 (Krushel et al., 1999) como se muestra en el ensayo de supershift con un anticuerpo que reconoce la señal de localización nuclear (NLS) del p65. Este anticuerpo, en vez de retrasar más la banda correspondiente a p65/p50, la suprime ya que al reconocer la secuencia NLS, interfiere con el sitio de unión al ADN (**Figura 2 A**). Esta banda superior fue la que se utilizó en todos los análisis densitométrico de este trabajo. Sesenta μ g de kB decoy se administraron icv a 8 animales naive (grupo decoy) y se establecieron 2 grupos control, uno inyectado icv con solución salina (VEH grupo, n=8) y el otro con 60 μ g de un oligonucleótido igual excepto por una base mutada (kb decoy mutado) (grupo m-decoy n=8). Dos horas después de la inyección los animales se sacrificaron y se les disecó el hipocampo. El análisis densitométrico de los EMSAs reveló que el grupo decoy, pero no el m-decoy, mostró niveles significativamente menores de densidad óptica relativa, indicando que el kB decoy inhibe el actividad de NF-kappa B y que la inhibición es específica de la secuencia consenso completa (**Figura 2B y 2C**). Sesenta μ g de kB decoy marcado con fluoresceína en su extremo 5', se inyectaron icv a un ratón naive y dos horas más tarde el animal se sacrificó y se realizaron secciones con su cerebro, mostrando fluorescencia en distintas áreas del mismo. En la **Figura 2 D** una microscopia muestra la fluorescencia asociada al kB decoy en células del giro dentado y CA3, demostrando que luego de transcurrido este tiempo después de la inyección, el oligonucleótido alcanza las células del hipocampo.

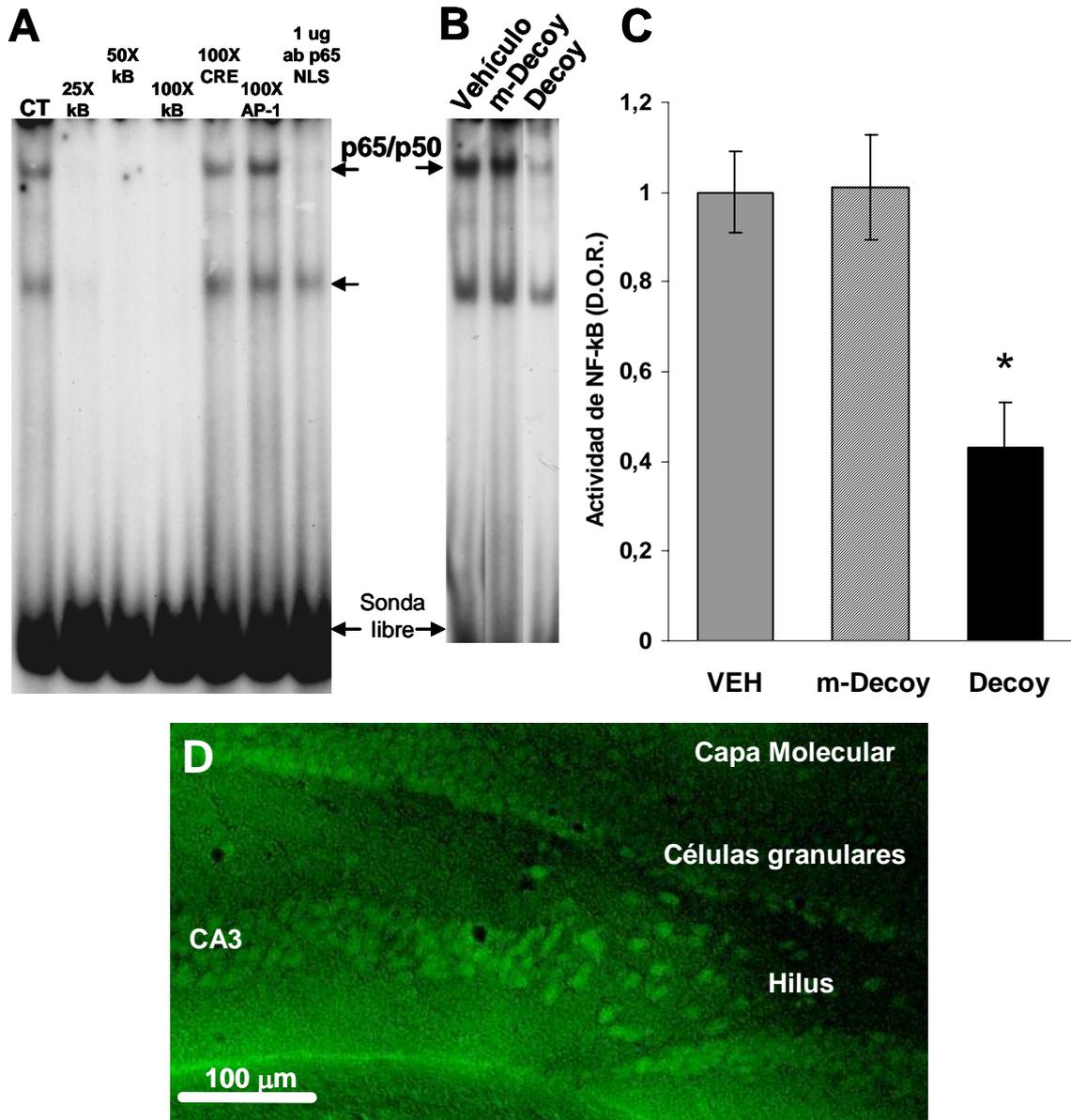


Figura 2: Efecto de la administración icv de kB decoy sobre la actividad de NF-kappa B en el hipocampo. **A.** EMSA representativo, competición con kB, secuencias consenso no relacionadas (CRE y AP-1) y supershift con anticuerpo anti p65 NLS. **B** y **C**, inhibición de la actividad de NF-kappa B en el hipocampo 2 hs. después de inyectados con kB decoy. **B**, EMSA de extractos hipocampales de ratón 2 hs. después de ser inyectados icv con vehículo (VEH), kB decoy mutado (m-Decoy) o kB decoy (Decoy). **C.** Media \pm el ES de la densidad óptica relativa, obtenida por densitometría, N=8 por grupo. *: $p < 0.05$. **D**, micrografía mostrando la distribución de kB decoy marcado con fluoresceína, en el giro dentado y CA3, 2 hs. después de una inyección icv.

En el siguiente experimento evaluamos si la administración que kB decoy es capaz de inducir amnesia. Los animales se inyectaron con kB decoy 2 hs. antes del entrenamiento y se dividieron en dos grupos. Uno de ellos recibió shock durante el entrenamiento (S-Decoy) mientras que el otro se expuso el contexto pero sin shock (NS-Decoy). Vehículo y kB decoy mutado también se inyectaron a grupos con y sin shock (NS-m-Decoy, S-m-Decoy, NS-VEH y S-VEH), como control para la administración de ADN y solución salina. Durante el entrenamiento se evaluaron las latencias de los distintos grupos, éstas no mostraron diferencias entre grupos (**Figura 3 A**). Este hecho sugiere que la administración de ADN no altera el comportamiento normal de los ratones durante el entrenamiento. La **Figura 3 A** de muestra los resultados de una sesión de evaluación realizada 48 horas después de entrenamiento.

El grupo S-Decoy muestra latencias significativamente menores las de los otros grupos que recibieron shock ($U= 4.00$, $p<0.05$), indicando que el kB decoy induce amnesia y que la administración de kB decoy mutado no afecta la memoria de largo término en los ratones y en general, la actividad en el ensayo de evaluación. Los grupos que no recibieron shock muestran diferencias significativas con lo grupos S-VEH y S-m-Decoy, indicando retención. Además no se encontraron diferencias entre grupos que no recibieron shock, demostrando en los animales infectados con ADN se comportan normalmente en el ensayo de evaluación.

Estos experimentos revelan que la inhibición específica de NF-kappa B por administración de secuencias de ADN consenso (kB decoy) impiden la retención a largo término, mientras que la mutación de una sola base de la secuencia (kB decoy mutado) impide el efecto amnésico.

Curso temporal de la activación de NF-kappa B en el hipocampo durante la consolidación de la memoria.

La formación hipocampal es una estructura clave implicada de almacenamiento de ciertos tipos memoria que involucran procesamiento de

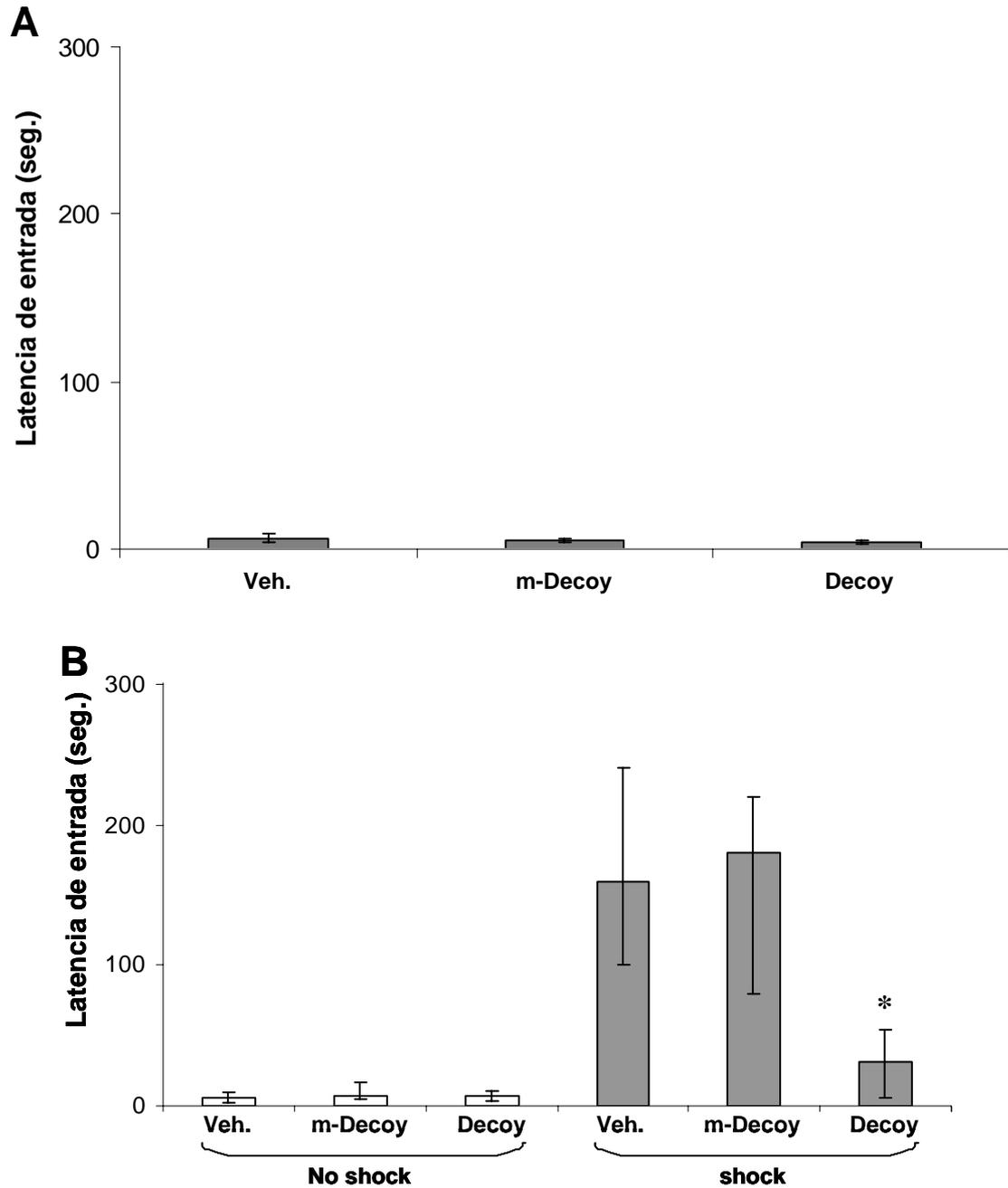


Figura 3: Efecto de la administración de kB decoy sobre la retención de largo término. Mediana +/- los rangos intercuartiles de las latencias para entrar en el compartimiento oscuro de animales inyectados con vehículo, kB decoy mutado (m-Decoy) o kB decoy (Decoy), que recibieron un shock eléctrico o no durante el entrenamiento. **A.** Latencias en el entrenamiento **B.** Latencias en la sesión de evaluación *· $n < 0.05$

información contextual. Los paradigmas de evitación inhibitoria se sabe que dependen de la función hipocampal (por ejemplo, Izquierdo et al., 1997). Resultados obtenidos en la sesión previa indicando que la actividad de NF-kappa B es necesaria para la consolidación de la memoria de esta tarea. Por eso en esta sección se evalúa la actividad de NF-kappa B en el hipocampo durante la consolidación. Con éste propósito se estimó la actividad de NF-kappa B mediante EMSA a los 15, 45, 60, 120 y 240 min. después del entrenamiento, en tres grupos de animales: animales con shock durante el entrenamiento (grupo S), sin shock durante entrenamiento (grupo NS) y animales naive no tratados (grupo NV).

A los tiempos correspondientes después de entrenamiento, se sacrificaron los ratones y se realizaron los extractos nucleares con el hipocampo y cada uno. La **Figura 4 B** muestra EMSAs representativos de los 3 grupos en cada tiempo y la **Figura 4 A** muestra el gráfico de todos los datos densitométricos. Sorprendentemente, encontramos un nivel de densidad óptica relativa significativamente más bajo en lo grupos S y NS respecto del grupo NV a los 15 min. de terminado el entrenamiento ($p < 0,05$ para ambas comparaciones en el test de Dunnet), indicando una inhibición en la actividad de NF-kappa B. En contraste, 45 min. después del entrenamiento los valores de densidad óptica relativa en los grupos S y NS eran significativamente mayores ($p < 0,05$ para ambas comparaciones en el test de Dunnet) que los del grupo NV, indicando un aumento de la actividad del factor de transcripción en ambos grupos a este tiempo. La actividad en S y NS luego de 1 hora de terminado el entrenamiento disminuyo, regresando a los valores del grupo NV en los puntos temporales de 2 y 4 hs.

Discusión

En este capítulo se reporta evidencia que revela la participación de NF-kappa B en la consolidación de la memoria de largo término en el paradigma de evitación inhibitoria en ratones. En este trabajo se utilizaron 2

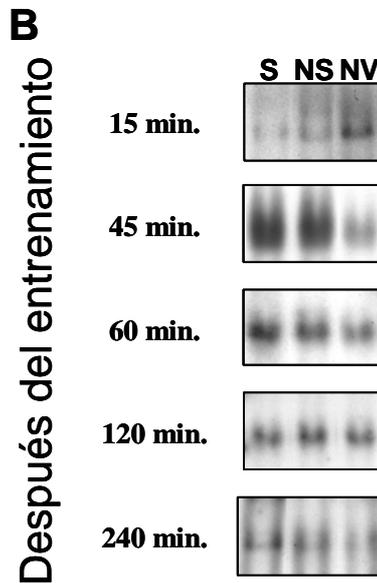
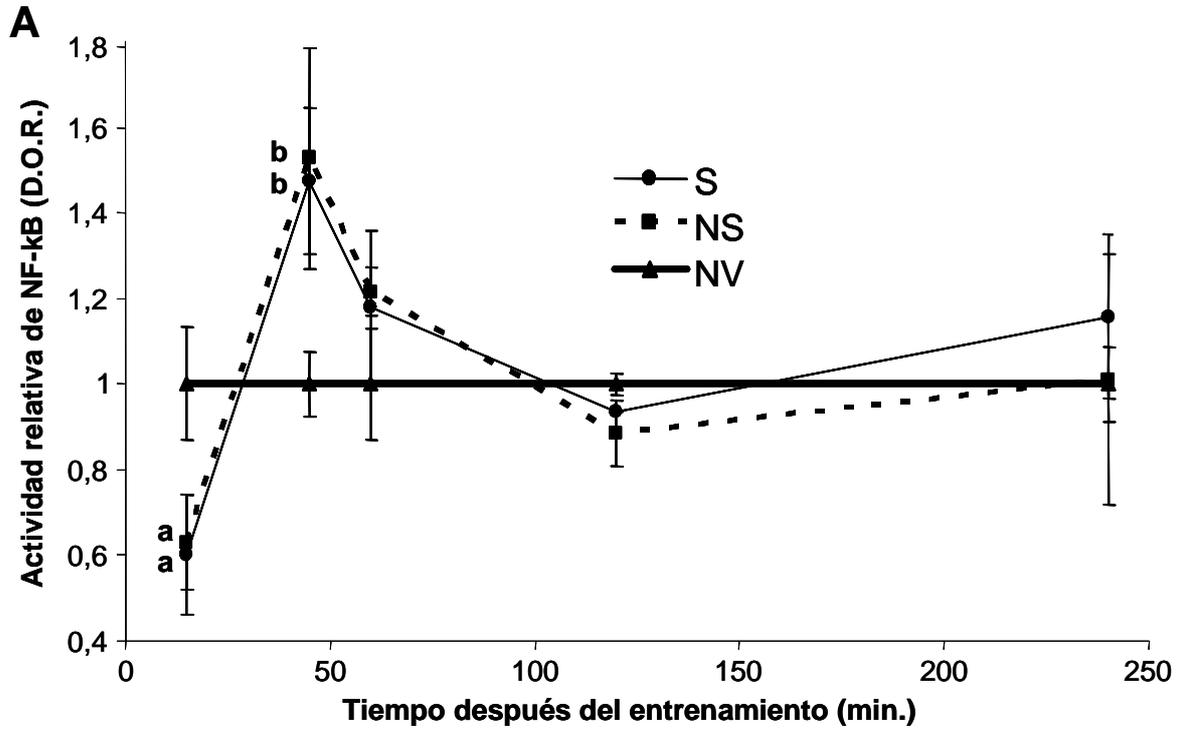


Figura 4: Curso temporal de la activación de NF-kappa en el hipocampo luego del entrenamiento. A. Medias +/- el error estándar de los valores de densidad óptica relativa para el complejo p65/p50, a diferentes tiempos después del entrenamiento. 15 min, N=8; 45 min., N=12; 1 h, N=6; 2 h, N=2 y 4 h, N=4. *: p<0.05. B. EMSAs representativos de para 15, 45, 60, 120 y 240 min. post entrenamiento. Para los grupos con shock (S), sin shock (NS) y naive (N).

estrategias independientes para la inhibición de NF-kappa B, durante la consolidación. El conjunto de los datos de estas 2 estrategias lleva a la conclusión de que el NF-kappa B es necesario para la formación de la memoria, basados en el hecho de que en ambos casos la inhibición del factor de transcripción impidió la retención. En la primera serie de experimentos, la administración de sulfasalazina, un inhibidor de IKK y por lo tanto de la activación de NF-kappa B, fue capaz de inducir amnesia en forma dosis y tiempo dependiente. La administración de drogas después del entrenamiento, influyen la memoria sólo si esto sucede poco tiempo después del aprendizaje (McGaugh, 1973). Esta dependencia temporal característica del efecto de algunas drogas se interpreta generalmente como una evidencia de una alteración del almacenamiento (McGaugh, 1989). Estos resultados concuerdan con esta hipótesis y sugieren un efecto de la sulfasalazina sobre los mecanismos de modulación del almacenamiento de memoria. El uso de un inhibidor específico de la COX, como es la indometacina, no produjo amnesia sugiriendo que la sulfasalazina ejerce efecto amnésico específicamente a través de la inhibición de IKK. Resultados similares, con dosis similares, se obtuvieron previamente en el paradigma de memoria contexto señal de cangrejo *Chasmagnathus* (Merlo et al., 2002). En una segunda serie de experimentos se usó kB decoy para producir una inhibición directa del NF-kappa B. Dos horas después de la administración del kB decoy en el cerebro se encontraron altos niveles de inhibición de la actividad NF-kappa B. Coincidentemente, el kB decoy fue capaz de inducir amnesia cuando fue administrado dos horas antes del entrenamiento. Considerando que el NF-kappa B ya se encuentra activo en el hipocampo 45 minutos después de entrenamiento (**Figura 3**), se esperaría que el kB decoy bloquee la activación del factor de transcripción durante la consolidación. La acción específica del kB decoy sobre el NF-kappa B se evaluó usando una secuencia que contenía una sola mutación. La ausencia de efecto amnésico en este control desestima posibles efectos no específicos de la administración de ADN. El curso temporal de la activación de NF-kappa B en la formación hipocámpal revela una activación del NF-kappa B

45 minutos después de entrenamiento, aumento que sucede tanto los animales que recibieron shock como en lo que sólo fueron expuestos a contexto.

Por otro lado el nivel similar de activación observado en lo grupos hace poco sustentable la interpretación de que la activación observada se deba a un efecto no específico de la administración de shock. Estos resultados sugieren inicialmente que la activación no es específica del procesamiento de la asociación entre el estímulo condicionado (EC) y estímulo incondicionado (EI), sino más bien del procesamiento de EC solo. Sin embargo, otra interpretación sería que los ratones NS también están generando una asociación, con el mismo EC pero, en la cual el estímulo incondicionado es la novedad. Si esta última opción es cierta el hipocampo se encontraría procesando por igual asociaciones con refuerzo aversivo, como el shock eléctrico, y refuerzos neutros o apetitivos como la novedad o el encontrar un refugio.

Bajo la primera interpretación de los resultados, el hecho de que se encuentre la activación NF-kappa B en el hipocampo de los animales que recibieron shock tanto como en el de los que no lo recibieron, sugeriría que este proceso es parte de un evento no asociativo y los efectos sobre la memoria que vemos luego de inhibición del NF-kappa B, son por lo menos en parte debidos a la disrupción de este proceso en el hipocampo. Se ha propuesto que el hipocampo está involucrado en el procesamiento de información contexto espacial implicada en el condicionamiento contextual pero no en la representación del shock (Sanders et al., 2003). Nosotros proponemos, luego de experimentos preliminares, que la activación del NF-kappa B es parte de los mecanismos moleculares requeridos para el almacenamiento de características contextuales y espaciales que constituyen la codificación del EC, conectada con información pertinente al EI (shock o en el caso de los animales NS, la novedad), proveniente de otras áreas del cerebro como la amígdala y el neocórtex (Fanselow y Gale, 2003). El estudio del curso temporal también revela una inhibición inicial a los 15 minutos luego del entrenamiento en lo grupos expuestos a contexto tanto en

los sin shock como en los que lo tuvieron. Estudios recientes de análisis de expresión con la técnica de chip de genes subrayan la relevancia de la inhibición de expresión durante la consolidación, tomando en cuenta al gran número de genes que inhiben su expresión durante este proceso (Cavallaro et al., 2001; Cavallaro et al., 2002). Generalmente, los estudios sobre el rol de los factores de transcripción en memoria están enfocados en la regulación positiva. En este estudio, el uso de EMSAs para estimar la actividad del factor transcripción nos permitió detectar esta inhibición rápida y de corta duración. Los resultados presentados aquí provee la primera evidencia de que la actividad del NF-kappa B está regulada en el hipocampo durante la consolidación, indicando el rol de este factor de transcripción como parte de los mecanismos moleculares de almacenamiento de memoria.

CAPITULO 4

Activación de NF-kappa B después de
la inducción, *in vivo* de LTP.

Introducción.

Mientras las etapas tempranas de la potenciación de largo término (LTP) requieren de modificación post traduccional de proteínas ya presentes en la sinapsis (ej., Lovinger et al., 1986), las fases más tardías involucran la regulación de la expresión génica por factores de transcripción inducibles y constitutivos, que se cree que controlan los cambios durables de potencia sináptica (Tischmeyer et al., 1990; Anokhin et al., 1991; Alberini et al., 1994). Evidencias iniciales sugieren que el NF-kappa B cumple un rol en la plasticidad neuronal. La expresión del gen Rel A (p65) en células granulares del hipocampo aumenta 60 minutos después de estimular tetánicamente con alta frecuencia (EAF) la vía perforante del hipocampo *in vivo* (Meberg et al., 1996). Además, un incremento en los niveles de ARNm de la subunidad p50 sucede en todos los animales estimulados eléctricamente, tanto en los estimulados con alta frecuencia como en los estimulados con una frecuencia baja (EBF), que no induce cambios en la potencia, cuando se los compara con animales sham.

Consistente con estas observaciones la administración intra hipocampal de ADN kB decoy bloquea la depresión de largo término (LTD) y reduce la amplitud del LTP (Albensi y Mattson, 1999). El presente trabajo apunta a extender el estudio de factores de transcripción que participan en procesos de plasticidad sináptica, mantenimiento del LTP y consolidación de la memoria.

Las metas específicas del estudio fueron: primero, determinar si la inducción de LTP incrementa la actividad de unión de NF-kappa B a sus secuencias de reconocimiento, mediante EMSA; y segundo, identificar el patrón de activación celular del NF-kappa B en las subáreas del hipocampo después de la inducción de LTP, mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo contra la forma activa del factor transcripción.

Resultados.

Estimulación de alta frecuencia de la vía perforante incrementa significativamente la pendiente positiva inicial en la primera ola, de los potenciales post-sinápticos excitatorios de campo (fEPSP), registrados en la capa de células granulares del giro dentado, así como también aumenta la amplitud de las poblaciones de espigas (**Figura 1 A y B**). La estimulación de baja frecuencia por el contrario no cambia ninguno de estos parámetros (**Figura 1 C**). La **Figura 1 D** muestra respuestas evocadas representativas antes y después de la EAF, y la **Figura 1 E** muestra la forma en que se midieron pendiente y amplitud. Para estimar el nivel de actividad del NF-kappa B se realizaron ensayos de retardo electroforético con oligonucleótidos de ADN doble cadena conteniendo la secuencias kB, en extractos nucleares del hipocampo entero. Los extractos nucleares provenían de animales pertenecientes a tres grupos: animales naive no tratados, animales EBF y animales EAF.

Los animales control naive no tuvieron contacto con el dispositivo experimental, se los anestesió y sacrificó en paralelo con los otros animales. Los animales EBF, se estimularon cada 30 seg. durante 2 horas 15 min.; y los EBF se estimularon por 2 horas a baja frecuencias, se los tetanizó con el protocolo de alta frecuencia y se los estimuló por otros 15 min. a baja frecuencia para corroborar la potenciación.

Cinco bandas de retardo se detectaron en los retardos electroforéticos, de las cuales tres corresponden a complejos proteicos que se unen que claramente de forma específica a la secuencias kB, como se muestra en los ensayo de competencia (**Figura 2 A**). En este estudio, excesos de 25, 50, y 100 veces de oligonucleótido kB compiten completamente estos tres complejos. Estas mismas bandas no son competidas por excesos de 100 veces de oligonucleótido conteniendo secuencias consenso no relacionadas (OCT-1 y AP1). Este patrón de retardo electroforético concuerda con los descritos en otros trabajos para

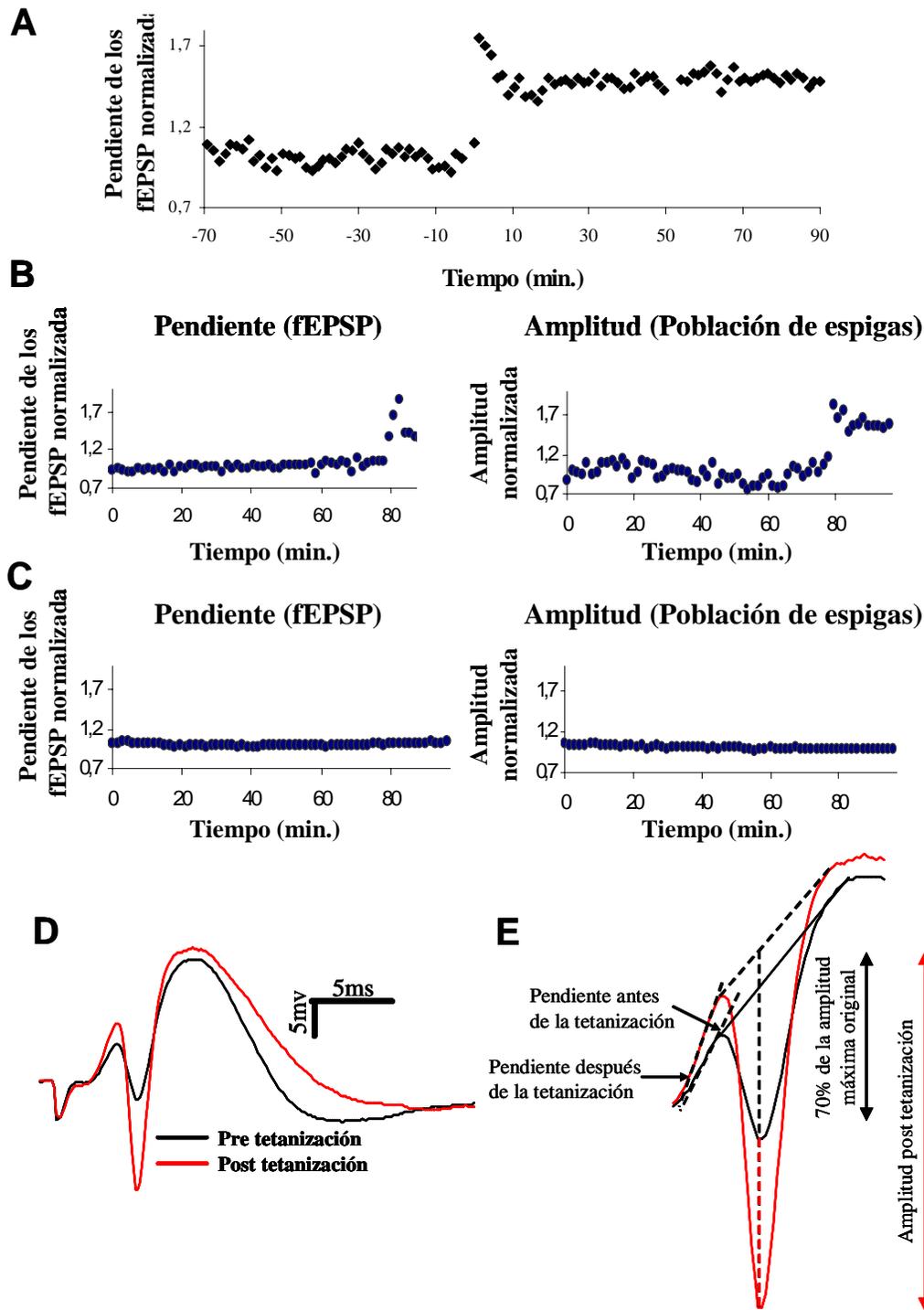


Figura 1: Demostración electrofisiológica de potenciación de largo termino. A. LTP inducido con el protocolo de estimulación tetánica utilizado en los grupos EAF. **B.** Promedio de la pendiente de la población de EPSP y amplitud de la población de espigas de 5 animales tratados con EAF. **C.** Promedio de la pendiente de la población de EPSP y la amplitud de la población de espigas de 5 animales tratados con EBF. **D.** Registros de respuestas evocadas antes (negro) y después (rojo) de una EAF. **E.** Medición de la pendiente y amplitud en los registros. La estimulación de baja frecuencia evoca siempre una respuesta que es el 70% del máximo calculado con una curva de entrada/salida (Figura 1, de Mat. Y Met.).

extractos nucleares del hipocampo (Unlap y Jope, 1997; Krushel et al., 1999; Yu et al., 1999), y un desplazamiento del retardo (supershift) realizado con el mismo anticuerpo que se usa en los ensayos inmunohistoquímicos se muestra en la **Figura 2 del capítulo 3** de esta tesis.

Comenzando del sitio de siembra de las proteínas, el primer complejo corresponden al heterodímero p65/p50 y el segundo complejo al homodímero p50/p50 (Krushel et al., 1999). El tercer complejo podría corresponder al regulador transcripcional RBP-Jk/CBF1, previamente encontrado en hígado (Lee et al., 2000). Extractos nucleares hipocampales de animales provenientes de los tres grupos detallados previamente, se utilizaron para la medición de actividad de NF-kappa B mediante EMSA. La **Figura 2 B** muestra retardos representativos, con altos niveles de actividad en los extractos de los animales EAF, en las 3 bandas específicas para complejos kB/proteína. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría, obteniéndose valores de densidad óptica relativa (DOR). Las medias \pm los errores medios estándar de DOR relativizados al control para la primera banda correspondiente a p65/p50, se encuentran graficados en la **Figura 2 C**. Un nivel más alto de actividad se observa en los extractos del grupo EAF (N = 5) respecto a los de los grupos control (N = 3) y EBF (N = 5). El incremento en la actividad de NF-kappa B fue estadísticamente significativo (análisis general de varianza [ANOVA], F (2,10) 7,14, $P < 0,05$; Duncan test, EAF vs. EBF, $P < 0,05$; EAF vs. Control, $P < 0,05$; EBF vs. control, no significativo). Resultados similares se obtuvieron para el análisis de las otras bandas (datos no mostrados). De esta manera, la activación nuclear del NF-kappa B, interpretada como su actividad de unión a la secuencia consenso kB, sólo se observa en el hipocampo sólo luego de una estimulación tetánica que induce LTP, pero no con una estimulación de baja frecuencia que no induce cambios en la potencia. Para localizar las áreas del hipocampo en las cuales se activa del NF-kappa B después de la EAF, se realizaron estudios inmunohistoquímicos con un anticuerpo dirigido contra la

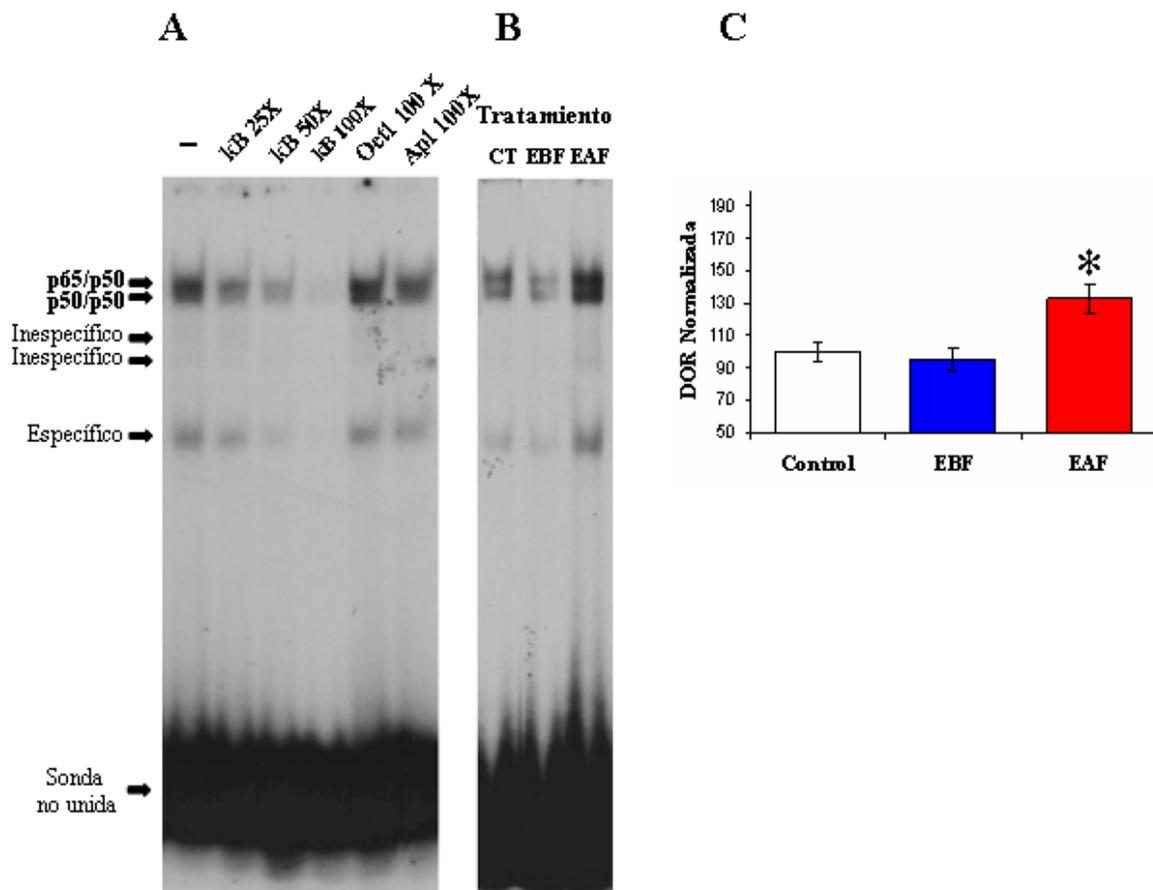


Figura 2: Activación nuclear de NF-kappa B en el hipocampo, estimada por EMSA. A. Ensayo de especificidad por competencia con cantidades crecientes de secuencia kB no marcada y con secuencia no relacionadas. **B.** Retardos representativos de los tres tratamientos. **C.** Análisis densitométrico de retardo correspondiente al complejo AND-p65/p50. Anova general, $P = 0,0118$; Duncan test: * EAF vs Control $P = 0,0187$, EAF vs EBF. $P = 0,0115$ y EBF vs control, NS. EAF, $n = 5$; EBF, $n = 5$; control, $n = 3$.

secuencia NLS de la subunidad p65, que reconoce específicamente la forma activa del factor transcripción (Kaltschmidt et al., 1995).

Inicialmente se evaluó la habilidad de éste anticuerpo para detectar el p65 de ratón en western blot. Encontrándose una señal clara en los extractos nucleares hipocampales de ratón, similares a la encontrada en los extractos nucleares hipocampales de rata (**Figura 2 D** del capítulo I) y células 293 humanas (Kaltschmidt et al., 1995). Los animales tratados con EAF, EBF y controles se perfundieron 15 minutos después del tratamiento, y se realizaron secciones coronales de cerebro que fueron utilizadas para la inmunohistoquímica. La **Figura 3 A** muestra tinciones del hipocampo representativas para cada grupo. Un alto nivel de inmunoreactividad se encontró en los grupos EAF y EBF, en el giro dentado, CA3 (con mayor detalle en la **Figura 3 B**), y CA1 respecto de las secciones de los animales control. Este incremento se encontró tanto en los hemisferios ipsilaterales como en los contralaterales respecto del sitio de estimulación. Los niveles más altos de actividad se encontraron en el grupo EAF para todas las áreas analizadas. También se realizaron controles sham para averiguar si la introducción de electrodos *per se* inducía la activación de NF-kappa B. El nivel de inmunoreactividad en estas secciones fue equivalente al encontrado en las secciones de los animales control naive (datos no mostrados). El análisis densitométrico de las principales áreas con somas celulares y sus neuropilos asociados, se realizó en el Hilus, la capa de células granulares, las capas de células piramidales CA3 y CA1 (**Figura 3 C**), para obtener información semi cuantitativa. Diferencias significativas en la inmunoreactividad para p65, se encontraron en el hipocampo de animales con los distintos tratamientos de estimulación, al mismo tiempo que no se encontraron diferencias estadística significativas entre hemisferios ipsi y contralateral. En el hemisferio ipsilateral, todas las áreas hipocampales analizadas mostraron valores de DOR mayores para el grupo EAF que para el grupo control, y en el hilus, EAF mostró valores mayores de DOR que los del grupo EBF. Resultados similares se

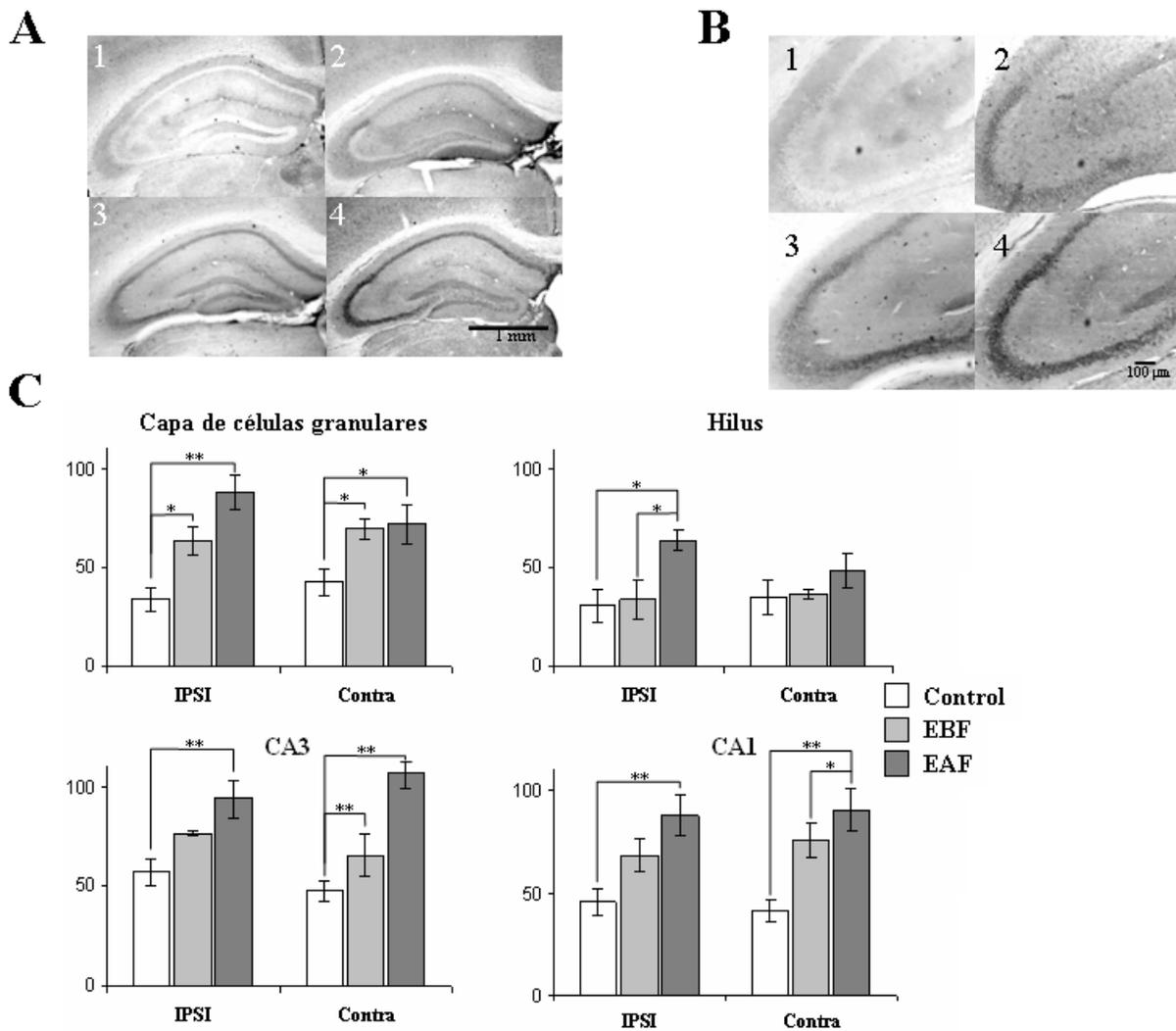


Figura 3: Tinción inmunohistoquímica de hipocampo con el anticuerpo anti p65 activado. A. Cortes representativos de hipocampo teñidos con el anticuerpo contra NLS de p65, para las 3 condiciones electrofisiológicas: 1, tinción control sin anticuerpo primario; 2, animal control no estimulado; 3, animal EBF; 4, Animal EAF. **B.** Tratamientos en el mismo orden que en A del área CA3, con mayor aumento. **C.** Análisis densitométrico: media de los valores de DOR \pm el error medio estándar de la capa de células granulares, hilus, neuronas piramidales CA3 y neuronas piramidales CA1 de cada grupo (EAF, N=5; EBF, N=4; Control, N=5). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ en el test de Duncan.

obtuvieron el hipocampo contralateral, excepto para el hilus en el que el efecto se vio restringido al hipocampo potenciado (**Figura 3 C**, panel derecho superior).

Luego de analizar los niveles de activación de las distintas áreas, algunas células del Hilus, se destacaban en su nivel de tinción y por los cambios inducidos con los distintos tratamientos. Esta zona llamada también polimórfica, posee varios tipos celulares siendo uno de los más frecuentes, las células mossy (exitatorias, glutamatergicas), células de entre 25-35 μm , multipolares y con una forma ligeramente triangular (Amaral y Witter, 1995), características similares a la **Figura 4 A** del grupo EBF. La **Figura 4**, muestra tinciones representativas de los tres distintos tratamientos y la medición de las densidades ópticas correspondientes al citoplasma y núcleo en las células de hilus. En los gráficos de la **Figura 4 B**, puede observarse que no hay cambios significativos de actividad en el citoplasma de estas células en ninguno de los tratamientos, mientras que la medición nuclear muestra diferencias significativas entre los grupos control (contra N=28) (ipsi N=36) y EBF (contra N=30) (ipsi N=27), comparados con los animales EAF (contra N=66) (ipsi N=68) (análisis general de varianza [ANOVA]: nuclear contralateral, $F(2,121) 7,67$, $P < 0,05$, nuclear ipsilateral, $F(2,128) 5,27$, $P < 0,05$; con iguales resultados, en el Duncan test, EAF vs. EBF, $P < 0,05$; EAF vs. Control, $P < 0,05$; EBF vs. control, no significativo). Este resultado indica que gran parte del aumento de la inmunoreactividad observada en las mediciones de las áreas somáticas, se deben en parte a translocación de factor de transcripción activo al núcleo.

Discusión.

El presente trabajo es consistente con la idea de que el factor de transcripción NF-kappa B es reclutado durante la elaboración de la plasticidad neural del LTP. Dos líneas convergentes, de evidencia independiente, en este

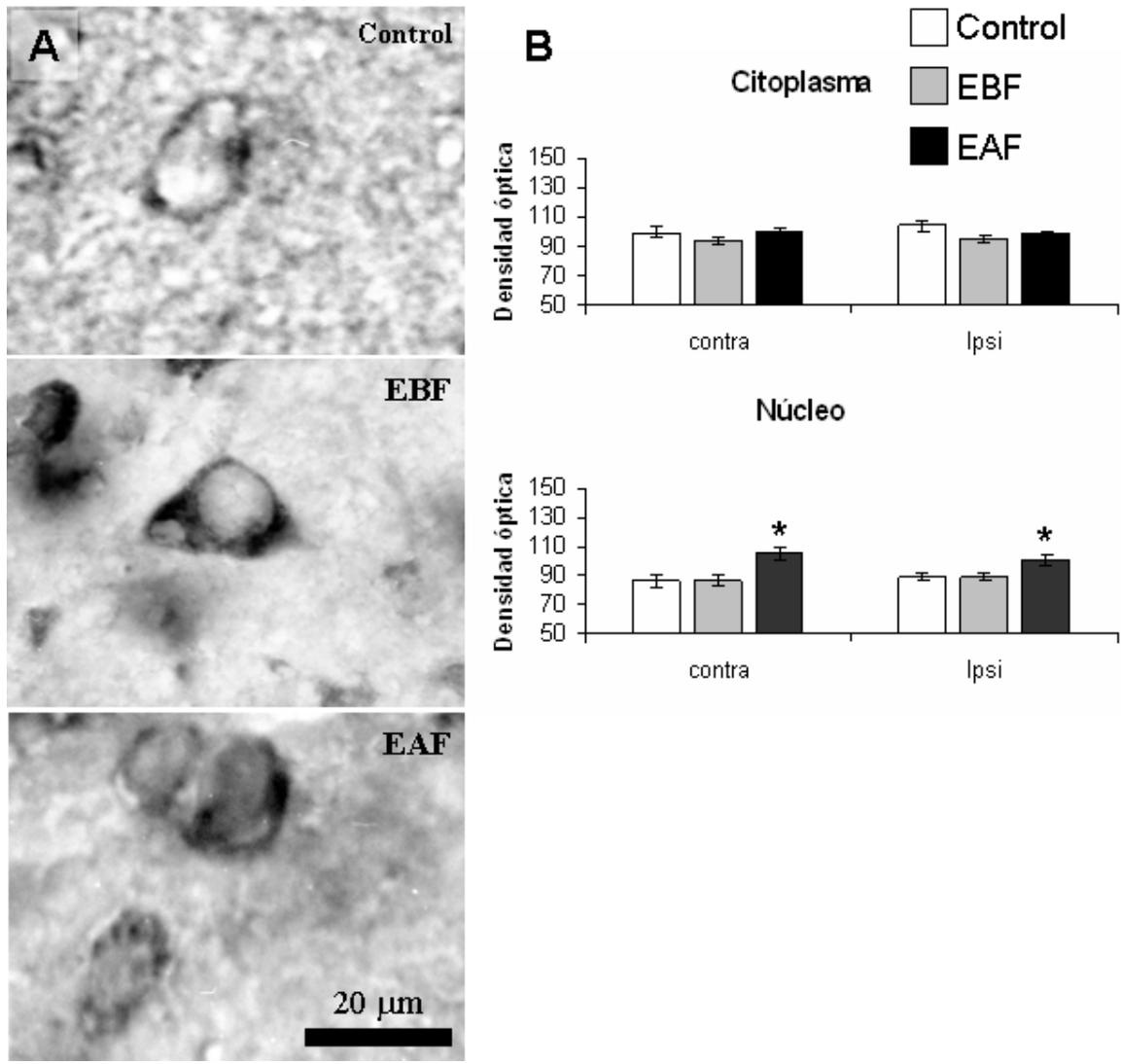


Figura 4: Inmunohistoquímica contra p65 en células mossy del Hilus. A. Inmunoreactividad contra p65 en células mossy del Hilus, para cada tratamiento. **B.** Gráfico de las densitometrías de citoplasma y núcleo de células. * $p < 0,05$. Las células mossy son las principales células del Hilus, y son reconocibles por la morfología barroca de sus procesos dendríticos.

capítulo apoyan esta conclusión. Primero, la activación nuclear del NF-kappa B en los ensayos de retardo electroforético se observó luego de la inducción de LTP en la vía perforante por EAF. Tal activación no se observa luego de la EBF. Estos resultados sugieren que la activación de NF-kappa B puede ser importante para la expresión génica necesaria para el mantenimiento del LTP. Segundo, el análisis inmunohistoquímico utilizando el anticuerpo contra p65 activado, mostró un incremento en la inmunoreactividad luego de la EAF que induce LTP. A pesar de que los dos métodos muestran que la inducción de LTP activa al NF-kappa B, hay ciertas diferencias, las más notables en la comparación entre EBF y EAF. Con la excepción del área del hilus y sus células, la activación del NF-kappa B puede verse también en los animales EBF del estudio inmunohistoquímico. Esto puede deberse a que con esta técnica se revela tanto el NF-kappa B citoplasmático como el nuclear mientras que en los ensayos de EMSA sólo se observa el nuclear. El NF-kappa B activado que se observa en los animales EBF puede estar en el citoplasma, sin translocar al núcleo o con una cinética de translocación más lenta. Los niveles de NF-kappa B en el núcleo de las células del hilus, nos muestran esta localización subcelular y dan cuenta del aumento nuclear del factor de transcripción capaz de unirse al ADN. Los resultados observados en las células del hilus, se tornan más relevantes si consideramos la posibilidad de que se trate de células mossy. Estas células cuyos axones forman parte la vía asociacional / comisural (vía capaz de potenciarse), hacen sinapsis sobre las dendritas de las células granulares, de donde provienen sus propias aferencias y que son la principal vía de entrada del hipocampo. De nuestro conocimiento, el presente estudio, es el primero en utilizar el anticuerpo contra p65 activado en relación a efectos del LTP.

Es de notar, que los resultados principales presentados en este capítulo, concernientes a la activación de NF-kappa B, implican los componentes diferentes y previos a la transcripción en sí misma. De ésta manera, la disociación de p65 de su inhibidor (la inmunoreactividad del anticuerpo usado

en este estudio es indicativa de la separación de p65 de su proteína inhibitoria, I κ B), llevaría a la translocación del factor transcripción al núcleo y a la unión a sus sitios de reconocimiento (evaluado aquí en los resultados de EMSA).

Si bien estos mecanismos son considerados pasos previos cruciales, aún deben ocurrir la translocación nuclear y la activación de transcripción (Ghosh y Karin, 2002). La presencia de activación de NF-kappa B en las células del hilus es apoyada, por la demostración previa de actividad transcripcional luego de la inducción de LTP de características similares, en la vía perforante (Namgung et al., 1997; Kleschevnikov y Routtenberg, 2003). En este trabajo, se encontró activación p65 en el hilus, particularmente en células que recuerdan a las células mossy, sugiriendo que le NF-kappa B puede contribuir a la plasticidad sináptica en estas células como parte de mecanismos involucrados en el mantenimiento del LTP en la vía perforante.

En un trabajo previo, se estudió el nivel de ARNm para p50 después de inducir LTP en la vía perforante (Meberg et al., 1996). Como la activación de NF-kappa B puede inducir la expresión génica de p50, una elevada cantidad de ARNm para p50 es un marcador de actividad transcripcional dirigida por NF-kappa B. En el estudio llevado a cabo por Meberg et al (1996), se encontraron niveles aumentados de ARNm para p50 tanto en el grupo EAF como en el EBF 60 minutos después del tratamiento, en células granulares, CA3 y CA1. Esto es consistente con la activación de NF-kappa B encontrada en las mismas áreas y los mismos grupos 15 minutos después del tratamiento. Sin embargo, en este trabajo pero no en el de Meberg, se encuentran diferencias entre los grupos EAF y los EBF.

Conclusiones Generales

En los tres modelos estudiados de memoria y plasticidad estudiados en esta tesis los estímulos que inducen modificaciones de largo término cambian el estado de activación del factor de transcripción NF-kappa B. Por otro lado, como se observó en el capítulo 3 la inhibición de NF-kappa B, ya sea por acción directa sobre el factor de transcripción o por inhibición de la vía transduccional que lo activa, afecta o impide la formación de la memoria de largo término. En este caso, se inhibió la memoria de evitación pasiva en ratón mediante la administración icv de ADN kB decoy y por la administración de la droga sulfasalazina, inhibidor específico de IKK, la quinasa que activa NF-kappa B. En el modelo de memoria contexto señal en *Chasmagnathus* se observó que la inhibición de NF-kappa B mediante sulfasalazina impide la memoria de largo termino cuando es administrado en coincidencia con el inicio de las fases de activación de NF-kappa B durante la consolidación descritos en esta tesis en el capítulo 2. Efectivamente, la sulfasalasina es amnésica administrada inmediatamente antes del entrenamiento y 5 horas después del entrenamiento, pero no es amnésica cuando es administrada inmediatamente post-entrenamiento o 12 horas post-entrenamiento (Merlo et al., 2002). Más aún, la sulfasalazina es amnésica cuando es administrada 20 min. antes de la re-exposición de los animales al contexto del entrenamiento pero no cuando son expuestos a un contexto diferente; es decir, cuando la memoria es evocada (Merlo et al., 2005). NF-kappa B se activa con la evocación de la memoria y esa activación resultó ser entonces necesaria para mantener la memoria. La posibilidad de disrumpir una memoria luego de la evocación es un fenómeno descrito en muchos modelos animales, que pone de manifiesto la fase de reconsolidación o reestabilización de la memoria. En otros laboratorios, el uso de tratamientos para impedir la función de NF-kappaB también implicó un déficit de memoria y de plasticidad neuronal. Tal es el caso del uso de kB decoy en LTP *in vitro* en la vía Schaffer/colateral (Albensi BC & Mattson, 2000), el uso de kB decoy en amígdala de rata en la tarea potenciación de la respuesta de sobresalto por miedo (Yeh et al, 2004), del uso de ratones doble KO para el receptor de TNF y para p65, que muestran déficit en memoria

espacial (Meffert et al.,2003) y de ratones KO para c-Rel, que muestran déficit en tareas de aprendizaje dependientes de hipocampo (Levenson et al, 2004). Para una revisión ver Romano et al., 2006b)

La alta correlación observada en esta tesis entre la activación de NF-kappa B y la estimulación necesaria para inducir estos fenómenos de largo termino y la inhibición de dichos fenómenos por interferencia en la activación de NF-kappa B, apoyan fuertemente, junto con los resultados de otros laboratorios, nuestra hipótesis inicial sobre el papel clave de este factor de transcripción en el almacenamiento de información a largo término.

Características de la vía Rel/NF-kappa B en el sistema nervioso.

NF-kappa B en *Chasmagnathus*.

Un sistema de transducción de señales tipo Rel/NF-kappa B se encuentra en el cangrejo *Chasmagnathus*, compartiendo varias características con su homólogo en vertebrados.

Primeramente, el factor de transcripción de *Chasmagnathus* es capaz de reconocer específicamente a la secuencia consenso kB. Segundo, su amplia distribución en el sistema nervioso central concuerda con la encontrada en otros organismos, tanto su distribución en muchos de los neuropilos, como a nivel celular, en citoplasma, núcleos y sinaptosomas (Kaltschmidt et al, 1993; Povelones et al, 1998). Como evidencia extra, la distribución observada mediante EMSAs se corrobora con las tinciones inmunohistoquímicas. Por ejemplo una señal de retardo electroforético se encuentra en el tracto protocerebral, lugar poco esperable para un factor de transcripción dado el bajo número de núcleos, sin embargo esta señal se debe al factor de transcripción dentro de las neuritas, que se observan en las tinciones inmunohistoquímicas. Tercero, el factor de transcripción detectado mediante retardos electroforéticos se encuentra unido a una proteína de tipo IkappaB en el citoplasma de las células del ganglio supraesofágico, tal como lo demuestran los EMSAs realizados con el producto de la

inmunoprecipitación con un anticuerpo anti IkappaB. Evidencias de la presencia de IkappaB e IKK en *Chasmagnathus* se muestran en el trabajo de Merlo et al., 2002, en el se reporta inmunoreactividad para ambas proteínas con anticuerpos específicos. IkappaB es detectado por anticuerpos contra el total de la proteína y contra la proteína fosforilada, y la droga MG-132, un inhibidor del proteosoma, inhibe NF-kappa B e induce amnesia cuando es inyectado inmediatamente después del entrenamiento (Merlo y Romano, 2006). Estos datos sugieren que la activación canónica de NF-kappa B estudiada en mamíferos mediante regulación de la unión entre IkappaB y NF-kappa B, la fosforilación de Ikappa B por IKK y la degradación subsiguiente por el proteosoma, es una etapa crucial de la vía del NF-kappa B también en *Chasmagnathus* y que se observa luego de un entrenamiento que induce memoria de largo término. A su vez, el producto de la inmunoprecipitación con anticuerpo anti IKK alfa, posee actividad de fosforilación sobre IkappaB (Merlo et al, 2002). Todos estos datos apuntan a un sistema de tipo Rel/NF-kappa B de transducción de señales presente en *Chasmagnathus* y preservado en sus funciones fisiológicas durante la consolidación de la memoria.

Los resultados presentados en esta tesis sobre NF-kappa B en *Chasmagnathus*, dejan planteada la pregunta de que vías neuronales y neurotransmisores están involucrados en la activación de NF-kappa B. El neuropeptido angiotensina II (AII) se ha asociado con procesos de memoria y en *Chasmagnathus* cumple un rol importante en la formación de la memoria de largo término. Su administración antes del entrenamiento facilita la formación de la memoria y el antagonista del receptor de AII, saralasin, impide la formación de la memoria de largo término (Delorenzi et al., 1996). La AII se ha propuesto como un regulador de múltiples funciones fisiológicas, orquestando la respuesta a desafíos del ambiente, como privación de agua y aumento de la salinidad. La alta salinidad y la privación de agua, ambas aumentan los niveles de AII endógena, y correlacionan con facilitación de la memoria (Delorenzi et al., 2000; Frenkel et al. 2002), esta facilitación es revertida por saralasin. El NF-kappa B en el cerebro del

cangrejo es activado por AII y este efecto es revertido por saralasin. Este aumento del NF-kappa B nuclear también es producido por la alta salinidad y la privación de agua. (Frenkel et al., 2002).

Gran parte del factor de transcripción se encuentra en terminales sinápticas, distribución que ya ha sido descrita en varios modelos (Kaltschmidt et al., 1993; Guerrini et al., 1995; Meberg et al., 1996 y en esta tesis capítulos 1 y 2). El factor de transcripción NF-kappa B detectado en las terminales sinápticas mostró ser activable, dejando abierta la posibilidad de que se trate de un sistema de comunicación que de cuenta al núcleo de cambios sinápticos. Si bien no hay reportes del transporte retrogrado de este factor de transcripción desde las terminales sinápticas hasta el núcleo luego de un entrenamiento, en esta tesis se encuentra evidencia de su activación en ellas (**Capítulo 2**), y varios trabajos indican que luego de estimular eléctricamente axones y dendritas, el transporte retrogrado de NF-kappa B aumenta (Wellmann et al., 2001; Meffert et al., 2003). Incluso, es factible que la cinética de activación nuclear bifásica del factor de transcripción en *Chasmagnathus*, este reflejando la llegada al núcleo del factor de transcripción activado en terminales sinápticas durante la segunda ola. Esta posibilidad se ha visto reforzada por experimentos preliminares, en los que inhibidores de síntesis proteica reducen la segunda activación, aunque sin suprimirla. Como se mencionó en la introducción, la activación bifásica de NF-kappa B ha sido observada también en otros tipos celulares. En ellos, la segunda fase, a diferencia de nuestros estudios en *Chasmagnathus*, es totalmente dependiente de síntesis proteica.

Si evaluamos la distribución del factor de transcripción observada mediante inmunohistoquímica, podemos ver dos grandes concentraciones de la señal, una en la medula terminalis del protocerebro lateral y otra en el neuropilo anteromedial, del protocerebro medial. Una proporción importante de esta señal se debe a un único proceso que conecta las dos medulas terminalis pasando por el ganglio supraesofágico (**Figura 7 A**, de la caracterización). Esta extensa distribución (aproximadamente 6 mm entre la medula terminalis y el ganglio supraesofágico) nos deja una serie de

preguntas interesantes. Sin importar donde se encuentre el soma de este tipo de células, el factor de transcripción activo debe viajar una gran distancia que, recorrida a la mayor velocidad de transporte retrogrado descrita, tardaría al menos 15 hs. en alcanzar el núcleo. ¿Qué tipo de información necesita de estos tiempos para ser relevante en el núcleo? Esto nos lleva a otra pregunta: ¿No es posible un papel local relevante del NF-kappa B, distinto al que cumple en la transcripción? Ambas preguntas se encuentran aún sin respuesta.

NF-kappa B en el hipocampo de ratón.

Todos los distintos grupos neuronales del hipocampo muestran actividad variable de tipo NF-kappa B, tanto basal como inducible. En particular una área relativamente poco estudiada del giro dentado, el hilus, muestra una importante activación. En este área, también llamada polimórfica se encuentran las células mossy o musgosas, que poseen un feed-back positivo sobre las células granulares de gran número de aferencias (el feed back llega 1 a 1000 sobre las células granulares) que forman la vía asociacional/comisural del hipocampo, cuyo eje direccional es septo-temporal o sea ortogonal al clásico circuito trisináptico. Estas células muestran ser capaces de cambiar fuertemente su actividad de NF-kappa B. En experimentos realizados por K Sugiriendo un posible rol regulador del FT sobre la expresión génica de estas células.

Uso similar de las funciones fisiológicas de NF-kappa B, en crustáceos y mamíferos.

Similitud temporal de activación.

Entrenamientos que inducen memorias de largo término activan, a su vez, la unión al ADN de este **FT**, tanto en cangrejo como en ratón. En los dos modelos comportamentales NF-kappa B se activa luego de inducir una

memoria de largo término, sin embargo ambos difieren en la duración de la adquisición. El entrenamiento en cangrejo, de 15 presentaciones espaciadas, dura aproximadamente 45 min., mientras que el entrenamiento de un ensayo para evitación inhibitoria en ratón, no supera en ningún caso los 5 min. A pesar de ser estos entrenamientos tan distintos, no se puede dejar de notar la coincidencia del punto de mayor actividad, inmediatamente después del entrenamiento en el cangrejo (45 min. después de comenzado el mismo) y a los 45 min. en el ratón (50 min. después de comenzado el entrenamiento).

Farmacología similar.

La inhibición de la vía Rel/NF-kappa B, mediante la administración de sulfasalazina en el cangrejo resulta en un efecto amnésico (Merlo et al, 2002). Lo mismo que ocurre si se administra este inhibidor o el kb decoy (forma de inhibición directa del FT), a ratones en forma icv (capítulo 3), indicando que este sistema de señalización es requerido en ambas formas de memoria. Es notable, con respecto a la droga sulfasalazina, la coincidencia de dosis efectivas usadas en ambos modelos. En estudios realizados en *Chasmagnathus*, la administración de sulfasalazina inhibe a NF-kappa B en el cerebro al menos durante 45 minutos, desapareciendo su efecto a la hora de administración (Merlo et al., 2002). En *Chasmagnathus* esta droga es efectiva cuando se administra pre-entrenamiento, inhibiendo la activación de NF-kappa B que tiene lugar durante el entrenamiento. En los estudios en ratón, la administración se realizó inmediatamente post-entrenamiento. Considerando una cinética de inhibición similar a la observada en cangrejo, se espera que NF-kappa B esté inhibido en distintas áreas del cerebro del ratón, como el hipocampo, en el momento en que debería producirse su activación 45 minutos después del entrenamiento. De esta manera se considera que el efecto amnésico tiene lugar por impedir la activación de NF-kappa B al menos en el hipocampo, sin descartarse una activación en otras áreas.

NF-kappa B y crecimiento neurítico.

Este factor de transcripción se ha relacionado recientemente con el crecimiento neuronal en el sistema nervioso adulto (Gutierrez et al, 2005). Estos dos datos, junto con las evidencias enumeradas en esta tesis sobre el papel de NF-kappa B en memoria y plasticidad neuronal, sugieren que este factor de transcripción podría ser responsable de la regulación del crecimiento neurítico necesario para mantener los cambios plásticos de largo término.

La inhibición de esta vía de transducción de señales en distintos puntos inhibe la formación de la memoria. Estos resultados apoyan la idea de un papel evolutivamente conservado del NF-kappa B en la regulación transcripcional que sostiene las modificaciones neuronales de largo término necesarias para la consolidación de la memoria y, en forma más general, la plasticidad neural.

Resultados no publicados obtenidos en *Chasmagnathus*, muestran que la administración de cicloheximida (inhibidor de la traducción) atenúa la activación de NF-kappa B en la segunda fase, sugiriendo que parte de la proteína de esta segunda ola proviene de síntesis de *ново* (Freudenthal, Merlo y Romano, resultados no publicados). Coincidentemente, análisis de expresión génica con microarray durante la consolidación en el hipocampo (memoria contextual de miedo), indican un pico de regulación positiva 1 h. después de finalizado el mismo, seguido por un periodo de regulación negativa (2-4 hs, post entrenamiento) y una segunda ola subsecuente de expresión. La secuencia consenso de NF-kappa B se encontró entre los elementos de regulación compartidos por la mayoría de los genes relacionados con memoria regulados (Levenson et al., 2004).

En otro trabajo, la presencia de elementos de reconocimiento de NF-kappa B en los promotores de algunos genes se estudio mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChiP), una técnica muy útil para estudiar el reclutamiento de factores de transcripción y otras proteínas regulatorias a promotores blanco (Saccani et al., 2001). Luego de la

estimulación de macrófagos con LPS, se encontraron dos olas de activación de NF-kappa B. La primera de ellas es un reclutamiento rápido de NF-kappa B a promotores de genes inmediatamente accesibles y la otra corresponde a un reclutamiento más tardío de NF-kappa B a promotores que requieren de acetilación de histonas para hacerlos accesibles. De esta manera, las dos fases de activación de NF-kappa B encontradas después del entrenamiento podrían estar activando grupos diferentes de genes, siendo el primero requerido para una respuesta rápida y el segundo necesario para una respuesta de mayor duración.

Materiales y Métodos.

Capítulo 1 y 2

Animales, procedencia, mantenimiento

Animales

En toda esta tesis se utilizaron cangrejos *Chasmagnathus granulatus* provenientes de una población natural. Los individuos utilizados siempre fueron machos adultos y en un rango de tamaño específico, entre 26 y 30 mm de ancho máximo de caparazón en dirección ortogonal al eje de simetría (**Figura 6 de la introducción**). El peso húmedo promedio de los individuos era de 15 gr.

Lugar de captura

Chasmagnathus granulatus es un cangrejo eurihalino que habita las zonas costeras del sur de Brasil, Uruguay y Provincia de Buenos Aires, Argentina, ocupando bancos de limo mesolitoral y supralitoral de la zona de transición de agua dulce y marina. El lugar de captura de los animales para esta tesis fue en las rías de agua salobre de San Clemente del Tuyú, Prov. de Buenos Aires. Luego de su captura, los cangrejos eran transportados al laboratorio en recipientes especialmente diseñados para impedir el hacinamiento de los animales durante el transporte. La recolección de animales se realizó durante prácticamente todo el año y aproximadamente cada 15 días.

Mantenimiento de los animales

Durante su permanencia en el laboratorio y hasta ser utilizados, los animales eran mantenidos en un ambiente de acceso restringido, luz y temperatura controladas denominado cangrejario. Este ambiente se encuentra su vez subdividido en gabinetes aislados para asegurar la menor cantidad de perturbaciones y estrés a los animales. Dentro de cada gabinete los animales se

encuentran alojados en tanques plásticos rectangulares de 35 x 50 cm de base y 27 cm de altura, a una densidad de 20 animales por recipiente. Los tanques tienen un fondo de agua salobre de 2 cm de profundidad. El agua salobre esta preparada con agua corriente de clorada y sal marina para acuarios (Red-Sea, Israel) a una salinidad de 12 0/00 y pH 7,4 – 7,6. Los animales son mantenidos en un ciclo de luz-oscuridad de 12L:12O (7:00 – 19:00 luz) y a una temperatura ambiente entre 20 y 24 OC.

Comportamiento y medición

La respuesta de escape

Como *Chasmagnathus*, los cangrejos que habitan zonas intertidales, muestran ante estímulos que acarrear probables peligros una respuesta de escape conspicua y estereotipada. Lo marcado de este comportamiento, ha hecho que sirva de substrato para estudiar a nivel comportamental el procesamiento de la información visual, la integración de estímulos, mecanismos de orientación (Nishimoto y Herrmkind, 1978; Nalbach, 1987, 1990) y para estudios electrofisiológicos con el objeto de estudiar la circuitos neuronales que vincula la percepción visual con el sistema motor (Nalbach, 1990; Berón de Astrada et al., 2001; Berón de astrada y Tomsic., 2002).

En su hábitat natural, resulta sorprendente como *Chasmagnathus* reacciona rápida y sensiblemente a pequeños movimientos de objetos nuevos o introducidos en su campo visual con una vigorosa reacción de escape alejándose del objeto y en dirección al agua o hacia la cueva. Sin embargo, este cangrejo muestra una marcada habituación al movimiento de objetos con probada inocuidad. Este comportamiento, considerado como el aprendizaje acerca de la inocuidad de un estímulo visual fue trasladado al laboratorio y reproducido de manera tal de controlar muy precisamente la presentación de los estímulos y de cuantificar la magnitud de la respuesta de escape.

Estimulación y registro de la respuesta de escape

Para evocar la respuesta de escape de *Chasmagnathus* y medir su magnitud en condiciones de laboratorio se utiliza un dispositivo denominado actómetro (Figura 1). La sala de experimentación posee 40 de estas unidades de modo que permite al experimentador trabajar con 40 animales en forma simultánea. Cada actómetro consta de un recipiente plástico (C) de forma semi-esférica con paredes cóncavas y un fondo circular plano cubierto hasta 0.5 cm de agua salobre. El recipiente suspende por tres hilos de una estructura de madera y es iluminado con una lámpara de 10 W ubicada a 30 cm por encima. La base del

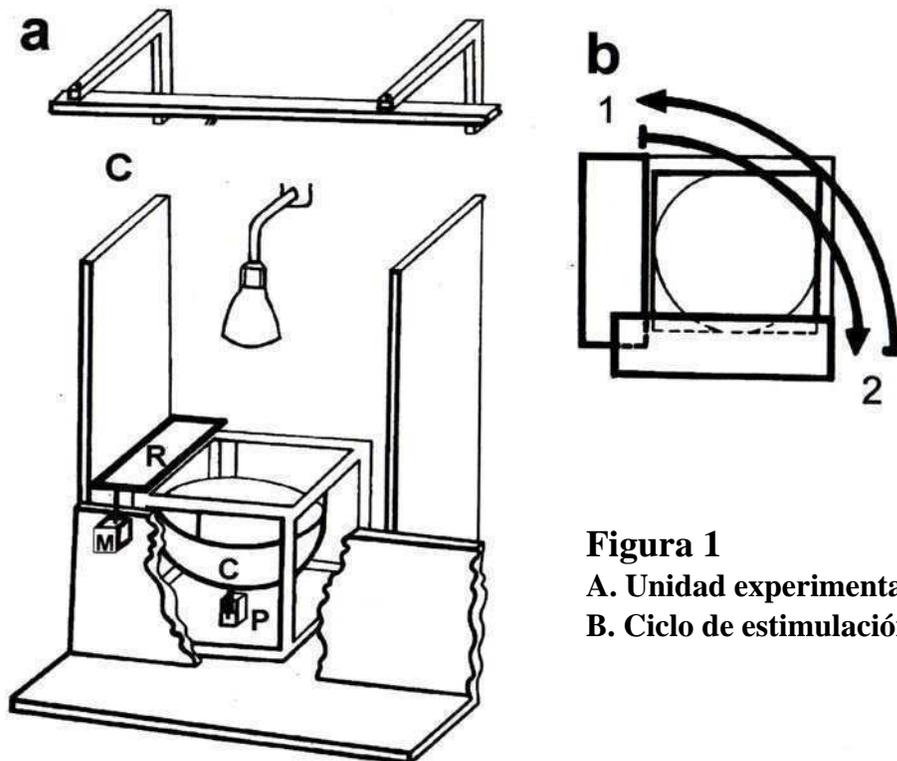


Figura 1
A. Unidad experimental: Actómetro
B. Ciclo de estimulación

recipiente se encuentra conectada a un transductor piezoeléctrico (P). Durante un experimento, un animal es alojado en el recipiente, y las vibraciones del recipiente producto de los movimientos del animal son convertidas por el transductor en señales eléctricas proporcionales. Las señales son amplificadas e integradas durante el tiempo de registro y traducidas por una computadora a una escala numérica.

Para evocar la respuesta de escape, existe una pantalla rectangular opaca (R) que movida por un motor (M) se desplaza horizontalmente entre el lactómetro y la iluminación, a la vista del animal alojado en el. Esto desencadena una respuesta de escape del animal en dirección definida y opuesta al movimiento de la pantalla. La forma del recipiente, sin borde ni ángulos internos provoca que el animal no encuentre refugio y la concavidad de las paredes hace que el animal siempre vuelva al fondo plano del mismo, por lo que la respuesta de escape siempre se desencadena en el centro del recipiente.

El rango de vibraciones detectado por el transductor piezoeléctrico, permite diferenciar entre un estado de inmovilidad del animal, la actividad exploratoria o locomotora básica y un vasto rango de magnitudes de respuesta de escape.

La estimulación y el registro de los cuarenta actómetros son controlados desde una computadora. Esta permite programar secuencias de estimulación, conformadas por el número de pasajes de la figura e intervalos deseado. Permite a su vez programar distintas secuencias simultáneas para los distintos actómetros, de modo de tener distintos grupos experimentales simultáneamente y a su vez registrar la respuesta de escape de cada uno.

Ensayo de estimulación

A lo largo de esta tesis se denomina ensayo a una estimulación que consiste en dos ciclos del pasaje de la pantalla. Cada ciclo comprende el movimiento de la pantalla desde una posición 1, hasta una posición 2, y el regreso a la posición 1 lo que dura aproximadamente 2.5 segundos (**Figura 1 B**). El ensayo completo tiene una duración total de 9 segundos, conformado por 2 ciclos del pasaje de la figura y dos intervalos de 2 segundos (ciclo-intervalo-ciclo-intervalo). Durante los nueve segundos se registra e integra la actividad del animal.

El diseño cíclico del ensayo, con la pantalla moviéndose en ambas direcciones encierra un propósito que es el de asegurarse que la pantalla entre en el campo visual de los animales por mas de un lado, garantizando una estimulación

similar en todos los animales, independiente de la ubicación y sentido que cada animal haya adoptado en el recipiente.

Procedimientos de entrenamiento y evaluación

En esta tesis se realizaron experimentos farmacológicos con evaluación comportamental y experimentos bioquímicos, ambos en relación con aprendizaje y memoria. Todos los experimentos farmacológicos se basaron en un diseño de dos sesiones de estimulación separadas por periodos de 24 o 48 hs., tal que la primera sesión de estimulación consiste en lo que se denomina sesión de entrenamiento y la segunda en la sesión de evaluación. Los experimentos bioquímicos constan solo de la sesión de entrenamiento.

En la sesión de entrenamiento los animales son colocados por primera vez en el dispositivo experimental. Se define animales entrenados a los que reciben la presentación reiterada del pasaje de la figura y animales contexto a los que durante el mismo periodo permanecen en el dispositivo sin ser estimulados. Durante la sesión de evaluación todos los animales reciben la estimulación.

Criterio de selección de los animales

Antes de comenzar con la sesión de entrenamiento cada animal era sujeto a una prueba comportamental que revela su estado general y locomotor. Cada animal es tomado y apoyado dado vuelta sobre su región dorsal y solo si el animal reincorpora rápidamente su postura original es utilizado para el experimento. El argumento para utilizar esta prueba de selección es que los sujetos lentos en esta reacción suelen mostrar problemas locomotores o morir a los pocos días.

Protocolo de entrenamiento espaciado

Como ya fue explicado en la introducción, el entrenamiento espaciado induce la formación de memoria contexto-señal (MCS). Este tipo de memoria se estudió en esta tesis tanto en experimentos bioquímicos (Capítulo 2).

El entrenamiento espaciado consistió en 15 ensayos de 9 segundos de duración presentados en intervalos de 3 minutos (171 segundos entre ensayos). El protocolo completo incluye colocar al animal en el actómetro, dejarlo 5 minutos para adaptación al actómetro y luego comienza la sesión de estimulación de 45 minutos. Los animales contexto tienen un total de 50 minutos de estadía en el actómetro sin ser estimulados. En todos los experimentos en los que hay más de un grupo experimental o tratamiento, la sala experimental fue dividida y todos los tratamientos realizados simultáneamente. Una vez finalizado el entrenamiento, los animales eran utilizados de acuerdo a lo indicado en cada caso particular o alojados en recipientes individuales con un fondo de agua salobre de 0.5 cm de profundidad e iluminación tenue hasta el momento de ser utilizados o evaluados.

La evaluación consiste en volver a colocar a los animales en los actómetros, dejarlos nuevamente 5 minutos para adaptación y luego comienza la estimulación consistente en seis ensayos, presentados en intervalos de 3 minutos.

Protocolo de entrenamiento masivo

El protocolo de entrenamiento masivo, se utiliza para inducir la formación de memoria señal (MS). Este protocolo de entrenamiento está conformado por unidades de ensayos de 9 segundos, similar al protocolo espaciado y tiene la misma duración total, pero cambia el número de ensayos y el intervalo entre los mismos. El intervalo entre ensayo se redujo a 0 segundos y el número de ensayos se llevó a 300. De acuerdo al diseño de ensayo explicado anteriormente, de dos ciclos de 2,5 segundos y dos intervalos de 2 segundos por ensayo, el entrenamiento masivo podría también ser entendido como 600 ensayos de un único ciclo con intervalos de 2 segundos. Remarcar la existencia de los pequeños intervalos de dos segundos resulta importante, ya que si esos intervalos se eliminan convirtiendo al entrenamiento en el movimiento ininterrumpido de la figura, condición denominada entrenamiento continuo,

entonces solo existe una reducción de la respuesta de escape de corto término sin la formación de una memoria intermedia o de largo término, MCS o MS.

El protocolo completo incluye los 5 minutos de adaptación al actómetro y los 45 minutos de entrenamiento con la implementación de grupos entrenados y grupos contexto. Luego del entrenamiento existe un intervalo entre sesiones de 24 horas y una sesión de evaluación de 6 ensayos presentados sin intervalo.

Evaluación de la retención

La retención de la memoria de largo término es definida operacionalmente como la diferencia significativa entre los grupos contexto y entrenados en el nivel de la respuesta de escape durante la sesión de evaluación. Es decir, para ponderar la memoria a largo término se enfoca el análisis de los datos en los niveles de respuesta de la evaluación y no comparando la respuesta obtenida para en el entrenamiento con la obtenida en la sesión de evaluación. Rescorla (1988), ha argumentado en forma convincente a favor de utilizar este tipo de análisis en vez de la comparación entrenamiento-evaluación, puntualizando la necesidad de distinguir entre el tiempo de adquisición de la información y el tiempo de evaluación. Un hecho que justifica este tipo de comparación es que el comportamiento del animal puede diferir entre las sesiones por razones no relacionadas con el aprendizaje. Esta visión esta especialmente fundamentada en el modelo utilizado en esta tesis, considerando resultados previos que demuestran que la memoria contexto-señal (MCS), puede formarse independiente del nivel de la respuesta de escape durante el entrenamiento (Tomsic et al., 1991). Un hallazgo coincidente con otros modelos (Applewhite, 1968, Peeke, 1976).

Definiciones

Este conjunto de términos es de uso corriente a lo largo de esta tesis:

Habitación de corto término: Es el decremento de la respuesta de escape dentro de la sesión de entrenamiento.

Habituaación de largo término: Decremento de la respuesta de escape mantenido por al menos 24 hs.

Memoria Contexto-Señal: es una memoria asociativa y de largo duración adquirida por entrenamiento espaciado. El término hace referencia a que esta memoria se basa en una asociación entre el contexto (entorno experimental) y la señal (estímulo fásico de la figura en movimiento).

Memoria Señal: es la memoria no asociativa y de duración intermedia generada por un entrenamiento masivo.

Contexto: define al conjunto de claves ambientales (visuales, táctiles, etc..) presentes en el lugar de entrenamiento y de evaluación.

Extractos proteicos y determinación de la actividad de unión al ADN.

A los tiempos indicados después de la sesión de entrenamiento, los animales se anestesiaron por inversión en agua enfriada con hielo por dos minutos. Y se les disecó, el tejido nervioso de interés (pedúnculo óptico, ganglio supraesofágico, ganglio torácico, tracto protocerebral, lóbulo olfatorio o grupo neuronal 6). Veinte ganglios por muestra, se agruparon en 1 ml de solución salina para cangrejos con buffer (pH 7,6). Para operar los extractos nucleares, los ganglios se resuspendieron en 500 µl de buffer A (10 mM Hepes pH 7.9; 1,5 mM MgCl ; 10 mM KCl; 1 mM DTT; Pepstatina A, 1 mg/ml; 2 Leupeptina, 10 mg/ml; 0,5 mM PMSF; y Aprotinina, 10 mg/ml) . Luego, los ganglios centrifugaron por treinta segundos a 1000 g, e resuspendieron en 250 µl de buffer A y se homogeneizaron con 8 golpes de homogeneizador Dounce B, con embolo ajustado (tight). El homogenato se centrifugo 15 min. A 10000 g, el pellet se resuspendió en un volumen igual (30 µl) buffer B (20 mM Hepes, pH 7,9; 1,2 M KCl; 1,5 mM MgCl ; 0,4 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 50% glicerol; Pepstatin A, 1 mg/ml; Leupeptina, 10 mg/ml; 0,5 mM . PMSF; y Aprotinina, 10 mg/ml) y se incubó por 15 min. Finalmente, se realizo una centrifugación por 15 min. a 16000 g. El sobrenadante se guardo a 80 C° hasta su uso. Toda la extracción se realizo a 4 C°. Los extractos sinaptosomales se obtuvieron de acuerdo con el

protocolo de Booth y Clark (1978), usando una solución 650 mM de sacarosa isotónica con buffer, disuelta en un gradiente discontinuo de Ficoll 3% y 13 %, en el cual las muestras se fraccionaron por ultracentrifugación. La calidad de la preparación sinaptosomal se evaluó por microscopia electrónica (**Figura 5 del capítulo 2**). La actividad de unión al AND Kappa-B se ensayó utilizando la técnica de EMSA.

1,75 pmol de oligonucleótido doble cadena conteniendo el sitio de unión de NF-kappa B, (5'-AGTTG**AGGGGACTTTCCC**AGGC 3', en negrita el sitio de unión) (Promega) se utilizaron para marcar con, a 37 C°, en 10 µl de la siguiente reacción: 70 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 15 mCi de γATP-P³² (Nen/Dupont) y 10 U de T4 quinaza polinucleótido (Promega), durante 10 min. La unión ADN-proteína se llevo a cabo en volúmenes variables, según la concentración de proteínas, conteniendo: 20 mM Hepes, pH 7,9; 120 mM KCl; 0,4 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 25% glicerol, 0,3 µg Poli dIdC (Sigma), cada 10 µg de proteína de muestra; y entre 10 y 15 µg de extracto proteico. Las muestras se incubaron por 30 min. en hielo y luego de agregarles 1 ng de oligonucleótido marcado se las volvió a incubar por otros 30 min. en hielo.

Para los ensayos de competencia el oligonucleótido no marcado se agrego antes de la primera incubación. La mezcla de reacción se sembró en un gel 6% de acrilamida en buffer 0,25 X TBE, 22,3 mM Tris, 22,3 mM ácido bórico, 0,5 mM EDTA y se corrió por 2 hs. a 150 V. Los geles se secaron en una secadora por vacío y se expusieron durante la noche a película XAR-5 de Kodak. La densidad óptica relativa de las se analizó con el programa Imagen, (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Todas las mediciones se realizaron en el rango de exposición lineal de la película. El contenido proteico de los extractos se midió por triplicado con el método de Bradford, y la extracción se evaluó en calidad y cantidad, mediante un gel SDS, Page. Para determinar la unión al ADN tipo SP1, se utilizo un

oligonucleótido conteniendo su secuencia consenso (5'-ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3', en negrita el sitio de unión) (Promega).

Estimación de la actividad relativa de NF-kappa B.

Para determinar si ocurren aumentos de actividad de unión al ADN tipo Rel/NF-kappa B, en relación con la inducción de memoria de largo término, grupos entrenados en forma espaciada (intervalo entre ensayos: 171 seg.) se contrastaron con grupos entrenados en forma continua (intervalo entre ensayos: 0 seg.), como una tasa entre la densidad óptica relativa de los animales con entrenamiento espaciado y los con entrenamiento masivo.

UV crosslinking.

Para los ensayos de unión covalente mediante irradiación con ultravioleta (UV crosslinking), se utilizó la misma reacción y tiempos que para los EMSAs, excepto por la propia irradiación antes de sembrar en el gel. Las reacciones se irradiaron con una luz ultravioleta de mano para geles en la longitud de onda más corta en tubos de 0,5 ml en hielo.

Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación y posterior EMSA se realizaron con un extracto citoplasmático de ganglio supraesofágico. El cual se preincubó con agarosa unida a proteína A, para eliminar el pegado inespecífico a la agarosa-proteína A.

Western Blot

Para los western blot se usaron extractos nucleares crudos o extractos nucleares lavados de ganglio supraesofágico de *Chasmagnathus*, extractos nucleares hipocámpales de ratón y extractos nucleares de cerebro de rata.

Los extractos se corrieron en un gel SDS PAGE 10% acrilamida, 45 min. a 150 mV. La transferencia de proteínas a la membrana de PVDF (Amersham) se

realizo por 45 min. a 100 mV, a un máximo de 350 mA. La membrana se bloqueo en TBS – 0.1% Tween – 0.1% BSA por 1 hora. Se lavo la membrana con TTBS, y se incubo en anticuerpo p65 NLS de 1:800 durante 1 hora en agitación. Se lavo con TTBS y se incubó en con anticuerpo secundario de cabra contre ratón 1:10000 en TTBS por 45 min.

Lavar con TTBS y se revelo con luminol exponiendo una película radiográfica.

TTBS = Buffer TBS con 0.1% Tween 20

Inmunohistoquímica

Los animales se anestesiaron por 2 min. en agua enfriada con hielo, se les disecó el ganglio suprasofágico y se coloco en solución salina Heppes 20 mM. se los precipitó centrifugándolos suavemente, y se los lavo de esta manera 2 veces más antes de colocarlos en una solución 4% de paraformaldehido en buffer PBS (Buffer Fosfato salino), por 3 hs. con agitación. Todas las incubaciones se realizaron a 4 C°, tanto en los ganglios enteros como en las secciones. Para la tinción con Ioduro de propidio (IP), para marcar ácidos nucleicos, los ganglios o cortes, antes de ser montados, se incubaron durante 15 min. en una solución 5 mM de IP, en PBS, y se lavaron 3 veces durante 15 min., en PBS fresco.

Cerebro entero

Los ganglios se lavaron 3 veces con PBS, durante 30 min. para eliminar el paraformaldehido y se los coloco en PBS conteniendo 1% Triton X 100 (Sigma), y 2% p/v BSA (Sigma), durante una noche. Al día siguiente, los ganglios se transfirieron a PBS con 0,3% Tween 20 (Sigma) y anticuerpo monoclonal p65 NLS (Chemicon, MAB3026) en una dilución de 1:800, en la que permanecieron hasta el dia siguiente. Los ganglios se lavaron 3 veces por 30 min. con PBS, y se pasaron a 2% BSA en PBS con anticuerpo secundario de cabra contra ratón marcado con Alexa 488, en una concentración 1:500, por toda la noche. Los ganglios se volvieron a lavar 3 veces por 30 min. con PBS y se co-tiñeron con IP y se montaron o se montaron directamente.

Secciones

Los ganglios se lavaron 3 veces con PBS, durante 30 min. para eliminar el paraformaldehído, y se los incorporó a una solución 5% de Azarosa de bajo punto de fusión (Sigma), a 40 C°. Una vez solidificados los bloques se seccionaron en cortes de entre 100 y 150 µm. Luego de este punto el protocolo es igual al usado para los cerebros enteros, a partir de la incubación en PBS conteniendo 1% Triton X 100 (Sigma), y 2% p/v BSA (Sigma), durante una noche. Las co-tinciones de p65 y serotonina se incubaron con los dos tipos de anticueros simultáneamente (los 2 primarios juntos y los 2 secundarios juntos). El anticuerpo de conejo contra serotonina Immunostar 20080, se uso en una concentración de 1:1000 y como secundario se uso anticuerpo de cabra anti conejo marcado con rodamina, en una concentración 1:1000 .

Capitulo 3

Animales

Se utilizaron ratones CF-1 machos (FUNDACAL, Buenos Aires, Argentina) de entre 60 y 70 días de edad y con un peso de entre 25 y 30 g. Los ratones se colocaron en cajas individuales y permanecieron así durante todo el procedimiento experimental. Los animales se mantuvieron en un cuarto con temperatura controladas entre 21–23 C°, en un ciclo luz/oscuridad de 12 hs. (luz a partir de las 6:00 hs., con administración *ad libitum* de comida seca y agua. Los experimentos se llevaron a cabo intentando minimizar el sufrimiento de los animales e intentando reducir el número de animales.

Dispositivo y procedimientos comportamentales.

El comportamiento de evitación inhibitoria se estudió en un aprendizaje que requiere un solo ensayo, en una situación en la que los animales trasponen una entrada hacia un compartimiento oscuro (Boccia y Baratti, 2000), siguiendo su natural preferencia por ambientes pobremente iluminados. Este dispositivo

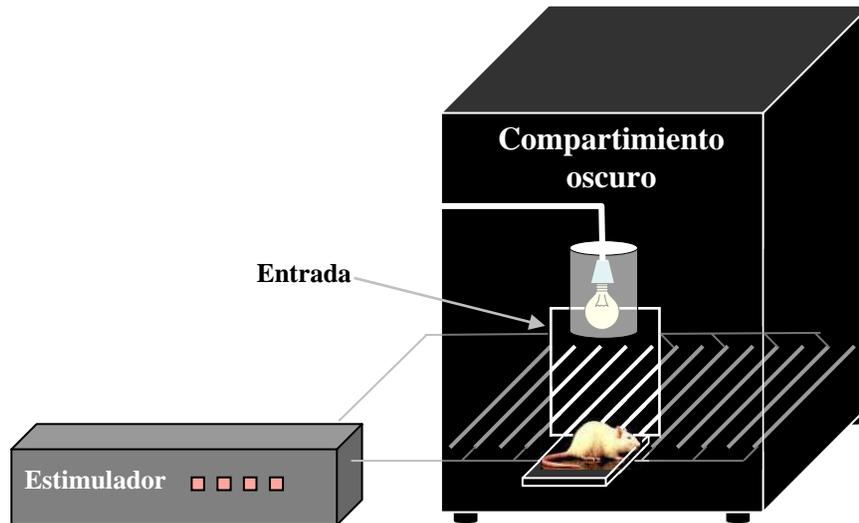


Figura 2: Dispositivo experimental para entrenamiento en evitación inhibitoria.

consta de un compartimiento oscuro (20x20x15 cm), con un suelo de grilla metálica y una pequeña plataforma (5x5) elevada e iluminada adosada al frente en el centro. Los ratones no tenían experiencia previa del dispositivo experimental.

Durante el entrenamiento, cada animal se colocó en la plataforma y se le aplicó un shock en las patas a través de la grilla inmediatamente después de que traspusieran la entrada al compartimiento oscuro. Las condiciones del shock en las patas en el entrenamiento fueron 0,8 mA, 50 Hz, durante 1 seg. (Boccia y Baratti, 2000), condiciones que rinden en la evaluación, valores de retención con una mediana de 150 seg. Para los experimentos farmacológicos, los ensayos de retención se realizaron a las 24 hs. de terminado el entrenamiento. Cada ratón se volvió a colocar en la plataforma y se registró el tiempo en que tardaron en entrar al compartimiento oscuro. El ensayo de evaluación se termina cuando el ratón entra en el compartimiento oscuro, registrándose este tiempo, o luego de 300 seg. después de haber colocado el ratón en la plataforma independientemente de si este, entro en el compartimiento oscuro o no. Registrándose en este caso un valor de 300 seg. En las sesiones de evaluación, se omitió el shock.

Las drogas (sulfasalazina e indometacina) y el kB decoy se administraron de forma intra cerebro ventricular antes o después del

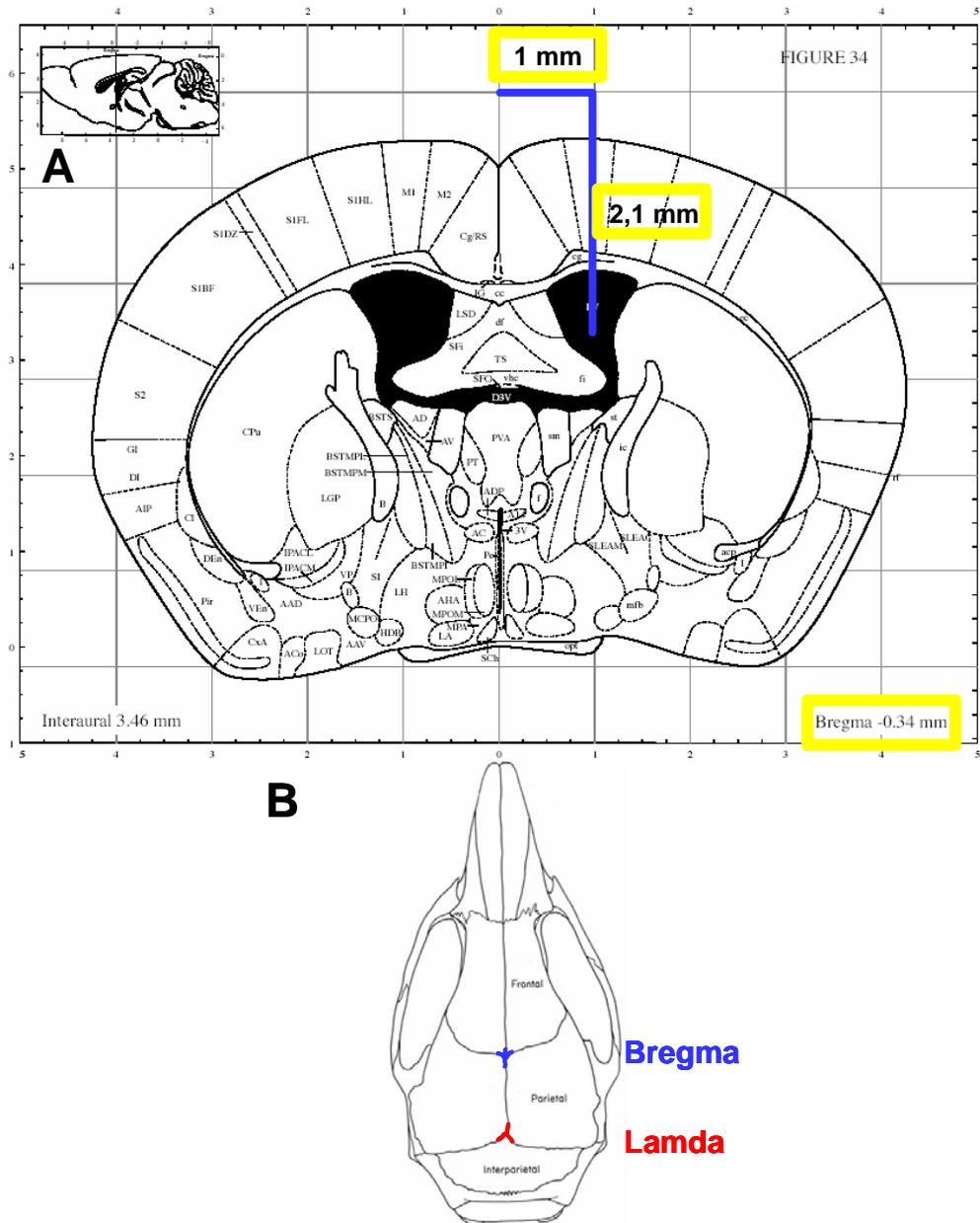


Figura 3: Inyecciones i.c.v. **A.** Localización de las inyecciones i.c.v. en el atlas con las correspondientes coordenadas. **B.** Situación de los dos puntos de referencia más importantes (Bregma y Lamda), para la orientación estereotáxica en el cerebro de ratón.

entrenamiento, a los tiempos indicados para cada experimento de la sección de resultados. En los experimentos diseñados para medir la actividad de NF-

kappa B en el hipocampo, los animales se sacrificaron y los hipocampos se disecaron a los tiempos indicados en el capítulo 3 de resultados.

Inyecciones i.c.v.

Los ratones se prepararon para las inyecciones i.c.v. 48 hs. antes, de manera de utilizar un mínimo de tiempo para las inyecciones, que se administraron bajo una anestesia suave de éter, en un instrumento estereotáxico.

Las operaciones previas también se realizaron bajo una anestesia suave de éter y consistieron en exponer el cráneo y realizar una perforación. El cráneo se recubrió con cera para huesos y los animales se devolvieron a sus cajas. Las inyecciones de droga o solución salina, se realizaron unilateralmente en forma aleatoria en el ventrículo lateral derecho o izquierdo, con volúmenes de entre 1,7 y 2 μ l. Las coordenadas de inyección fueron -0,34 mm respecto de bregma, 1,00 mm lateral del eje de simetría, y 2,10 mm de profundidad (Franklin y Paxinos, 1997), **Figura 3**.

Las inyecciones de cada animal tardaron 90 seg., a través de una aguja tamaño 30 de metal con punta mocha, en un a jeringa Hamilton de 10 μ l con un catéter PE-10 y desplazada a mano. La precisión de las inyecciones i.c.v., constatada por inyección de azul de metileno resulto ser mayor al 90 %.

Extracción de proteínas y determinación de la actividad de unión al ADN.

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se disecó el hipocampo por la técnica de Glowinski e Iversen (1966). Para obtener los extractos nucleares, el tejido homogenizó en 250 μ l de buffer A (10 mM Hepes PH 7,9; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 1 mM ditioneitol (DTT); pepstatina A, 1 μ g/ml; leupeptina, 10 μ g/ml; 0.5 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF); y aprotinina, 10 μ g/ml) con siete golpes en un homogeneizador Dounce B con embolo tight. El homogenato se centrifugó por 15 minutos a 10000 g, el pellet se resuspendió

entonces 30 μ l de buffer B (20 mM Hepes, pH 7,9; 1,2 M KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,4 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 50%; glicerol, pepstatina A, 1 μ g/ml; leupeptina, 10 μ g/ml; 0.5 mM PMSF; y aprotinina, 10 μ g/ml) y se lo incubó en hielo por 15 min. Una vez pasados los 15 min, se lo volvió a centrifugar pero esta vez a 16000 g por otro 15 minutos. El sobrenadante se guardó a -70°C hasta su uso. Cada paso de la extracción se realizó a 4°C.

La actividad nuclear de unión a las secuencia kb, se evaluó tanto los extractos nucleares como sinaptosomales usando retardos electroforéticos (EMSA). Como sonda se utilizó al oligonucleótido kB (Promega, Madison, WI) marcado con P³² de la siguiente manera: 1,75 pM de oligonucleótido doble cadena conteniendo el sitio de unión canónico de NF κ B (5-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC- 3, sitio de unión en negrita) se marcó a 37 grados por 10 min. en 10 μ l, conteniendo 70 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 15 μ Ci de (γ ³²P)ATP (NEN/Dupont) y 10 U de T4 quinaza polinucleótido (Promega).

El ensayo de unión proteína-ADN se llevó a cabo en 20 μ l de solución conteniendo 20 mM Hepes, pH 7.9; 120 mM KCl; 0,4 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 25% glicerol; 1 μ g cada 10 μ g de extracto proteico de poli dI-dC (Sigma) y entre 10-20 μ g de extracto proteico. Las muestras se incubaron 30 minutos con en hielo, luego de los cuales se agregó 1 ng de oligonucleótido kB marcado y se volvió incubar por 30 minutos en hielo. Para los ensayos de competición, el oligonucleótido no marcado se agregó antes de la primera incubación. La mezcla de reacción se corrió en un gel no desnaturizante, de 6% de poliacrilamida con buffer TBE 0,25, (22,3 mM Tris, 22,3 mM ácido bórico, 0,5 mM EDTA) por 2 hs a 150 V. El gel se secó por vacío y se expuso entre 12 y 48 horas a placas radiográficas XAR-5 (Kodak). La densidad óptica relativa (DOR) se estimó utilizando el software Imagen (Wayne Rasband, Nacional Institute of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Todas las mediciones fueron realizadas en el rango lineal de exposición de la placa, o sea tomando cuidado de que no se encuentre saturada. La concentración de proteínas en las muestras se midió por duplicado con el método de Bradford (¿???????) las mediciones se

constataron comparando patrones intensidades entre muestras en geles con dodecil sulfato de sodio (SDS) page desnaturalizantes.

Grupos experimentales

Para los experimentos farmacológicos primero y tercero, se entrenaron grupos de 10 ratones cada uno (grupos shock, S) y 15 min. después del entrenamiento recibieron una inyección i.c.v. de 2 µl de vehiculo o droga (3 dosis para sulfasalazina y 2 dosis para indometacina). En el segundo experimento, junto con 2 grupos de animales S, se incluyeron en el diseño otros 2 grupos de 10 animales cada uno, entrenados sin shock (grupos sin shock, NS) y recibieron una inyección de solución salina o droga. A los 4 grupos se les evaluó la retención 48 hs. después del entrenamiento. Par el tercer experimento farmacológico, se inyectaron 1,7 µl de oligonucleótido de ADN kB decoy o un kB decoy conteniendo una base C en vez de la G de la novena posición (5'-AGTTGAGGCGACTTTCCCAGGC-3', la base cambiada esta subrayada) (kB decoy mutado), dos horas antes del entrenamiento en los grupos S y NS. Para los experimentos diseñados para estimar la actividad de NF-kappa B en el hipocampo, los grupos S y NS se sacrificaron a distintos tiempos después del entrenamiento. En cada caso, se incluyo un grupo naïve (Nv) con el cual estimar la actividad basal.

Drogas

Una solución de acido 2-(4-hidroxi((4-((2-pyridinilamino)sulphonil)phenil)azo) benzoico (sulfasalazina) (Sigma, USA) se disolvio en solución salina con buffer (Hoeger y Florey, 1989) con 10 mM HEPES pH 7,6, mas 20 % DMSO, con un pH final de 7.,6. El acido 1-(4-Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indole-3-acetic (indomethacina) en una concentración 1 mM o menos en salina con 10 mM HEPES pH 7,6 mas 20 % DMSO. El κB Decoy

y el κ B Decoy mutado se disolvieron en solución salina en una concentración de 36,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Análisis de datos

Los datos comportamentales están expresados como las medianas de las latencias en traspasar la entrada del compartimiento oscuro, durante la sesión de evaluación, y la significancia se evaluó con el test no paramétrico de análisis de varianza Kruskal-Wallis, y las diferencias entre grupos se estimaron por test U individuales de Mann-Whitney (dos colas; Siegel, 1956) usando valores de $P < 0,05$ como significativos. En los experimentos para determinar la actividad de NF kappa B en el hipocampo, los valores de DOR de cada grupo se relativizaron a la media de los valores de DOR del grupo naive correspondiente. Comparaciones planeadas *a priori* se usaron para estimar diferencias entre el Nv y otros grupos. Dada la ausencia de homogeneidad y normalidad de la varianza, los datos se transformaron con $(\log + 1)$ antes del análisis estadístico.

Capitulo 4

Animales.

Para todos los experimentos se utilizaron ratones machos C57/BL6 de uno a dos meses de edad provenientes de los laboratorios Jackson (USA). Los animales anestesiaron con 1,2 gr/kg de uretano, intraperitoneal. Los procedimientos de registro estereotáctico in vivo, fueron aprobados por el comité de cuidado y uso animal de la universidad Northwestern, Illinois, USA.

Electrofisiología

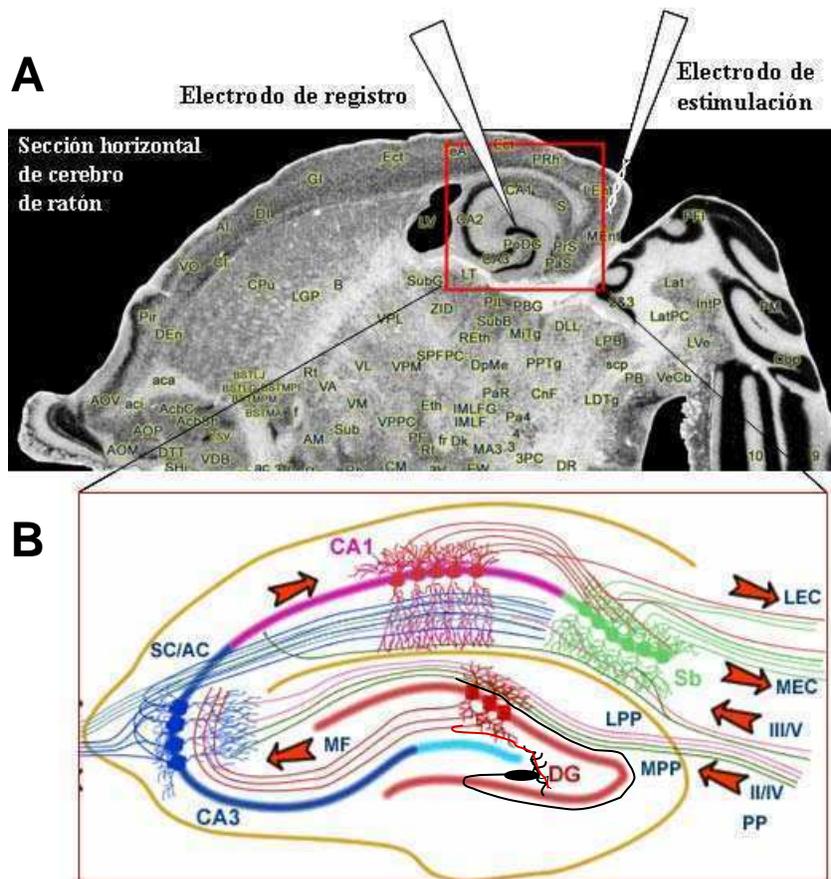


Figura 4: A. Posición de los electrodos de estimulación y registro en el hipocampo. B. Principales áreas del hipocampo y sus conexiones. DG (giro dentado), capa de células piramidales CA3, capa de células piramidales CA1, Sb (subículo)

Los animales se colocaron en el aparato estereotáctico para realizar una potenciación de largo término en la vía perforante del hipocampo de ratón tal como esta descrito en Namgung et al, 1995. Como electrodo de estimulación se utilizó un electrodo metálico bipolar recubierto del teflón, (diámetro del cable recubierto 114,3 μm) en la vía perforante del hipocampo (coordenadas: 0,5 mm posterior a λ , 3,2 Mm. lateral y entre 1,35 y 1,45 Mm. de la superficie del cerebro); la posición vertical del electrodo se ajusto para obtener respuestas negativas evocadas máximas (población de EPSPs) en la capa molecular del giro dentado. Como electrodo de registro se usó un capilar de vidrio (0,5 mm) con filamento, insertado en la capa molecular del giro dentado, en las coordenadas: 2 mm posterior a bregma, 1,5 mm lateral, 1,7 mm de la superficie

del cerebro. Para establecer la intensidad del estímulo a utilizar, se generó una curva de entrada salida (I/O) para cada animal, estimulando cada 30 segundos 10 veces entre 20 y 120 μA , en la vía perforante. La magnitud de las respuestas se midió como dependiente inicial de la onda positiva de los EPSPs (tomando los valores en el rango lineal entre 0,1 y 1,2 ms después del comienzo). Se utilizó como corriente de estimulación, la intensidad que producía una respuesta del 70% del máximo obtenido en la curva I/O. Para establecer una

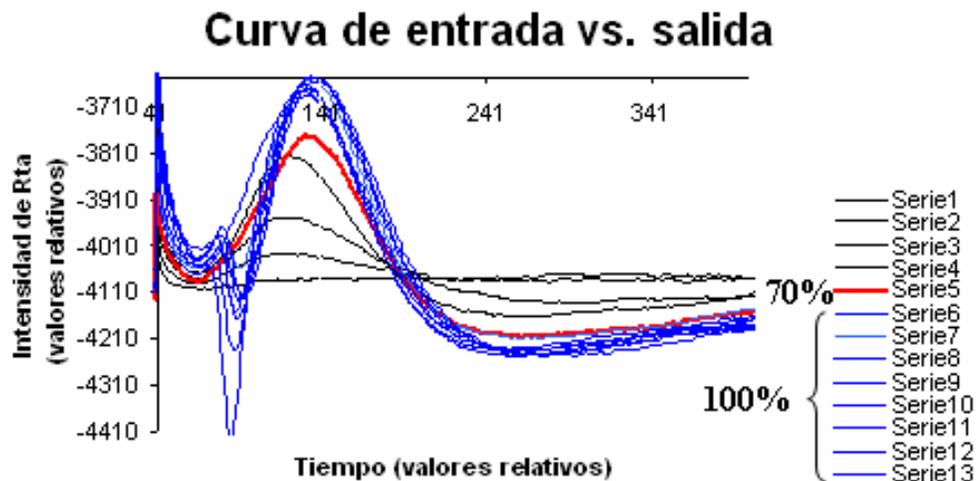


Figura 5: Curva de estimulación vs. respuesta. Para establecer la estimulación a usar en los experimentos se probaron estimulaciones de intensidad creciente hasta obtener la intensidad que produce una respuesta del 70% del máximo.

línea de base estable, los animales se estimularon a baja frecuencia (un pulso/30s) por 2hs. La tetanización consistió de cuatro trenes de estímulos aplicados con un intervalo de 10 segundos; cada tren contenía 15 pulsos a 200 Hz. Para constatar la potenciación, los animales se estimularon por 15 minutos adicionales después de la tetanización a baja frecuencia.

Extracción de proteínas y determinación de la actividad de unión al ADN.

Inmediatamente después del tratamiento, los animales anestesiados se mataron por dislocación cervical y se disecó el hipocampo entero. Las

extracciones de proteína y las determinaciones de la actividad de unión al ADN, se realizaron en forma idéntica a la descrita en los materiales y métodos del capítulo 3.

Inmunohistoquímica

Los animales anestesiados se perfundieron transcárdicamente con buffer fosfato salina (PBS) seguido de 4% paraformaldehído (PFA) en PBS 1X (PH 7,2), a 4°C. El cerebro se removió el cráneo y se incubó durante la noche en PBS con 4% PFA, y luego 24 horas en PBS con un 30% de sacarosa. La zona de interés del cerebro se cortó en secciones de 25 µm de grosor. La detección de la proteína p65 activada se realizó por inmunohistoquímica con el anticuerpo MAB3026 (Chemicon), a una concentración de 1:100 con DAB-nickel (40-200 mg/dl) para aumentar la reacción. El protocolo utilizado es una variación de (Cantalops and Routtenberg, 1996). Brevemente: día 1, las secciones de 25 µm se colocaron en buffer tris salino 0,1 M. Se incubó a las secciones en inhibidor de la peroxidasa endógena. Se lavó con TBS 6 veces 5 min. Luego 4 veces con TBS 0,25% triton. Se bloqueó por 30 min. en 2% Suero normal de cabra en TBS. Incubación en p65 NLS 1:800 toda la noche. Día 2, lavado en TBS 0,25% Triton. Una hora de incubación en el anticuerpo secundario biotinilado 1:1000. Lavado. Incubación en TBS con reactivo ABC una hora a temperatura ambiente. Lavado y revelado en diaminobencidina (DAB).

Referencias

- Abel, T., Martin, K. C., Bartsch, D., y Kandel, E. R. (1998) Memory suppressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory. *Science*, 279 (5349): 338- 41.
- Albensi BC, Mattson M P. 2000. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse* 35:151–159.
- Alberini C., M. Ghirardi, R. Metz, E. R. Kandel. C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in *Aplysia*. 1994 .*Cell* 76, 1099–1114.
- Alcamo, E., Mizgerd, J. P., Horwitz, B. H., Bronson, R., Beg, A. A., Scott, M., Doerschuk, C. M., Hynes, R. O. y Baltimore, D. (2001). Targeted mutation of TNF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF- κ B in leukocyte recruitment. *J. Immunol.*, 167 (3): 1592–600.
- Amaral G A y Witter M P. The rat nervous system, second edition. The hippocampal formation. Pag. 443-493. Academia press, 1995.
- Anest V, Hanson JL, Cogswell PC, Steinbrecher KA, Strahl BD, Baldwin AS. A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression. *Nature*. 2003 Jun 5;423(6940):659-63.
- Anokhin KV, Mileusnic R, Shamakina IY, Rose SPR. 1991. Effects of early experience on c-fos gene expression in the chick forebrain. *Brain Res* 544:101–107.
- Anokhin, K.V. and Rose, S.P.R., Learning-induced increase of immediate early gene messenger RNA in the chick forebrain, *Eur. J. Neurosci.*, 3 (1991) 162–167.
- Applewhite PB. Temperature and habituation in a protozoan. *Nature*. 1968 Jul 6;219(149):91-2.
- Atkinson, R. L., y Shriffrin, R. M. (1968). Human memory: A proposed system and its control processes. In K. W. Spence & J. T. Spence, (Eds.), *The psychology of learning and motivation: Advances in research and theory*, Vol. 2. New York: Academic.
- Bailey, C. H., Bartsch, D. y Kandel, E. R. (1996). Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 93 (24): 13445-52 .

- Balschun, D., Wolfer, D. P., Gass, P., Mantamadiotis, T., Welzl, H., Schutz, G., Frey, J. U. y Lipp, H. P. (2003). Does cAMP response element-binding protein have a pivotal role in hippocampal synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory? *J. Neurosci.*, 23 (15): 6304-14 .
- Barger SW, Horster D, Furukawa K, Goodman Y, Kriegstein J, Mattson MP., et al. 1995. Tumor necrosis factors α and β protect neurons against amyloid β -peptide toxicity: evidence for involvement of a β -B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca^{2+} accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:9328–9332.
- Barger, S.W., Moerman, A. M. y Mao, X. (2005). Molecular mechanisms of cytokine-induced neuroprotection: NF-kappaB and neuroplasticity. *Curr. Pharm. Des.*, 11 (8): 985-98 .
- Basu A. C. y Kravitz E. A. Morphology and monoaminergic modulation of Crustacean Hyperglycemic Hormone-like immunoreactive neurons in the lobster nervous system. *Journal of Neurocytology* 32, 253–263 (2003).
- Beg AA and Baltimore D (1996) An essential role for NF-kappa B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science (Washington DC)* 274:782–784.
- Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S. y Baltimore, D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature*, 376: 167–70 .
- Beramendi A, Peron S, Megighian A, Reggiani C, Cantera R. The inhibitor kappaB-ortholog Cactus is necessary for normal neuromuscular function in *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience*. 2005;134(2):397-406.
- Beron de Astrada M, Maldonado H. Two related forms of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus* are differentially affected by scopolamine. *Pharmacol Biochem Behav.* 1999 May;63(1):109-18.
- Beron de Astrada M, Sztarker J, Tomsic D. Visual interneurons of the crab *Chasmagnathus* studied by intracellular recordings in vivo. *J Comp Physiol [A]*. 2001 Feb;187(1):37-44.
- Berón M. P., Marco Favero y Tomás A. Luppi. Selectividad de presa y eficiencia de alimentación en Gaviotas de Olrog (*Larus atlanticus*) alimentándose en la laguna costera Mar Chiquita IX reunión de ornitología
- Bhakar A L, Tannis L-L, Zeindler C, Russo M P, Jobin C, Park D S, MacPherson S, Barker P A. Constitutive Nuclear Factor- κ B Activity Is required for Central Neuron Survival. *The Journal of Neuroscience*, October 1, 2002, 22(19):8466–8475
- Bliss, T. V. y Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path.. *J. Physiol. (London)* 232, 331-356.

- Boccia, M.M. y Baratti, C.M. (2000) Involvement of central cholinergic mechanisms in the effects of oxytocin and an oxytocin receptor antagonist on retention performance in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 74, 217–228.
- Boccia, M.M., Acosta, G.B., Blake, M.G. y Baratti, C.M. (2004) Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance response in mice: effects of i.c.v. injections of hemicholinium-3. *Neuroscience*, 124, 735–741.
- Bolatto C, Chifflet S, Megighian A, Cantera R. Synaptic activity modifies the levels of Dorsal and Cactus at the neuromuscular junction of *Drosophila*. *J Neurobiol.* 2003 Feb 15;54(3):525-36.
- Booth R.F.G., J.B. Clark, A rapid method for the preparation of relatively pure metabolically competent synaptosomes from brain. *Biochem. J.* 176 1978 365–370.
- Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ. 1994. Deficient long term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element binding protein. *Cell* 79:59–68.
- Bourtchuladze R, Gossweiler S, Dubnau J, Tully . CREB and the discovery of cognitive enhancers. *J Mol Neurosci.* 2002 Aug-Oct;19(1-2):171-7.
- Brink, J. J., Davis, R. E. y Agranoff, B. W. (1966). Effects of puromycin, acetoxycycloheximide and actinomycin D on protein synthesis in goldfish brain. *J. Neurochem.*, 13 (10): 889-96 .
- Brown K, Park S, Kanno T, Franzoso G and Siebenlist U (1993) Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, Ikb-a. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2532–2536.
- Cahill, L. and McGaugh, J.L. 1990. Amygdaloid complex lesions differentially affect retention of tasks using appetitive and aversive reinforcement. *Behav. Neurosci.* 104: 532–543.
- Carew, T. J., Pinsky, H. M., y Kandel, E. R. (1972). LTH of a defensive withdrawal response reflex in *Aplysia*. *Science*, 175, 451–454.
- Cavallaro, S., Schreurs, B. G., Zhao, W., D'Agata, V. y Alkon DL. (2001). Gene expression profiles during long-term memory consolidation. *Eur. J. Neurosci.*, 13 (9): 1809-15 .
- Cavallaro, S., D'Agata, V., Manickam, P., Dufour, F. y Alkon, D.L. (2002) Memory-specific temporal profiles of gene expression in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 16279–16284.
- Choi, J., Krushel, L. A. y Crossin, K. L. (2001). NF-kappaB activation by N-CAM and cytokines in astrocytes is regulated by multiple protein kinases and redox modulation. *Glia*, 33 (1): 45-56 .

- Chytil M and Gregory L Verdinef. The Rel family of eukaryotic transcription factors. *Current Opinion in Structural Biology* 1996, 6:91-100.
- Cui, Z., Wang, H., Tan, Y., Zaia, K. A., Zhang, S. y Tsien, J. Z. (2004). Inducible and reversible NR1 knockout reveals crucial role of the NMDA receptor in preserving remote memories in the brain. *Neuron*, 41: 781–93 .
- Davis, H. P. y Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychol. Bull.*, 96 (3): 518-59 .
- Debiec, J., LeDoux, J.E., y Nader, K. (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron*, 36, 527–38 .
- Deisseroth, K., Heist, E. K. y Tsien, R. W. (1998). Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature*, 392 (6672): 198-202 .
- Deisseroth, K., Mermelstein, P. G., Xia, H. y Tsien, R. W. (2003). Signaling from synapse to nucleus: the logic behind the mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 13 (3): 354-65 .
- Delorenzi, A., Pedreira, E. M., Romano, A., García, S., Pirola, C., Nahmod, V. y Maldonado, H. (1996). Angiotensin II enhances long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Research Bulletin*, 47 (4): 211-9.
- Delorenzi, A., Dimant, B., Frenkel, L., Nahmod, V. E., Nassel, D. R. y Maldonado, H .(2000). High environmental salinity induces memory enhancement and increases levels of brain angiotensin-like peptides in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *J Exp. Biol.*, 203 (Pt 22): 3369-79.
- Diccionario de la lengua española, Vigésima segunda edición, Real Academia Española, 2003, Espasa Calpe, S.A., 2003.
- Dudai, Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence *Curr. Opin. Neurobiol.*, 12 (2): 211-6.
- Dudai Y (2002) *Memory from A to Z. Keywords, concepts and beyond.* Oxford University Press, Oxford.[.
- Ebbinghaus, H. (1885). *Über das gedächtnis: Intersuchungen zur experimentellen psychologie.* Translated by H. A. Ruger and C. E. Bussenius, 1913 and reissued by Dover Publications, 1964.
- Fanselow, M.S. y Gale, G.D. (2003) The amygdala, fear, and memory. *Ann. NY Acad. Sci.*, 985, 125–134.
- Feld, M., Dimant, B., Delorenzi, A., Coso, O. y Romano, A. (2005). Extra-nuclear activation of ERK/MAPK is required for long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Behavioural Brain Research*, 150 (2): 251-61.

- Flexner, L. B. (1966). Loss of memory in mice as related to regional inhibition of cerebral protein synthesis. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 24 (1): 3-19.
- Franco Carlotti, Steven K. Dower, and Eva E. Qwarnstrom. Dynamic Shuttling of Nuclear Factor κ B between the Nucleus and Cytoplasm as a Consequence of Inhibitor Dissociation. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 275, No. 52, Issue of December 29, pp. 41028–41034, 2000
- Franklin, K.B.J. y Paxinos, G. (1997) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, London.
- Frenkel, L., Freudenthal, R., Romano, A., Nahmod, V. E., Maldonado, H. and Delorenzi, A. (2002). Angiotensin II and transcription factor Rel/NF- κ B link environmental water shortage with memory improvement. *Neuroscience*, 115 (4): 1079-87.
- Frenkel, L., Maldonado, H. y Delorenzi, A. (2005). Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water deprivation via brain angiotensin II. *Eur. J. Neurosci.*, 22 (7): 1757-66.
- Freudenthal, R., Locatelli, F., Hermitte, G., Maldonado, H., Lafourcade, C., Delorenzi, A. y Romano, A., Kappa-B like DNA-binding activity is enhanced after a spaced training that induces long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience Letters* 242 (1998) 143-146.
- Freudenthal R, Romano A. 2000. Participation of NF- κ B transcription factors in long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res* 855:274 –281.
- Freudenthal R, Arturo Romano y Aryeh Routtenberg. Transcription Factor NF- κ B Activation After In Vivo Perforant Path LTP in Mouse Hippocampus. *Hippocampus*. 2004;14(6):677-83.
- Freudenthal, R., Boccia, M. M., Acosta, G. B., Blake, M. G., Merlo, E., Baratti, C. M. y Romano, A. (2005). NF- κ B transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice. *Eur. J. Neurosci.*, 21 (10): 2845-52.
- Frey, U. y Morris, R.G. (1998). Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends in Neurosci.*, 21 (5): 181-8.
- Gerlai, R. (1996). Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *Trends Neurosci.*, 19 (5): 177-81.
- Ghosh, S. y Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell*, 109 Suppl: S81-9.
- Goelet, P., Castellucci, V. F., Schacher, S. y Kandel, E. R. (1986). The long and the short of long-term memory -a molecular framework. *Nature*, 322, 419-22 .

- Gross, I., Georgel, P., Kappler, C., Reichhart, J.M. and Hoffman, J.A., *Drosophila* immunity: a comparative analysis of the Rel proteins Dorsal and Dif in the induction of the genes encoding diptericin and cercopin, *Nucleic Acids Res.*, 24 (1996) 1238–1245.
- Guerrini, L., Blasi, F. y Denis-Donini, S. (1995). Synaptic activation of NF-kappa B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 92 (20): 9077-81.
- Gutierrez, H., Hale, V. A., Dolcet, X. y Davies, A. (2005). NF- κ B signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. *Development*, 132, 1713–26 .
- Halperin J, Ansaldo M, Pellerano GN, Luquet CM. Bimodal breathing in the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* Dana 1851--physiological and morphological studies. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2000 Jul; 126(3):341-9.
- Hermitte, G., Pedreira, M. E., Tomsic, D. y Maldonado, H. (1999) Context shift and protein synthesis inhibition disrupt long-term habituation after spaced, but not massed, training in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 71 (1): 34-49.
- Hohmann, H. P., Remy, R., Aigner, L., Brockhaust, M. y van Loon, A. P. (1992). Protein kinases negatively affect nuclear factor-kappa B activation by tumor necrosis factor-alpha at two different stages in promyelocytic HL60 cells. *J. Biol. Chem.*, 267 2065-72.
- Hoult, J. R. (1986). Pharmacological and biochemical actions of sulphasalazine. *Drugs*, 32, 18-26.
- Huguet, C., Crepieux, P. y Laudet, V. (1997). Rel/NF-kappa B transcription factors and I kappa B inhibitors: evolution from a unique common ancestor. *Oncogene*, 15 (24): 2965-74 .
- Hunot, S., et al. 1997. Nuclear translocation of NF-kappa B is increased in dopaminergic neurons of patients with Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:7531–7536.
- Izquierdo, I., Quillfeldt, J.A., Zanatta, M.S., Quevedo, J., Schaeffer, E., Schmitz, P.K. y Medina, J.H. (1997) Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur. J. Neurosci.*, 9, 786–793.
- Jang MK, Goo YH, Sohn YC, Kim YS, Lee SK, Kang H, Cheong J, Lee JW. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV stimulates nuclear factor-kappa B transactivation via phosphorylation of the p65 subunit. *J Biol Chem*. 2001 Jun 8;276(23):20005-10.

- Jost, A. 1897. Die Assoziationsfestigkeit in ihrer Abhängigkeit von der Verteilung der Wiederholungen. *Zeit. Psychologie* 14: 436–472.
- Kaang, B. K., Kandel, E. R. y Grant, S. G. (1993). Activation of cAMP-responsive genes by stimuli that produce long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron*, 10 (3): 427-35 .
- Kaczer L, comunicación personal, resultados no publicados, 2006.
- Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B. y Bauerle, P. A. (1993) Brain synapses contain inducible forms of the transcription factor NF-kappa B. *Mech. Dev.*, 43, 135-47.
- Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Lannes-Vieira, J., Kreutzberg, G. W., Wekerle, H., Baeuerle, P. A. y Gehrman, J. (1994) *J. Neuroimmunol.* 55, 99–106.
- Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Henkel T, Stockinger H, Baeuerle PA. 1995. Selective recognition of the activated form of transcription factor NF-kappa B by a monoclonal antibody. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376:9 –16.
- Kandel, E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 29, 1030–8.
- Kant I., *Crítica de la razón pura* (1781).
- Kassed, C. A., Willing, A. E., Garbuzova-Davis, S., Sanberg, P. R. y Pennypacker, K. R. (2002). Lack of NF-kappaB p50 exacerbates degeneration of hippocampal neurons after chemical exposure and impairs learning. *Exp. Neurol.*, 176 (2): 277-88 .
- Kassed, C. A. y Herkenham, M. (2004). NF-kappaB p50-deficient mice show reduced anxiety-like behaviors in tests of exploratory drive and anxiety. *Behav. Brain Res.*, 154 (2): 577-84 .
- Kinney, W. y Routtenberg, A. (1993). Brief exposure to a novel environment enhances binding of hippocampal transcription factors to their DNA recognition elements. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 20 (1-2): 147-52 .
- Kleschevnikov A y Routtenberg A. 2003. Long-term potentiation recruits a trisynaptic network within the mouse dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 17:2690 – 2702.
- Kopf y Baratti. 1996. Memory Modulation by Post-training Glucose or Insulin Remains Evident at Long Retention Intervals. *Neurobiology of Learning and Memory* 65, 189–191.
- Korner, M., Rattner, A., Mauxion, F., Sen, R. y Citri, Y. (1989). A brain-specific transcription activator. *Neuron*, 3 (5): 563-72.

- Krushel, L. A., Cunningham, B. A., Edelman, G. M. y Crossin, K. L. (1999). NFkappaB activity is induced by neural cell adhesion molecule binding to neurons and astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 274 (4): 2432-9.
- Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gelinas C. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene*. 2003 Dec 8;22(56):8961-82.
- Lee S H, Wang X, DeJong J. 2000. Functional interactions between an atypical NF-kappaB site from the rat CYP21 promoter and the transcriptional repressor RBP-J \square /CBF1. *Nucleic Acids Res* 28:2091–2098.
- Lee, J. L. C., Everitt, B. J. y Thomas, K. L. (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*, 304, 839-43.
- Levenson, J. M., Choi, S., Lee, S. Y., Cao, Y. A., Ahn, H. J., Worley, K. C., Pizzi, M., Liou, H. C. y Sweatt, J. D. (2004). A bioinformatics analysis of memory consolidation reveals involvement of the transcription factor c-rel. *J. Neurosci.*, 24 (16): 3933-43.
- Locatelli, F., Maldonado, H. y Romano, A. (2002). Two critical periods for cAMPdependent protein kinase activity during long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiology of Learning and Memory*, 77 (2): 234-49.
- Locatelli, F. y Romano, A. (2005). Differential role of cAMP-dependent protein kinase isoforms during long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiology of Learning and Memory*, 83: 232-42.
- Lovinger DM, Colley PA, Akers RF, Nelson RB, Routtenberg A. 1986. Direct relation of long-term synaptic potentiation to phosphorylation of membrane protein F1, a substrate for membrane protein kinase C. *Brain Res* 399:205–211.
- Lozada, M., Romano, A. y Maldonado, H. (1990). Long-term habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Physiology and Behavior*, 47: 35-41.
- Mackey, S. L., Kandel, E. R., and Hawkins, R. D. Identified serotonergic neurons LCB1 and RCB1 in the cerebral ganglia of *Aplysia* produce presynaptic facilitation of siphon sensory neurons. *J Neurosci*. 1989 Dec; 9(12):4227-35.
- Mactutus, C. F., Riccio, D. C. y Ferek, J. M. (1979). Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. *Science*, 204, 1319–20.
- Maldonado H, Romano A, Tomsic D. 1997. Long-term habituation (LTH) in the crab *Chasmagnathus*: a model for behavioral and mechanistic studies of memory. *Braz J Med Biol Res* 30:813– 826.

- Marini, A. M., Jiang, X., Wu, X., Tian, F., Zhu, D., Okagaki, P. y Lipsky, R. H. (2004). Role of brain-derived neurotrophic factor and NF-kappaB in neuronal plasticity and survival: From genes to phenotype. *Restor. Neurol. Neurosci.*, 22 (2): 121-30 .
- Martinez, I., Quirarte, G.L., Diaz-Cintra, S., Quiroz, C., y Prado-Alcala R A. Effects of lesions of hippocampal fields CA1 and CA3 on acquisition of inhibitory avoidance. *Neuropsychobiology*. 2002;46(2):97-103.
- Mattson MP and Simonetta Camandola. NF-kappa B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *The Journal of Clinical Investigation* | February 2001 | Volume 107 | Number 3.
- McGaugh, J.L. (1973) Drug facilitation of learning and memory. *Annu. Rev. Pharmacol.*, 13, 229–241.
- McGaugh, J.L. (1989) Involvement of hormonal and neuromodulator systems in the regulation of memory storage. *Annu. Rev. Neurosci.*, 12, 255–287.
- Meberg, P. J., Kinney, W. R., Valcourt, E. G. y Routtenberg, A. (1996). Gene expression of the transcription factor NF-B in hippocampus: regulation by synaptic activity. *Mol. Brain Res.*, 38, 179-190.
- Meffert, M. K., Chang, J. M., Wiltgen, B. J., Fanselow, M. S. y Baltimore, D. (2003) NF-kappa B function in synaptic signaling and behavior. *Nature Neurosci.*, 6, 1072-8 .
- Mellstrom, B., Torres, B., Link, W. A. y Naranjo, J. R. (2004). The BDNF gene: exemplifying complexity in Ca²⁺-dependent gene expression. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 16 (1-2): 43-9.
- Menzel, R. (1996). Spaced rather than massed conditioning leads to protein synthesis dependent long-term memory in honeybees. *Abstracts of the 26th Annual Meeting of the Society of Neuroscience*, 22,1405.
- Menzel R, Gisela Manz, Rebecca Menzel, and Uwe Greggers. Massed and Spaced Learning in Honeybees The Role of CS, US, the Inter trial Interval, and the Test Interval. *Learning y Memory* . 2001. Vol: 8, pag.198–208.
- Merlo, E., Freudenthal, R. y Romano, A. (2002). The IkappaB kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience*, 112 (1): 161-72.
- Merlo, E., Freudenthal, R., Maldonado, H. y Romano, A. (2005). Activation of the transcription factor NF-kappa B by retrieval is required for long-term memory reconsolidation. *Learning and Memory*, 12 (1): 23-9.
- Misanin, J. R., Miller, R. R. y Lewis, D.J. (1968). Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock following reactivation of a consolidated memory trace. *Science*, 16, 554–5.

- Molnar G, N. O'Leary, A. B. Pardee y D. W. Bradley. Quantification of DNA-protein interaction by UV crosslinking. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23, 16, 3318-3326.
- Morgan, J. M. y Routtenberg, A. (1977). Angiotensin injected into the neostriatum after learning disrupts retention performance. *Science*, 196 (4285): 87-9.
- Muller D, Joly M, Lynch G. Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science*. 1988 Dec 23;242(4886):1694-7.
- Myers, K.M. y Davis, M. (2002). Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron*, 36, 567-84.
- Nader, K., Schafe, G. E. y LeDoux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406, 722-6.
- Nalbach HO 1990. Visually elicited escape in crabs. En: *Frontiers in crustacean neurobiology*. Bassel: Birkhauser Verlag pp165-171.
- Namgung U, Matsuyama S, Routtenberg A. 1997. Long-term potentiation activates the GAP-43 promoter: selective participation of hippocampal mossy cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11675-11680.
- Nguyen P and Eric R. Kandel. A Macromolecular Synthesis-Dependent Late Phase of Long-Term Potentiation Requiring cAMP in the Medial Perforant Pathway of Rat Hippocampal Slices. *The Journal of Neuroscience*, May 15, 1996, 16(10):3189-3198.
- Nishimoto RT, Herrnkind WF. 1978. Directional orientacion in blue crabs, *Callinectes sapidus* Rathbum: Escape responses and influence of wave direction. *J Exp Mar Biol Ecol* 33:93-112.
- O'Neill, L. A. J. y Kaltschmidt, C. (1997). NF-kappa-B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *TINS*, 20, 252-8.
- Pedeta S, comunicaci3n personal, resultados no publicados 2006.
- Pedreira M A, Arturo Romano, Daniel Tomsic, Mariana Lozada y H3ctor Maldonado. Massed and spaced training build up different components of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Animal Learning y Behavior*. 1998, vol. 26 issue: 1 34-45.
- Pedreira, M. E. y Maldonado, H. (2003). Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*, 38 (6): 863-9 .

- Pedreira, M. E., Dimant, B., Tomsic, D., Quesada-Allue, L. A. y Maldonado, H. (1995). Cycloheximide inhibits long-term habituation and context memory in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 52, 385-95.
- Pedreira, M. E., Perez-Cuesta, L. M. y Maldonado, H. (2002). Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *J. Neurosci.*, 22 (18): 8305-11.
- Pedreira, M.E., Dimant, B. y Maldonado, H. (1996). Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 54, 611–7.
- Pedreira, M.E., Dimant, B. and Maldonado, H., Inhibitors of protein and mRNA synthesis block context memory and long term habituation in the crab *Chasmagnathus*, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 54 (1996) 611–617.
- Peeke HVS, Veno A 1976. Response independent habituation of territorial aggression in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Zeitschrift fur tierpsychologie* 40:53-58.
- Pereyra, P., Gonzalez Portino, E. y Maldonado, H. (2000) Long-lasting and contextspecific freezing preference is acquired after spaced repeated presentations of a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem.*, 74 (2): 119-34 .
- Povelones Michael, Kathy Tran, Dimitris Thanos, and Richard T. Ambron. An NF-kappa B-Like Transcription Factor in Axoplasm is Rapidly Inactivated after Nerve Injury in *Aplysia*. *The Journal of Neuroscience*, July 1, 1997, 17(13):4915–4920.
- Quivy V, Van Lint C. Regulation at multiple levels of NF-kappaB-mediated transactivation by protein acetylation. *Biochem Pharmacol.* 2004 Sep 15;68(6):1221-9
- R.A. 2002. Effects of lesions of hippocampal fields CA1 and CA3 on acquisition of inhibitory avoidance. *Neuropsychobiology* 46: 97–103.
- Rattner et al. 1993
- Rescorla DA. 1988. Pavlovian conditioning: It is not what you think it is. *American Psychologist* 43:151-160.
- Roberts RB, Flexner LB. The biochemical basis of long-term memory. *Q Rev Biophys.* 1969 May;2(2):135-73.
- Roesler, R., Schroder, N., Vianna, M.R.M., Quevedo, J., Bromberg, E., Kapczinski, F., and Ferreira, M.B.C. 2003. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res.* 975: 207–213.

- Romano A, Annalucia Serafino b, Ewa Krasnowskab, Maria Teresa Ciotti b, Pietro Calissano b, Francesca Ruberti b, Cinzia Galli b. Neuronal fibrillogenesis: amyloid fibrils from primary neuronal cultures impair long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Behavioural Brain Research* 147 (2003) 73–82
- Romano, A., Lozada, M. and Maldonado, H., Effects of naloxone pretreatment on habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*, *Behav. Neural Biol.*, 53 (1990) 113–122.
- Arturo Romano, Ramiro Freudenthal, Emiliano Merlo y Aryeh Routtenberg. (2006). Evolutionary conserved role of the NF-kappa B transcription factor in neural plasticity and memory. *European Journal of Neuroscience*, en prensa.
- Routtenberg, A. y Rekart, J. L. (2005). Post-translational protein modification for longlasting memory. *Trends in Neurosci.*, 28 (1): 12-9 .
- Routtenberg, A. (1979). Anatomical localization of phosphoprotein and glycoprotein substrates of memory. *Prog. Neurobiol.*, 12 (2): 85-113 .
- Routtenberg, A. (1996). Reverse piedpiperase: is the knockout mouse leading neuroscientists to a watery end? *Trends in Neurosci.*, 19 (11): 471-2 .
- Saccani, S., Pantano, S. y Natoli, G. (2001). Two waves of nuclear factor kappaB recruitment to target promoters. *J. Exp. Med.*, 193 (12): 1351-9 .
- Salinska, E., Bourne, R. C. y Rose, S. P. R. (2004). Reminder effects: the molecular cascade following a reminder in young chicks does not recapitulate that following training on a passive avoidance task. *Eur. J. Neurosci.*, 19, 3042-7 .
- Sandeman D, R. Sandeman, C. Derby, and M. Schmidt. Morphology of the Brain of Crayfish, Crabs, and Spiny Lobsters: A Common Nomenclature for Homologous Structures. *Biol. Bull.*, 1992, 183: 304-326.
- Sanders, M.J., Wiltgen, B.J. y Fanselow, M.S. (2003) The place of the hippocampus in fear conditioning. *Eur. J. Pharmacol.*, 463, 217–223.
- Sara, S.J. (2000). Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn. Mem.*, 7, 73–84 .
- Schmidt-Ullrich et al. 1996
- Schmitz ML, Mattioli I, Buss H, Kracht M. NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chembiochem.* 2004 Oct 4;5(10):1348-58.
- serotonergic neurons LCB1 and RCB1 in the cerebral ganglia of
- Siegel, S. (1956) *Non-Parametric Statistics for the Behavioral Sciences*. McGraw-Hill, New York.

- Silva A, Jeffrey H. Kogan, Paul W. Frankland, and Satoshi Kida. CREB and Memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 1998. 21:127–48.
- Suzuki T, Mitake S, Okumura-Noji K, Yang J-P, Fujii T, Okamoto T. 1997. Presence of NF-kappa B-like and IkappaB-like immunoreactivities in postsynaptic densities. *NeuroReport* 8:2931–2935.
- Thompson, K. R., Otis, K. O., Chen, D. Y., Zhao, Y., O'Dell, T. J. y Martin, K. C. (2004). Synapse to nucleus signaling during long-term synaptic plasticity; a role for the classical active nuclear import pathway. *Neuron*, 44 (6): 997-1009.
- Tinsley M.R.,¹ Jennifer J. Quinn, and Michael S. Fanselow. The Role of Muscarinic and Nicotinic Cholinergic Neurotransmission in Aversive Conditioning: Comparing Pavlovian Fear Conditioning and Inhibitory Avoidance. *Learning y Memory*, 11:35–42 2004.
- Tischmeyer W, Grimm R. Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci.* 1999 Apr;55(4):564-74.
- Tischmeyer W, Kaczmarek L, Strauss M, Jork R, Matthies H. 1990. Accumulation of c-fos mRNA in rat hippocampus during acquisition of a brightness discrimination. *Behav Neur Biol* 54:165–171.
- Tomsic D, Maldonado H, Rakitin A. 1991. Morphine and GABA: effects on perception, escape response and long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res Bull.* 26(5):699-706.
- Tomsic D, María E. Pedreira, Arturo Romano, Gabriela Hermitte and Héctor Maldonado. Context–US association as a determinant of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Animal Learning y Behavior.* 1998, vol. 26 issue: 2 196-209.
- Tomsic D, Romano A, Maldonado H. 1998. Behavioral and mechanistic bases of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. In: Ehrlich Y, editor. *Molecular and cellular mechanisms of neuronal plasticity: basic and clinical applications.* Advances in experimental medicine and biology series. New York: Plenum. p 17–35.
- Tomsic, D., Pedreira E. M., Romano A. y Maldonado H. (1998). Context-US association as a determinant of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Animal Learning and Behavior*, 26: 196-209 .
- Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature.* 1999 Nov 25;402(6760):421-5.
- Tully, T., Preat, T., Boynton, S.C. and Del Vecchio, M., Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*, *Cell*, 79 (1994) 35–47.

- Unlap MT, Jope RS. 1997. Dexamethasone attenuates NF-kappa B DNA binding activity without inducing I kappa B levels in rat brain in vivo. *Brain Res Mol Brain Res* 45:83– 89.
- Unlap, T. and Jope, R.S., Inhibition of NFk-B DNA binding activity by glucocorticoids in rat brain, *Neurosci. Lett.*, 198 (1995) 41–44.
- Vianna, M.R.M., Izquierdo, L.A., Barros, D.M., de Souza, M.M., Rodrigues, C., Sant'Anna, M.K., Medina, J.H., and Izquierdo, I. 2001. Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 34: 233–240.
- Wahl, C., Liptay, S., Adler, G. y Schmid, R. (1998) Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of Nuclear Factor Kappa B. *J. Clin. Invest.*, 101, 1163–1174.
- Weber, C. K., Liptay S., Wirth, T., Adler, G. y Schmid, R. M. (2000). Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of IkappaB kinases alpha and beta. *Gastroenterology*, 119, 1209-18.
- Wellmann, H., Kaltschmidt, B. y Kaltschmidt C. (2001). Retrograde transport of transcription factor NF-kappaB in living neurons. *J. Biol. Chem.*, 276 (15): 11821-9.
- Yeh, S. H., Lin, C. H. y Gean, P. W. (2004). Acetylation of nuclear factor-kappaB in rat amygdala improves long-term but not short-term retention of fear memory. *Mol. Pharmacol.*, 65 (5): 1286-92.
- Yeh, S. H., Lin, C. H., Lee, C. F. y Gean, P. W. (2002). A requirement of nuclear factor-kappaB activation in fear-potentiated startle. *J. Biol. Chem.*, 277 (48): 46720-9.

- Yin, J. C. y Tully, T. (1996). CREB and the formation of long-term memory. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 6 (2): 264-8 .
- Yin, J.C.P., Del Vecchio, M., Zhou, H. and Tully, T., CREB as a memory modulator: induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*, *Cell*, 81 (1995) 107–115.
- Yin, M.-J., Yamamoto, Y. y Gaynor, R.B. (1998) The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of IkappaB kinase-beta. *Nature*, 396, 77–80.
- Yu Z, Zhou D, Bruce-Keller AJ, Kindy MS, Mattson MP. 1999. Lack of the p50 subunit of nuclear factor-kappaB increases the vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic injury. *J Neurosci* 19:8856 – 8865.
- Zhong, H., Voll, R. E. y Ghosh, S. (1998). Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol. Cell.*, 1 (5): 661-71.