



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

¿El estrés genera memorias mediante el mecanismo de etiquetado conductual?

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de CIENCIAS BIOLÓGICAS

PAMELA LOPES DA CUNHA

Director de tesis: Haydee A. M. Viola

Consejero de estudios: Arturo Romano

Lugar de trabajo: Laboratorio de Memoria. Instituto de Biología Celular y Neurociencia
“Prof. E. De Robertis”. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2019

Índice

Resumen	1
Abstract	5
Publicaciones	8
Agradecimientos	10
Abreviaturas	16
Introducción	19
Eterno resplandor de una mente CON recuerdos.....	20
A clasificar se ha dicho.....	24
Consolidando recuerdos.....	26
¿Cómo se almacena una memoria?.....	28
De la plasticidad sináptica a la memoria.....	30
Con ustedes, la hipótesis del etiquetado conductual.....	33
Juego de palabras: ABC para el EC	35
Etiqueta y PRPs... ¿Quién es quién?.....	36
Alien vs Depredador: la competencia de las memorias.....	39
¿De qué hablamos cuando hablamos de estrés?.....	40
Los receptores de glucocorticoides en el SNC.....	42
Estrés: un modulador potente de los recuerdos.....	43
Objetivos	48
Capítulo I: Efectos del estrés sobre el aprendizaje y la memoria en roedores	
Materiales y métodos I.....	52
Resultados I.....	64
Discusión I.....	88
Capítulo II: Efectos del estrés sobre el aprendizaje y la memoria en humanos	
Materiales y métodos II.....	101
Resultados II.....	108
Discusión II.....	125
Conclusiones	136
Bibliografía	139

RESUMEN

¿El estrés genera memorias mediante el mecanismo de etiquetado conductual?

Conocer los mecanismos que subyacen a la memoria se ha vuelto un tema central de estudio en las neurociencias de las últimas décadas. En todo momento adquirimos información proveniente de distintas experiencias y nuestros recuerdos pueden ser influenciados por los eventos que experimentamos. Es necesario identificar qué fenómenos, y de qué manera, colaboran o interfieren con la adquisición, el guardado y la evocación de la información. Para que una información sea guardada por largo término, requiere de un proceso de estabilización denominado consolidación. Este proceso depende de la síntesis de proteínas necesarias para el refuerzo de la traza mnésica, y la hipótesis del etiquetado conductual (EC) postula que también es necesario el establecimiento de una marca en el sustrato neuronal activado por el aprendizaje, a dónde las proteínas puedan ser selectivamente utilizadas para mantener la plasticidad que subyace a la memoria (Moncada y Viola, 2007).

Partiendo de una vasta literatura acerca de los efectos modulatorios del estrés sobre los procesos de memoria, este trabajo contribuye al conocimiento sobre cómo un evento de estrés agudo, asociado temporalmente a una tarea de aprendizaje, influye en la consolidación de memorias dependientes de hipocampo. Los resultados revelan que los efectos pueden ser tanto beneficiosos como perjudiciales y apoyan la hipótesis del EC como mecanismo subyacente a la formación de memorias de largo plazo (MLT). De acuerdo con la EC, algunos eventos pueden tener influencia sobre memorias asociadas al proveer proteínas relacionadas con la plasticidad (PRPs) o al competir por ellas. La asociación de estas PRPs con la marca neuronal o “etiqueta” inducida por el aprendizaje es un factor decisivo en la consolidación de la MLT.

Inicialmente, estudiamos la interacción entre una situación de estrés agudo y una tarea de reconocimiento espacial de objetos (REO) en roedores. Demostramos que un entrenamiento débil en este paradigma, capaz de inducir memoria de corto término (MCT) pero no de largo plazo, puede dar origen a una MLT si una situación de estrés (plataforma elevada, PE) ocurre dentro de una

ventana de tiempo crítica posterior al aprendizaje de REO. Este fenómeno depende de síntesis de proteínas inducidas por el estrés, de BDNF y de la activación de los receptores de gluco y mineralocorticoides. En las ocasiones en que la situación de estrés fue anterior al aprendizaje, ni la formación ni la promoción de la MLT fue observada, por lo cual sugerimos que el estrés podría estar afectando el establecimiento de la etiqueta inducida por el aprendizaje de REO. También demostramos que cuando el entrenamiento de REO es lo suficientemente fuerte como para generar per se MLT, un evento de estrés post- aprendizaje perjudica la memoria. Nuestros experimentos apoyan que este efecto podría ser debido a una competencia por las proteínas disponibles.

Luego evaluamos en roedores si el estrés tiene efectos sobre la memoria de otra tarea, como parte de nuestro objetivo de investigar si existen reglas generales que rijan la formación de MLTs. Para ello utilizamos el paradigma de evitación inhibitoria (EI) y demostramos que el estrés tiene un efecto promnésico dentro de una ventana de tiempo acotada (en este caso cuando es previo a la tarea), que es dependiente de la síntesis de proteínas y de la activación de los receptores de glucocorticoides. A su vez, el estrés tiene efectos perjudiciales sobre la MLT de EI inducida por un aprendizaje fuerte.

Por último, planteamos una transferencia del modelo al estudio de la memoria en humanos. Nos preguntamos si un fenómeno similar a lo observado en roedores ocurre en el ámbito escolar, es decir si una situación de estrés es relevante para el aprendizaje y la memoria dentro del aula. Utilizamos la Figura de Rey-Osterrieth como protocolo para evaluar una memoria gráfica y demostramos, nuevamente, que los efectos de un evento de estrés (examen curricular) cercano en el tiempo pueden ser tanto benéficos como perjudiciales. Cuando los estudiantes expresaron una memoria más débil de la figura, observamos que un examen dentro de una ventana de tiempo específica luego del mismo, mejora la memoria gráfica evaluada. En cambio, cuando los estudiantes expresaron una memoria más fuerte, un examen tanto antes como después, tuvo efectos perjudiciales sobre la MLT de la figura.

Nuestros hallazgos proporcionan nuevos conocimientos sobre el impacto del estrés en la formación de una MLT, tanto en roedores como en seres humanos, y apoyan la hipótesis del EC como mecanismo subyacente a la formación de MLTs. Los resultados en el ámbito escolar, además, alertan a los educadores a considerar los efectos de un examen en el aprendizaje de otros contenidos dictados el mismo día dentro del aula.

Palabras clave: Memoria de Largo Termino, Estrés, Etiquetado Conductual, Hipocampo, Ratas, Estudiantes.

ABSTRACT

Does stress generate memories through the behavioral tagging mechanisms?

Understanding the mechanisms that underlie memory has become a central topic in the neurosciences field in the last decades. All the time we acquire information from different experiences and our memories can be influenced by the events that we are going through. It is necessary to identify which phenomena, and in what way, can collaborate or interfere with the acquisition, storage and retrieval of information. Long-term storage of information requires a stabilization process called consolidation. This process depends on the protein synthesis, which are necessary for the reinforcement of the mnesic trace. The Behavioral Tagging hypothesis (BTH) postulates that it is also necessary the setting of a tag in the neuronal substrate induced by learning, where proteins can be selectively used to maintain the plasticity that underlies memory (Moncada y Viola, 2007).

Considering the literature about the modulatory effects of stress on memory processes, this work contributes to the knowledge about how an acute stress event, temporarily associated with a learning task, influences the consolidation of hippocampal dependent memories. Our results reveal that effects can be both beneficial and detrimental and support the BTH as a mechanism underlying the formation of long-term memories (LTM). According to this, some events could influence temporally associated memories by providing plasticity-related proteins (PRPs) or competing for them. The association of these PRPs with learning-induced neuronal tag is a decisive factor in the consolidation of the LTM.

First, we studied the interaction between stress event and a spatial object recognition task (SOR) in rodents. We showed that a weak SOR training, which only induces short term memory (STM), can be stabilized into LTM if an event of acute stress (elevated platform -PE) is experienced within a critical time window after the SOR-learning. This promoting effect depends on protein synthesis induced by stress, BDNF activity and the glucocorticoid (GR) and mineralocorticoid receptors (MR) activation. When stress was experienced previous to the learning neither the formation or the

promotion of MLT was observed, so we have postulated that stress could be affecting the setting of the SOR learning-tag. We also show that if SOR training is strong enough to generate MLT per se, a post-learning stress event impairs memory. Our experiments support that this effect could be due to competition for available proteins.

Then, we assessed in rodents if stress can affect the memory of another task since our objective to investigate if general rules govern MLT formation. We used the inhibitory avoidance task (IA) and we demonstrated that stress promotes IA-LTM within a critical time-range (when it occurs prior to task). The effect depends on protein synthesis and GR activation. Further, IA-LTM induced by strong IA-training is impaired by stress event.

Finally, we proposed a transfer of model to human memory study. We wondered if a similar phenom as the observed in rodents could occur in the educational context, i.e. if a stress situation is relevant for learning and memory in the classroom. We design a protocol using Rey-Osterrieth figure to asses a graphic memory. Again, we showed that stress (curricular exam) close to learning could have positive or negative effects on it. In a weak retrieval student population, we noticed that an exam improved graphic-LTM when is experienced in a specific time after to training. However, in a strong retrieval population of students, exam before or after to learning impaired figure retention.

Our findings provide new insights about the impact of stress on LTM formation, both in rodents and in humans, and support the BTH as a mechanism underlying the formation of MLTs. The results in the educational context, in addition, alert educators to be attentive to the exam effects on other content taught the same day in the classroom.

Key words: Long-term memory, Stress, Behavioral Tagging, Hippocampus, Rats, Students.

PUBLICACIONES

Los resultados presentados en este trabajo han sido publicados en los siguientes artículos:

Lopes da Cunha P, Ramirez Butavand D, Chisari LB, Ballarini F and Viola H. "Exams at classroom have bidirectional effects on the long-term memory of an unrelated graphical task". *npj Science of Learning*. 2018 Nov 6. Doi: 10.1038/s41539-018-0036-7

Lopes da Cunha P, Villar ME, Ballarini F, Tintorelli R, Viola H. "Spatial object recognition memory formation under acute stress". *Hippocampus*. 2018 Oct 8. doi: 10.1002/hipo.23037

Publicación afín al tema de estudio:

Villar M.E, Martinez M.C, Lopes da Cunha P.J, Ballarini F., Viola H. "Memory consolidation and expression of object recognition are susceptible to retroactive interference." *Neurobiology of Learning and Memory*. 2016 Apr 26. doi: 10.1016/j.nlm.2016.04.010.

AGRADECIMIENTOS

Quizás sea de las primeras cosas que se lean de esta tesis, pero ciertamente estás palabras forman parte de la última sección que estoy escribiendo. Es así que estoy muy consciente del esfuerzo que representó haber llegado hasta acá... el momento en que la tesis está escrita y el doctorado va llegando a su fin. Tengo muy claro que estos logros han sido acompañados, y son fruto de decisiones, trabajo y pasiones mías pero que supieron ser empujadas por un conjunto de personas que han estado conmigo y hacen que todo lo que a uno le gusta valga el doble.

Allá por el año 2013 cruzaba por primera vez la puerta del Laboratorio de Memoria del IBCN, y tuve la fortuna de salir y volver a entrar por ella muchas veces más. Fortuna porque descubrí que es uno de los mejores lugares para hacer ciencia, y solo una cosa quizás sea más importante en este laboratorio que investigar, la pasión por la comida. Gracias por tantos años de recetas, de críticas culinarias y por los innumerables obsequios alimenticios a los que se nos acostumbra aca adentro, así sí que vale la pena investigar!. Pero vale la pena investigar acá, decía, también porque este laboratorio está formado porque gente talentosísima, que no se cansa de aprender, que está llena de pasión por lo que hace y que me han enseñado tantísimo acerca de lo que realmente significa investigar y correr las barreras del conocimiento. Hace que no te importe la infraestructura muchas veces precaria, los recortes presupuestarios, que haya que atar cosas con alambre o trabajar incansablemente sin importar día u hora.

En primer lugar, gracias Haydee por darme la oportunidad de llevar a cabo un proyecto con vos. Gracias por confiar en mí, por enseñarme lo que hizo falta y aun más, por guiarme y por compartirme tu pasión por la ciencia. Gracias por el apoyo en lo laboral y fuera del laboratorio también. Creo que cualquiera estaría contento en tenerte como directora, aprendiendo de tu trabajo y disfrutando tu calidez como persona. Me alegra mucho que hayamos compartido camino. Jorge, gracias por brindarme tus experiencias y tu sabiduría en tantos aspectos de la vida. Aun no te haya disfrutado como director, me has acompañado de forma muy parecida y me siento sumamente agradecida. Gracias por siempre tener un oído para mi, discutir conmigo y aconsejarme. Gracias por enriquecer

enormemente el trabajo científico que todos hacemos, por los grandes debates que sembras y por la infaltable medida de ironía, de humor y chispa que tienen todos ellos. Gracias Haydee y Jorge porque han hecho de este espacio de trabajo uno de los mejores lugares para pensar, tener curiosidad e investigar. Serán siempre referentes para mí.

Gracias a mis compaaaaaaas. Son un montón, y son lo más. En orden de aparición:

Gracias a Maru por enseñarme el trabajo en el laboratorio, por la paciencia, por trabajar codo a codo conmigo y hacerme participe de sus proyectos también. Gracias por las charlas, las risas, y ser una de las primeras personas en brindarme una linda amistad. Adoré siempre toda tu energía Maru, tan grande como la velocidad con la que hablas. Gracias Cyn por ser una teacher también, aunque no compartiéramos minuto a minuto nuestros experimentos, sí hemos compartido discusiones científicas y te tomaste el tiempo para enseñarme muchas cosas, me has mostrado un camino en lo laboral y también has sido una compañera en lo personal. Hemos pasado momentos de furia y muchos de amor y te has ganado mi corazón. Fabri! Gracias man por ser tan buena onda conmigo desde el primer momento. Me enseñaste a trabajar con las ratitas y confiaste en mí para llevar las actividades científicas a la escuela. Gracias por ayudarme tanto con mis experimentos, gracias por brindarme tu conocimiento y gracias por que en todos estos años seguís haciéndome parte de los emprendimientos que armas y amas y que también disfruto y me entusiasman. Gracias por siempre estar atento a como estoy, darme el empujón necesario cuando me frustró, ayudarme siempre y ser un amigo.

Al resto del antiguo staff del labo que me recibió: Ceci K, Caro, Micol, me han hecho divertirse en mi lugar de trabajo y he aprendido mucho de ustedes siendo una novata. Pedro y Diego, gracias por ser referentes también, admiro mucho lo grosos que son y toda la garra que le han puesto a hacer ciencia, con todo el entusiasmo que se nota que tienen. En particular, querido Moncada, gracias por las discusiones científicas, por hacerte tiempo para iluminarme sobre miles de cuestiones y por las palabras y abrazos en momentos o aun épocas conflictivas. Aunque haya varios aspectos en los que quizás nuestras opiniones nos lleven a discutir, siempre fue muy divertido hacerlo con vos. Noe, Lyon, gracias también porque desde su lejanía en el 7mo piso han acompañado mi trabajo y mis días.

A los contemporáneos! Gracias Fer. Porque en este camino que hicimos a la par hemos compartido laburo y me has dado una gran ayuda con eso (cuantas preguntas te he hecho y cuantos favores te he pedido). Me has aconsejado, motivado y pasado un poco de toda esa energía que te mueve a mil por hora. Me llevare en el corazón los viernes de limpieza y cumbia en el labo, tu manija para salir todos los días y tu amistad hermosa. Anita, ya perdí la cuenta de hace cuanto que estas en el labo, pero has sido una compañera excelente. Todo este tiempo te ha convertido en la reina de la mesada y todo ese espíritu laborador te ha hecho estar siempre dispuesta a dar una mano. Gracias. No quiero dejar de mencionar que tu larga estadía por aquí te ha hecho merecedora de muchos apodosos que recordare siempre con gracia. Has sido una bella amiga. Magui y Facu, empezamos cerquita, continuamos mas lejos, pero siempre han estado ahí como compañeros y amigos. Son locos amantes de la ciencia y eso ha hecho mi paso por este trabajo mucho mejor, como también son geniales personas que han hecho mi paso por la vida misma más linda. A los que se sumaron después.... Magdita, que decir! Hay tanto material! Sos campeona de la vida y admiro la garra que le pones a todo, incluido tu laburo obviamente, he aprendido de vos. Gracias por ser una gran amiga ante todo, y una buena compañera. Extrañare tus musicalizaciones en los días de trabajo de pc y tus cánticos con auriculares cuando agarras la mesada, tus locuras en los congresos y las de otros lados también. Dani, quien iba a decir que terminaríamos haciendo un paper juntas! una masa haber laburado con vos, aunque seas horrible ordenando datos y poniendo nombre a los archivos, pero compensa tu inteligencia y las interesantes discusiones que hemos tenido. Me encanto que interactuemos en lo laboral y personal, sos la hippie con osde mas divertida que conozco y sos una gran amiga.

Ramirito y Pablo! Cuando llegaron al labo tuve la tarea de enseñarles sobre el trabajo así como me habían enseñado a mí y espero haber transmitido algo de sabiduría y pasión por la investigación. Cuando uno comparte lo que sabe siempre se aprende también, así que me llevo mucho de uds. Gracias por la paciencia, por escucharme, por ayudarme con el laburo y por ser grandes compañeros de aventuras en el laboratorio. Y cuando se pudo fuera de él. Gracias por todo el cariño que me han demostrado y espero que sigan su camino en la ciencia con mucho éxito!.

A Mati, a las Julis, a Cami, ábranse camino y disfruten su doctorado, gracias por la buena onda y estar siempre para dar una mano!. Particularmente “Jey C” gracias por trabajar conmigo en este tiempito que nos tocó a la par y por la paciencia que me has tenido quizás muy necesaria en esta etapa final en la que me has encontrado.

Gracias Lina por ayudarnos a organizar el laboratorio y por tu cariño. A todo el labo, de verdad, infinitas gracias, los quiero. Este labo se la re banca.

A todas las demás personas en el IBCN que han hecho mi trabajo más ameno, gracias. Por ejemplo a los bioteristas encargados de mantener mis animalitos. Gracias Manu y Andre fundamentalmente y los que han trabajado duro bajo su ala para que yo pueda hacer mis proyectos con las menores complicaciones posibles. Gracias por los mates y las charlas también. Gracias a toda la muchachada de los laboratorios vecinos que me han acompañado en esta etapa como compañeros, aun nuestros laburos se toquen un poco menos, y como amigos; a los que ya se fueron y a los que siguen aquí, particularmente a todos los integrantes del laboratorio Paratcha-Ledda, a Marianela y Lucila, amigas laburantes que admiro y quiero, Aiti, Belu, Mati. Gracias también a los investigadores que me han ayudado con mi trabajo.

Gracias a las instituciones que han permitido mi formación, que me han dado un lugar de trabajo o han financiado una beca para que desarrolle proyectos y esta tesis doctoral. Ojalá llegue el día en que se reconozca más el inmenso laburo de los becarios como para garantizar mayores derechos y también que un futuro digno para cualquier país incluye apostar al desarrollo científico.

A los amigos de la vida, inmensas gracias. Por las cervezas, las salidas, las charlas, la filosofía, el aguante y cuantos etcétera.... la amistad. Los que han estudiado conmigo y siguen ahí pasada más de una década. Qué distinta hubiese sido mi carrera, mi pasión por esto y mi trabajo hoy sin ustedes. Lau, Gabi, Meli, Cin, Lu, Lele, Luma, los quiero hasta el infinito y más allá. Gracias por ofrecerme sus experiencias en la ciencia, o fuera de ella, y más que nada por ser amigos de fierro, inquebrantables y acompañarme incondicionalmente. Mucho compartido y mucho de lo que estar feliz y agradecer. Gracias a todos los toquetones por ese cariño que nos bautizó, por la amistad y los encuentros. Gracias a mis amigas que conocí en el MACN y que son empuje constante.

Gracias especiales a los amigos que me acercó la vida hace muchos años y que aún están dando aliento para los caminos que elijo andar: mis amigos de la escuela, amigos scout, compañeros fugaces de la facu pero que han sido compañeros eternos afuera, amigos de viajes o experiencias, amigos con los que comparto la pasión de bailar o acrobatear. Gracias especialmente a Alan, Sole, Angie, Marquitos, Flor, David, Beti, Tam, Mica, a los mismos de siempre de mi querido Uriburu y a Marie que ha sostenido uno de mis remos incansablemente y me ayudado muchísimo con mis metas en este 2019 tan complicado.

Gracias finalmente a mi familia. Mi mama, que haga lo que haga y cualquiera sean las circunstancias esta ahí para mí. Gracias por cuidarme, acompañarme, ayudarme en absolutamente todo. Sos un ejemplo de fuerza, perseverancia y amor. Gracias a mi viejo por ser un motor que me empuja siempre para adelante con mis proyectos y por ofrecerme las posibilidades para hacer lo que me gusta. Gracias a los dos por criarme, quererme, bancarme y hacer tantas cosas por mí en cada uno de los pasos que di. Gracias a mis hermanas Jesi y Agus por sus palabras de aliento siempre, por ser un ejemplo de lucha y esfuerzo, por compartir mis alegrías y soportar mis rabias, por buscar la manera de que lo que me proponga me salga siempre mejor. Gracias a mis sobrinos que aunque quizás ellos no lo sepan, me alegran la vida y son la luz que me hace salir siempre para adelante. Gracias a mis tíos, mis primos, mis madrina, que están, se preocupan y me apoyan.... Le agradezco especialmente a mi abuelo Carlos tantos años de amor y enseñanzas que me hicieron llegar hasta acá, sin duda. Y fundamentalmente a mi abuela Picho, la abuela Juli y a mi tia Gra, que ya no están pero siempre estuvieron atentas a lo que hacía, a cuanto crecía, a verme feliz y se que estarían orgullosas de este logro.

ABREVIATURAS

ACTH: adenocorticotrofina

ANISO: anisomicina (inhibidor de síntesis proteica)

ARC: proteína inducida por actividad relacionada con el citoesqueleto (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*)

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro (*brain-derived neurotrophic factor*)

BLA: amígdala basolateral (*basolateral amygdala*)

CA: campo abierto

CAMKII: proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina II

CORT: corticosterona

CREB: proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (*cAMP response element binding protein*)

CRH: hormona liberadora de corticotrofina (*corticotropin releasing hormone*)

CTR: sujetos experimentales control

CTRd: estudiantes control dentro de la población de retención débil

CTRf: estudiantes control dentro de la población de retención fuerte

EC: Etiquetado conductual

EI: evitación inhibitoria

EId: entrenamiento débil en tarea de EI

EIf: entrenamiento fuerte en tarea de EI

EMET: emetina (inhibidor de síntesis proteica)

ERK 1/2: proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (*extracellular-signal-regulated kinases*)

EXM: grupo de estudiantes que realiza un examen

GC: glucocorticoides

GR: receptor de glucocorticoides

HPA: eje hipotálamo-pituitaria-adrenal

LTD: depresión de largo plazo (*long-term depression*)

LTP: potenciación de largo plazo (*long-term potentiation*)

MCT: memoria de corto termino

MIFE: mifepristona (antagonista GR)

MLT: memoria de largo termino

MR: receptor de mineralocorticoides

PE: plataforma elevada

PKA: proteína quinasa A

PKMz: proteína quinasa Mz

PRPs: proteínas relacionadas con la plasticidad

REO: reconocimiento espacial de objetos

REOd: entrenamiento debil en tarea de REO

REOf: entrenamiento fuerte en tarea de REO

RIA: radioinmunoensayo

SNC: sistema nervioso central

SPIRO: spironolactona (antagonista MR)

STC: Etiquetado sináptico y captura

STR: sujetos experimentales con estrés

TR: entrenamiento

TS: testeo

VEH: solucion vehículo

Y-D: ley Yerkes-Dodson

INTRODUCCIÓN

Eterno resplandor de una mente CON recuerdos

Una de las funciones complejas más interesantes del cerebro es la capacidad de almacenar la información proporcionada por la experiencia y recuperar buena parte de ella de manera voluntaria. Los procesos de aprendizaje y memoria son primordiales en la supervivencia de los animales en un ambiente cambiante e impredecible, ya que permiten anticipar el futuro mediante predicciones basadas en la experiencia. Gracias a la memoria generamos también nuestra propia identidad como individuos: “Somos quienes somos por lo que aprendemos y por lo que recordamos” dijo E. Kandel (2007).

¿Cómo se relacionan estos procesos tan importantes? El aprendizaje se observa en la capacidad de un animal de modificar su conducta frente a un determinado estímulo, debido a una experiencia previa, donde pudo incorporar información desconocida. Esa información se codifica específicamente y es convertida en una traza de memoria. Por memoria entendemos, entonces, a la capacidad de codificar, almacenar y retener en el tiempo la información adquirida, pudiendo almacenarla, usarla, modificarla o reconstruirla (Dudai, 2002).

Uno de los primeros interrogantes que se nos presenta es: ¿dónde ocurren estos procesos? Hace siglos atrás, la noción colectiva no consideraba que los procesos mentales se desarrollaban en el cerebro y no solo se le adjudicaban a la mente propiedades divinas sino que se creía que residía en otras partes del cuerpo. Las concepciones actuales que tenemos sobre el cerebro, sus células y el comportamiento emergieron luego de una sucesión de hallazgos en diversos campos de la ciencia recién a fines del siglo XIX.

Basado en sus estudios anatómicos, hace más de 200 años, Franz J. Gall planteó conceptos fundamentales para el desarrollo de la neurociencia. Primero, postuló que el comportamiento emanaba del cerebro; por otro lado argumentó que las funciones mentales residen en áreas específicas del cerebro y que esto determina el comportamiento; por último sugirió cierta plasticidad

en los centros encargados de realizar las distintas funciones, así como pasa con los músculos luego de la ejercitación. Planteó la existencia de al menos 27 áreas encargadas de facultades mentales diferentes, y aunque sus argumentos y propuestas no fueron del todo convincentes, destacó la corteza como la encargada del procesamiento de la memoria. De esta manera, a través de sus aportes conceptuales, contribuyó al conocimiento del lugar donde las memorias son almacenadas. Tiempo después, estudios como los de Paul Broca en pacientes con alteraciones en el lenguaje asociadas a lesiones cerebrales, sentaron el interés por la localización de las funciones cerebrales y su investigación científica. Los estudios publicados sobre el caso del paciente Henry Molaison (H.M.) a mediados del siglo XX (Scoville y Milner, 1957) dieron un giro a estos conocimientos. Con el objetivo de aliviar una epilepsia severa, H.M. fue sometido a una operación que implicó la remoción bilateral de gran parte del lóbulo temporal medial, y si bien los ataques se redujeron se hizo evidente que padecía un serio deterioro de la memoria reciente. Aunque podía retener información de eventos cercanos, H.M. no podía formar de ello una memoria duradera. También se detectó que recuerdos de años previos a la operación se encontraban alterados, si bien conservaba los recuerdos de su infancia (es decir que padecía amnesia retrograda parcial). Estos hallazgos fueron observados también en otros pacientes y la severidad de la amnesia se relacionó con la extensión del daño en el lóbulo temporal medial como con la memoria evaluada (Squire y Alvarez, 1995; Nadel y Moscovitch 1997; Bayley y col 2003). Lo llamativo fue que H.M. mantuvo, sin embargo, la capacidad de aprender nuevas habilidades motoras (Milner y col 1998). Si bien desde la psicología y la filosofía se había propuesto la idea de que existía más de un tipo de memoria, estos estudios fueron los primeros en demostrar de manera experimental la existencia de distintos tipos de memorias que requieren sustratos anatómicos diferentes (Kandel y col 2000, Squire 2004).

Los estudios comportamentales nos han provisto de evidencia sobre el rol del lóbulo temporal medial, que abarca el hipocampo, cortezas entorrinal y perirrinal y la amígdala, en la codificación de las memorias sobre hechos y eventos en humanos. A través de otros experimentos, se ha logrado disecar inclusive con mayor precisión el rol de estas distintas estructuras en los procesos de memoria, tanto en humanos como en roedores, como iremos viendo a continuación.

En el desarrollo de esta tesis se utilizaron tareas dependientes de la actividad del hipocampo, estructura con un rol fundamental en el procesamiento de información espacial, en memorias que requieren información contextual y en la detección de la novedad espacial (Morris y col 1982; Young y col 1994; Izquierdo y Medina 1997; Mumbay y col 2002, Wu y Shuterland 2006; Lee y Solivan 2008). Se ha demostrado que en la región CA1 del hipocampo existen neuronas capaces de responder diferencialmente a localizaciones específicas en un mismo ambiente o en ambientes diferentes (place cells- O'Keefe y Dostrovsky 1971), lo cual sugiere que el hipocampo contiene un mapa cognitivo espacial, representación tridimensional del ambiente en que se mueve un individuo. Esto fue observado en roedores y evidencias en humanos sugieren también la existencia de un código neuronal de navegación espacial basado en células que responden a ubicaciones espaciales específicas y puntos de referencia (Ekstrom y col 2003; Herweg & Kahana 2018). El hipocampo es una estructura clave en tareas de navegación espacial como el laberinto acuático de Morris o laberintos con otras características (Vorhees y Williams 2006; Jarrard 1993). También se ha postulado que la detección de la novedad espacial, que requiere la comparación de la información sobre un ambiente nuevo con la información almacenada previamente, ocurre en el hipocampo, sustentado por experimentos que demuestran que la presentación de estímulos espaciales novedosos dispara en el hipocampo una batería de eventos fisiológicos y moleculares (Guzowski y col 1999, Winograd y Viola 2004; Kemp y Manahan-Vaughan 2004).

El hipocampo, como la corteza perirrinal, también está involucrado en la formación de memorias de reconocimiento, que permite al individuo ser consciente de que determinado estímulo ha sido experimentado previamente (Steckler y col 1998). La corteza perirrinal estaría implicada en la discriminación de la familiaridad de ítems individuales, mientras el hipocampo parecería estarlo en el reconocimiento de constelaciones de estímulos (Winters y col 2008) como también cuando existen claves espaciales y contextuales importantes durante el almacenado de la información sobre un objeto (Dere y col 2007, Zola y col 2000). En concordancia con estos resultados, Wan y col (1999) mostraron que arreglos espaciales novedosos de objetos familiares aumentan la actividad del gen temprano c-fos (indicador de actividad neuronal) en la región CA1 del hipocampo, mientras que la

presentación de objetos novedosos la incrementa en la corteza perirrinal. Así mismo, existen numerosas evidencias de que el hipocampo se encuentra involucrado en el procesamiento de tareas de reconocimiento espacial de objetos (Mumbai 2002; Clark y Martin 2005; Dere y col 2005).

También se ha demostrado que aprendizajes de tipo aversivos dependen de manera crucial de la integridad del lóbulo temporal medial, y en especial de la formación hipocampal para la formación de una MLT (Izquierdo y Medina 1997; Moser y Moser 1998; Ogrèn y Stiedl 2015). En el paradigma de evitación inhibitoria, por ejemplo, los animales aprenden a no repetir su comportamiento innato de exploración del ambiente porque lo asocian con la llegada de un shock eléctrico y se ha demostrado la participación del hipocampo (Izquierdo y col 1997; Moncada 2011; Giovaninni 2015). El rol crítico del hipocampo también fue observado en condicionamientos de miedo al contexto (Philips y LeDoux 1992; Kim y Fanselow 1992; LaBar y Phelps 2005).

Por otro lado, trabajos que evalúan el impacto de lesiones o la aplicación de fármacos en modelos animales muestran que la disrupción de la integridad hipocampal altera mayoritariamente la formación de memorias recientes sobre las remotas (modelos de consolidación de sistemas- McClelland y col 1995; Squire y Alvarez 1995),

Como vemos, una gran variedad de trabajos involucra al hipocampo en la elaboración de mapas cognitivos y en la formación y evocación de distintas memorias. En roedores, su rol es fundamental en el aprendizaje de paradigmas como el laberinto acuático de Morris, laberintos radiales, miedo condicionado al contexto y evitación inhibitoria, como también paradigmas de reconocimiento de objetos novedosos o en el espacio.

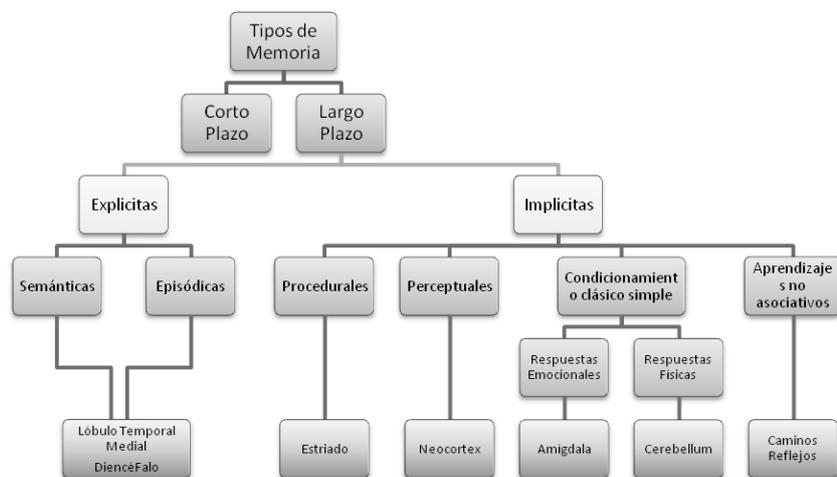
A clasificar se ha dicho.

Uno de los criterios más simples que podemos tomar para diferenciar algunas memorias de otras es su tiempo de duración. Sabemos que existen memorias que duran muy poco, almacenadas por milisegundos o segundos, y son las que llamamos *memorias de trabajo*, y son diferentes de aquellas que abarcan períodos de tiempo mayores. Entre las que se almacenan por más tiempo, encontramos las que duran desde minutos a varias horas, denominadas *memorias de corto termino (MCT)* y aquellas que permiten guardar información por largos períodos, por ejemplo, días, meses, años o incluso toda la vida: las *memorias de largo termino (MLT)* (McGaugh 1966; Gold PE 1975; Izquierdo y Medina 1998; Vianna y col 2000)

La taxonomía actual divide a las MLT en dos grandes grupos: *memorias declarativas* (o explícitas) y *no declarativas* (o implícitas) (Esquema 1). Las primeras comprenden la recolección consciente de eventos ocurridos en un tiempo y lugar específicos, personales (memorias episódicas) como también la información acerca de hechos generales y conocimientos objetivos, como el significado de las palabras, función de los objetos, etc. (memorias semánticas). La recuperación de memorias episódicas comúnmente involucra la experiencia subjetiva de recordar “que”, “como”, “cuando” y “donde”; dada su permanente actualización es altamente sensible al olvido por el pasaje del tiempo y a la interferencia (Allen y Fortin 2013). Las memorias semánticas son más descontextualizadas y no requieren precisar cuándo y cómo aprendimos esa información. En el procesamiento de las memorias declarativas están involucradas las estructuras del lóbulo frontal y fundamentalmente el lóbulo temporal medial (Eichenbaum 2004; Tubidry y Davachi 2011).

El concepto de memorias no declarativas abarca aquellas memorias que no podemos reportar de forma explícita (son inconscientes), cuya evocación ocurre de forma automática, como las habilidades, hábitos, procedimientos y adaptaciones sensoriales. Pueden ser divididas en *asociativas* o *no asociativas*. Las primeras se basan en la adquisición de un nexo predictivo entre un estímulo y evento específico (condicionamientos). Las memorias no asociativas son adquiridas cuando la

exposición reiterada a un estímulo produce un cambio comportamental en la respuesta al mismo, como sucede con la habituación y la sensibilización. En este tipo de memorias participan mayormente el cerebelo y regiones subcorticales como la amígdala, el tálamo y los ganglios de la base (Squire y Zola-Morgan 1988; Yamadori et al 1996; Squire 2004). El condicionamiento constituye la forma más universal de aprendizaje asociativo, y en el caso del condicionamiento clásico o pavloviano, el sujeto no debe realizar ninguna acción. La ocurrencia de un evento es capaz de predecir la aparición de otro y genera entonces la misma respuesta, que se la denomina respuesta condicionada. Por ejemplo, cuando en roedores se aparea un tono con un shock, la simple aparición del tono activará la representación del shock y producirá la respuesta de detención del movimiento o “freezing”. En el condicionamiento operante o instrumental, en cambio, los sujetos aprenden la asociación entre una conducta y un estímulo, es decir una relación entre sus acciones y consecuencias, las cuales pueden ser de recompensa o castigo (Skinner 1938; Dojman 2014).



Esquema 1. Clasificación de las memorias basadas en su tiempo de duración, tipos de información que involucran y estructuras cerebrales implicadas (modificado de Squire 2004).

Consolidando recuerdos

¿A qué se debe la diferencia entre memorias de corto y largo plazo? La formación de una memoria no ocurre de manera instantánea luego de una experiencia, sino que es un proceso que involucra un conjunto de etapas o procesos (Esquema 2). Por definición, comienza con la entrada de la información al encéfalo, pero ¿qué ocurre luego? La hipótesis de perseverancia-consolidación de la memoria (Müller y Pilzercker, 1900) planteó que la formación de una MLT no es un proceso inmediato, sino gradual, y requiere de una fase de estabilización durante la cual la memoria puede ser interrumpida. Este periodo de labilidad constituye la fase de consolidación de la traza mnésica. En estos estudios pioneros, realizados en humanos, los investigadores encontraron que la memoria sobre información recientemente aprendida era anulada por otro aprendizaje experimentado inmediatamente después del original, y sugirieron que las nuevas memorias persisten en un estado frágil, consolidándose a lo largo del tiempo.

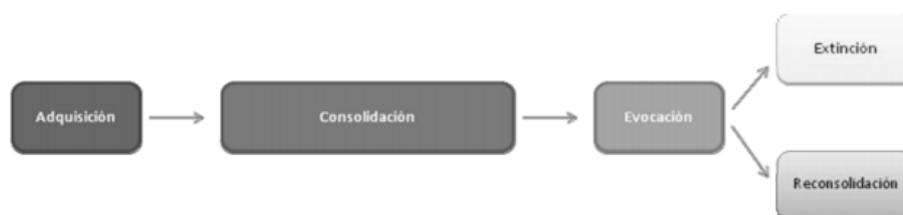
Por otra parte, experimentos posteriores demostraron que la administración de drogas que inhiben la transcripción o la traducción, después de un aprendizaje, impiden la formación de la MLT (Agranoff 1965), aunque no de la MCT (Schafe y col 1999; McGaugh 2000). Esta evidencia sustenta la idea de que la síntesis de nuevos mRNAs y proteínas es necesaria para la consolidación de una MLT (Davis y Squire 1984; Igaz y col 2002; Rossato y col 2007) y que luego del aprendizaje de una tarea pueden formarse memorias de corto o largo plazo, pero con requerimientos diferentes (Izquierdo y Medina 1998).

Como hemos visto, ciertas lesiones cerebrales han inducido amnesias que pueden extenderse varios años atrás del momento de la lesión; por lo tanto, la consolidación que ocurre próxima al momento de adquisición no puede explicar estos sucesos. La consolidación de una memoria implicaría dos procesos diferentes: por un lado el que ocurre durante las primeras horas después del aprendizaje, en conexiones neurales dentro de los circuitos codificadores de la experiencia conductual, llamada *consolidación celular*, y por otro lado una consolidación más lenta que ocurre

con el correr de los días y que tendría relación con una reorganización en la conectividad de estructuras cerebrales, denominada *consolidación de sistemas* (McGaugh 2000; Dudai y Eisenberg 2004; Moscovitch y col 2006; Kandel y col 2014). La consolidación celular implica eventos intracelulares, como cascadas de señalización, actividad de quinasas, transcripción de genes, síntesis de proteínas y cambios plásticos a nivel sináptico que inducirían una MLT. Depende del intercambio de información entre la sinapsis, el soma y el núcleo celular (Squire y Kandel 2000; Dudai 2012). Al estudiar acerca de la modulación de las memorias, a través de la infusión de diferentes drogas en el cerebro post-entrenamiento, McGaugh (2000) logró demostrar un efecto positivo sobre la consolidación celular. Estos resultados dieron origen a la visión actual de la consolidación como una fase de labilidad, en la cual una MLT es susceptible de ser afectada positiva o negativamente por intervenciones externas. Por otro lado, la consolidación de sistemas permitiría la integración de grandes volúmenes de de información, siendo la base de esquemas cognitivos, abstracciones, extracción de regularidades estadísticas, entre otros (Dudai 2002, Nadel 2012).

Finalmente, el proceso de evocación de una MLT, puede dar origen al menos a algunos de estos eventos: la extinción, que implica una disminución en la expresión de la memoria original, debido a la exposición al estímulo no reforzada y que en los hechos se trata de un nuevo aprendizaje (Pavlov 1927); o la reconsolidación, que implica una nueva etapa de consolidación y por lo tanto de labilidad de la memoria, debido a una evocación explícita de la misma (Nader y col 2000; Pedreira y col 2002).

El presente trabajo se enmarca en el estudio de lo que hemos definido como “consolidación celular”, analizándose los procesos que ocurren dentro de una escala temporal de un día luego del entrenamiento en diversas tareas.



Esquema 2. Fases descritas en el procesamiento de la memoria.

¿Cómo se almacena una memoria?

Así como nos hemos preguntado inicialmente donde ocurren los procesos que nos permiten almacenar la información, otro interrogante evidente es ¿cómo se logra eso? Nos cuestionamos cómo codificamos dicha información, cómo se guarda por más o menos tiempo y por cuáles mecanismos podemos volver a evocarla.

Los modelos actuales para explicar cómo las memorias son almacenadas, se basan en cambios estables en la forma de conexión entre las neuronas, que modifican la actividad de circuitos neuronales específicos. Los estudios de Santiago Ramon y Cajal propusieron que el aprendizaje no promueve la proliferación de células nerviosas, sino que incentiva un crecimiento en la arborización y aumenta la fuerza de sus conexiones con otras células nerviosas (Milner y col, 1998).

¿Cuál es entonces el sustrato físico de la memoria? El término engrama, acuñado hace más de cien años, hace referencia a los cambios físicos y químicos duraderos inducidos en las neuronas por el aprendizaje y que codificarán la memoria. La formación de un engrama requiere del reforzamiento de las conexiones sinápticas entre poblaciones de neuronas (ensambles) y presenta las siguientes características (Schacter 2001):

- 1) Está representado por cambios persistentes en el cerebro como resultado de una experiencia o evento específico.
- 2) Puede expresarse comportamentalmente mediante la interacción con pistas que generan su evocación. Es decir, la traza mnesica ó engrama tiene la capacidad de salir de su estado latente y manifestarse comportamentalmente.
- 3) Refleja lo que ocurrió en la codificación y predice lo que puede ser recuperado durante la evocación posterior.
- 4) Puede existir en un estado latente (durmiente) entre los dos procesos activos de codificación y recuperación.

El engrama no se encuentra confinado a una sola región neuronal, sino que más bien está compuesto por una red ampliamente distribuida de ensamblajes neuronales (Josselyn y col 2015). Tampoco es estático. Luego de la codificación, el proceso de consolidación puede alterar la organización física y química de los engramas, modificándolo en termino de fuerza y calidad (Dudai y Eisenberg 2004). ¿Existen células y sinapsis específicas dentro de un circuito particular que participan durante el aprendizaje, o esto ocurre al azar? Al proceso que determina cuáles son las neuronas y las sinapsis que se encargarán de guardar una determinada memoria se lo conoce como “*memory allocation*” (Silva y col 2009): asignación o distribución de la memoria. La asignación neuronal (*neural allocation*) es un fenómeno presente en la formación de la memoria, recientemente descubierto, que explica cómo neuronas específicas en una red son comprometidas con el almacenamiento de una memoria específica. Este fenómeno se haya estrechamente relacionado con los mecanismos de asignación sináptica que determinan cómo la información es repartida en sinapsis específicas (Rogerson y col 2014). Estudios iniciales de *memory allocation* utilizando vectores virales demostraron que un cambio en los niveles del elemento de unión de respuesta a AMPc (CREB), dentro de una subpoblación específica de neuronas de la amígdala lateral (AL), afecta la probabilidad de que estas neuronas sean reclutadas en una memoria de miedo auditiva: el aumento de los niveles de CREB aumenta la probabilidad de que estas neuronas sean involucradas en este condicionamiento, mientras que la disminución de los niveles de este factor de transcripción tiene el efecto contrario (Han y col 2007, 2009; Zhou y col 2009). Estos mismos resultados fueron obtenidos también durante la codificación de la memoria de aversión al gusto (Sano y col 2014), en condicionamientos de preferencia de lugar con cocaína (Hsiang y col 2014), y durante la codificación de una memoria de miedo contextual (Sekeres y col 2012). Estudios posteriores demostraron que las neuronas con una mayor actividad de CREB pueden haber sido asignadas preferentemente porque eran más excitables que sus vecinas (Zhou y col 2009; Sekeres y col 2012; Yiu y col 2014). Entonces, otros mecanismos que afecten la excitabilidad neuronal también podrían afectar la asignación neuronal. Una hipótesis tentadora, propuesta en el trabajo de Rogerson y col (2014), es que los mecanismos implicados en la consolidación de una memoria también pueden provocar cambios en

la excitabilidad de las neuronas involucradas en su almacenamiento, de modo que durante un tiempo son más propensas a involucrarse también en el almacenamiento de memorias posteriores. De esta manera la *memory allocation* funcionaría como un vínculo entre dos memorias que se forman dentro de un determinado intervalo temporal: el primer evento de formación de una memoria activa CREB en una subpoblación de neuronas, la cual conduce a un aumento de su excitabilidad; ello desvía el almacenamiento de la memoria de un segundo evento hacia muchas de las mismas neuronas que almacenan el primero. Este mecanismo permitiría que se recluten en una misma neurona la codificación de memorias tanto de eventos débiles como mas salientes, permitiendo así que tengan lugar procesos como los de etiquetado sináptico y captura de proteínas y el etiquetado conductual, discutidos a continuación (Rogerson y col 2014).

De la plasticidad sináptica a la memoria

Los cambios en la fuerza de conexión entre las neuronas se asumen como el mecanismo por el cual las trazas de memoria se codifican y almacenan. Algunos patrones de actividad sináptica en el cerebro producen un aumento o disminución duradero/a en la eficacia sináptica, conocido como potenciación de largo término (LTP, en ingles) o depresión de largo término (LTD) respectivamente. Estos fenómenos son considerados como un mecanismo neuronal subyacente al almacenamiento de ciertas memorias, ya que existe un gran paralelismo entre los procesos de LTP/LTD y los procesos de formación de una memoria (Martin y Morris 2002; Izquierdo y col 2006). Del mismo modo que existen memorias de corto y largo plazo, es posible inducir una potenciación o una depresión de corto plazo o temprana (e-LTP/e-LTD), independiente de transcripción y traducción, y otra de largo plazo o tardía (l-LTP/l-LTD), dependiente de transcripción génica y de síntesis de nuevas proteínas relacionadas con la plasticidad (PRPs) (Malenka y col 1999). El hecho de que la plasticidad sináptica y los procesos de memoria compartan gran parte de la mecánica y el bloqueo de la maquinaria

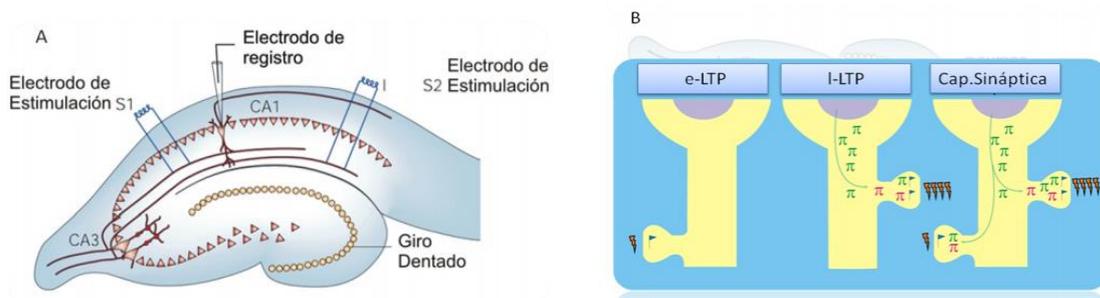
molecular que impide el establecimiento de cambios plásticos impida el establecimiento de memorias de largo plazo, avalan fuertemente la idea de que los cambios plásticos en las sinapsis son el sustrato de ciertas memorias (Bourtchouladze y col 1994; Guzowski y McGaugh 1997; Silva y col 1998; Taubenfeld y col 1999; Kandel 2001).

De hecho, para darle mayor sustento experimental a esta hipótesis, distintos trabajos han mostrado evidencias de cambios plásticos propios del LTP in vivo luego de un aprendizaje espacial (Fedulov y col 2007; Chen y col 2007), en el aprendizaje de paradigmas aversivo-gustativo, aversivo-contextual y espacial asociativo (Costa-Mattioli y col 2008) y también en paradigmas de condicionamiento aversivo (Whitlock 2006). Mas actualmente, se reportó un fenómeno similar registrado in vivo unas horas después del aprendizaje de la tarea de reconocimiento de objetos (Clarke y col 2010).

La *“hipótesis de plasticidad sináptica y memoria”* establece que esta plasticidad ocurre en sinapsis apropiadas durante la formación de la memoria y que esto es suficiente y necesario para el almacenamiento de la información que subyace al tipo de memoria, mediada por el área cerebral en la cual aquella plasticidad es observada (Martin y col 2000). Entonces, que se produzcan cambios sinápticos específicos sin duda aumenta la capacidad de almacenamiento del sistema nervioso, pero conlleva a tener que resolver la especificidad del proceso, ¿cómo se establecen los cambios solo en las sinapsis apropiadas? En 1997 Frey y Morris intentaron dar respuesta a este interrogante y postularon la hipótesis del *“Etiquetado Sináptico y Captura”* (STC), proponiendo que los productos de la expresión génica son distribuidos a lo largo de la neurona, pero que su función relacionada con la fuerza sináptica ocurre solamente en aquellas sinapsis *“etiquetadas”* por una activación previa, debido a alguna estimulación. El rol de esta etiqueta es el de capturar PRPs necesarias para establecer un cambio duradero en la fuerza sináptica. Los primeros experimentos para evaluar esta hipótesis utilizaron rodajas de hipocampo y la estimulación diferencial de dos vías, S1 y S2, convergentes sobre el mismo sustrato neuronal en la región CA1 hipocampal (Esquema 3). Una estimulación de alta frecuencia suave en cualquiera de las dos vías, o en ambas, fue capaz de generar únicamente un e-LTP. La tetanización fuerte y repetida, en cambio, fue capaz de inducir un I-LTP en la vía estimulada.

Lo llamativo fue que al estimular la vía S1 con una estimulación fuerte una hora antes o después de una estimulación suave en la vía S2, se logró inducir un I-LTP en ambas vías. Esta conversión de LTP temprano en tardío mostró dependencia de la síntesis de PRPs inducida por el estímulo fuerte, ya que el bloqueo impidió la persistencia de la potenciación. Un efecto similar fue observado en cultivo de neuronas de *Aplysia* (Martin y col 1997). Y más interesante aun, el mismo fenómeno se ha comprobado *in vivo*. En un experimento realizado en ratas (Shires y col 2012), un e-LTP inducido por una tetanización débil en la región CA1 del hipocampo pudo ser convertido en I-LTP al realizarse una estimulación tetánica fuerte de una vía independiente. Es decir que estímulos suaves combinados con los fuertes son potencialmente capaces de inducir cambios duraderos siempre y cuando las etiquetas sinápticas que generen interacciones con las PRPs necesarias para estabilizar dichos cambios. Estos modelos determinan que existe un período de tiempo acotado en el cual un estímulo fuerte sobre una de las vías puede promover la formación de una potenciación duradera en la otra vía. La ventana temporal se debe a la duración de la etiqueta sináptica y la cinética de la síntesis y distribución de las PRPs, como de la vida media de éstas en la célula; debe haber una convergencia espacio-temporal entre dichos fenómenos y es indistinto el orden en que son desencadenados (Frey y Morris 1998; Martin y Kosik 2002).

En los últimos años, una serie de trabajos han combinado la inducción de LTP con intervenciones conductuales. Ha sido demostrado que, en el hipocampo de ratas, la e-LTP se puede promover a I-LTP por la exposición a un ambiente novedoso (Li y col 2003; Davis y col 2004). Este efecto facilitador se presenta en una ventana de tiempo acotada y no ocurre si el contexto es familiar. Se postuló entonces que las PRPs, sintetizadas bajo la influencia de la novedad, pueden reforzar la e-LTP por un mecanismo semejante al "etiquetado sináptico". En este sentido, el reforzamiento inducido por la novedad es bloqueado por la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas previo a la exploración del ambiente novedoso (Straube y col 2003). En otro trabajo, un LTP hipocampal pudo ser reforzado por un entrenamiento en el holeboard (Uzakov y col 2005), donde los autores postulan que la síntesis de nuevas proteínas necesarias para la formación de esa memoria espacial contribuye al mantenimiento del I-LTP.



Esquema 3. “Etiquetado sináptico y captura”. A) Localización de los electrodos de estimulación y registro en un corte de hipocampo B). Esquema de la activación sináptica y los procesos de potenciación utilizando la hipótesis de "etiquetado sináptico y captura". En el caso señalado como “Cap. Sináptica” ambos contactos sinápticos establecerán I-LPT.

Con ustedes, la hipótesis del etiquetado conductual

Nuestro grupo de trabajo lleva más de una década investigando si un análogo de la teoría de STC ocurre en modelos de aprendizaje. Nos preguntamos si es posible formar una MLT de una experiencia que normalmente habría producido una MCT, si es acoplada con otro evento que induce la síntesis de proteínas en la misma población neuronal. El protocolo típico para responder esta pregunta se basa en una sesión de aprendizaje débil que no induce MLT, pero pensamos puede establecer una etiqueta, que utilizará las PRPs proporcionados por un evento fuerte, para la consolidación de la memoria de la experiencia débil. Así, demostramos que la combinación de un entrenamiento débil en EI, que genera memoria de corto pero no de largo término, con la exposición a un campo abierto novedoso es capaz de promover la MLT de EI (Moncada y Viola 2007). Ello solo se observa si ambos paradigmas se desarrollan dentro de una ventana crítica de tiempo, sin importar el orden de los eventos. Al igual que los experimentos de Frey y Morris el efecto de la novedad sobre la memoria de EI es simétrico y acotado. Además, la inducción de MLT de EI puede ser bloqueada con un inhibidor de síntesis proteica, evidenciando que la síntesis de PRPs debido a la exposición al

campo abierto es necesaria para promover el establecimiento de la MCT en una MLT (Moncada y Viola 2007). Esto sugiere una analogía comportamental del “etiquetado sináptico y captura”, ocurriendo in vivo y se ha denominado a este proceso etiquetado conductual (EC).

En trabajos posteriores realizados en el laboratorio fue observado que las proteínas provistas por la exposición a un campo abierto novedoso promueven la MLT no solo para el paradigma de EI, sino de diferentes tareas de aprendizaje (Ballarini y col 2009, Moncada y col 2011). Y no solo la exposición a un campo abierto, sino que otras experiencias se describieron como eventos proveedores de proteínas, que promueven recuerdos de otras tareas; por ejemplo la exploración de objetos en un contexto novedoso, probar un nuevo sabor, una sesión en el laberinto acuático de Morris, una exposición en el paradigma de condicionamiento de miedo contextual que actúe como un recordatorio de un evento previo o también una tarea recompensada en el paradigma de laberinto en T (Ballarini y col, 2009; Wang y col 2010; Dong y col 2012; Cassini y col 2013; Salvetti y col, 2014). Incluso, investigaciones sugieren la existencia de un proceso como el EC operando en la formación de MLTs en humanos. Usando aproximaciones similares a las mencionadas, nuestro grupo de trabajo analizó en estudiantes la memoria para actividades graficas o literarias al ser combinadas con experiencias novedosas (Ballarini y col 2013). Los resultados indicaron que aquellos grupos de estudiantes que tuvieron la posibilidad de asistir a una lección novedosa sobre ciencia o música presentaron importantes mejoras en la MLT para cualquiera de las actividades. El efecto fue observado cuando la situación de novedad se presentó una sola vez y no en más ocasiones (es decir cuando se tornó familiar), sea antes o después de la actividad grafica o la literaria, lo cual refleja que ello sucede dentro de una ventana de tiempo acotada. En concordancia con estos resultados, Schomaker y colaboradores (2014) expusieron, en una tarea de aprendizaje de palabras, que cuando las personas atravesaron previamente la exploración virtual de un ambiente novedoso, este evento mejoró la memoria de las palabras durante la fase de evocación. El trabajo de Dunsmoor y colaboradores (2015), por otro lado, apoya también un mecanismo de EC operando en humanos, al mostrar que una experiencia saliente asociada con un aprendizaje débil mejora la MLT. En este estudio realizado con adultos, los individuos fueron expuestos a imágenes de dos categorías y luego

un shock fue pareado con imágenes pertenecientes a una de las categorías en particular; un nuevo set de imágenes fue mostrado y 24 hs después el test reveló una mejor memoria, selectivamente, para las imágenes de la misma categoría que aquellas pareadas con el shock. Mediante este condicionamiento observaron que eventos significativos pueden preservar selectivamente la memoria de información que parecía insignificante en el momento en que se codificó, y que requiere un periodo de consolidación.

Como hemos visto a partir de trabajos de nuestro propio laboratorio como el de otros grupos, tanto la novedad como otros eventos, son capaces de promover la formación de gran cantidad de memorias que de otra forma no existirían, al proveer las PRPs necesarias para la consolidación. El proceso de EC encuentra apoyo en paradigmas de memorias aversivas y no aversivas, condicionamientos clásico y operante, tareas de reconocimientos espacial, en memorias dependientes de hipocampo y cortezas, y en estudios no solo hecho en modelos murinos sino también en humanos, lo que sugiere fuertemente que el EC es un mecanismo de formación de MLTs (para una revisión detallada ver Moncada y col 2015).

Juego de palabras: ABC para el EC

La investigación realizada sobre las MLTs nos ha permitido postular la hipótesis del EC y ampliar los conocimientos sobre posibles mecanismos neurales que favorecen su formación. Principal fundamento de esta hipótesis son los siguientes principios:

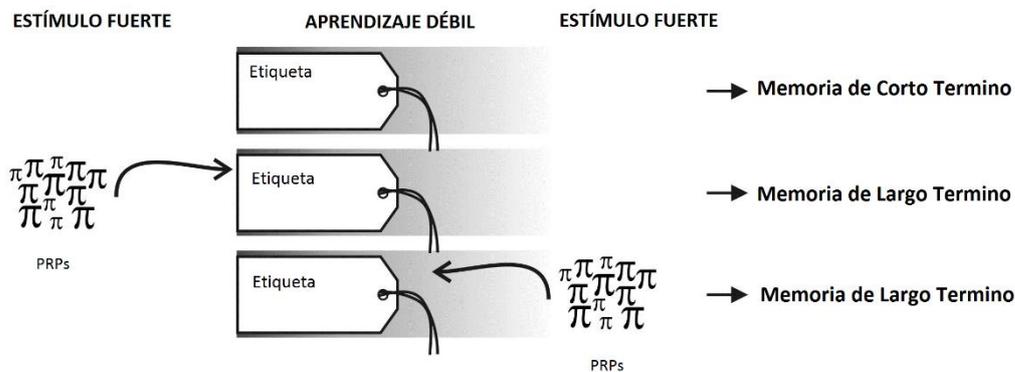
- A) El aprendizaje débil induce tanto MCT como etiquetas capaces de capturar PRPs. Un estímulo fuerte e independiente, pero satélite al débil, induce síntesis de las PRPs. Su captura por las etiquetas permite los procesos de plasticidad duraderos (MLT) selectivamente en los inputs activados por el aprendizaje débil (Esquema 4)

B) Tanto la etiqueta como las PRPs tienen una duración transitoria.

C) Con el fin de capturar los productos, etiquetas y PRPs debe estar presente en el mismo sustrato neural y al mismo tiempo.

A partir de estos tres postulados clave, emergen tres predicciones principales:

1. Los inhibidores de la síntesis proteica deben poner en peligro el mecanismo de EC
2. Si las PRPs llegan cuando la etiqueta ya ha caído, el mecanismo de captura no debería funcionar.
3. Si las PRPs se sintetizan y se entregaron lejos del punto en el que las etiquetas fueron (o serán) establecidas, el mecanismo de la captura no podría ocurrir.



Esquema 4. Proceso de etiquetado y captura. Una tarea de aprendizaje débil que solo induce MCT genera una etiqueta. Por otro lado, otra experiencia de mayor saliencia induce la síntesis de proteínas. Si ambas tareas son procesadas en las mismas estructuras cerebrales y dentro de una ventana de tiempo acotada, las etiquetas del aprendizaje débil pueden capturar las PRPs y de esta forma consolidar la memoria duradera de esta experiencia.

Etiquetas y PRPs... ¿Quién es quién?

De acuerdo con la hipótesis del EC, podemos pensar la etiqueta como un conjunto de procesos y cambios locales esenciales para que, en caso de acceder a las PRPs, la información de una experiencia se almacene en dichos sustratos. Cualquier evento proveedor de PRPs permitirá la formación de la MLT en aquellos lugares donde la etiqueta se mantenga intacta, pero si alguna intervención es capaz de interrumpir el establecimiento o mantenimiento de la etiqueta, generará

amnesia. Considerando estas premisas, diferentes protocolos pueden llevarse a cabo para evaluar el rol de algunas moléculas en la etiqueta y/o como inductores de la síntesis de PRPs. Por ejemplo, si se combina un entrenamiento débil, capaz de generar una etiqueta del aprendizaje, con eventos lo suficientemente salientes que sintetizan las PRPs, podemos identificar aquellos mecanismos relacionados con la etiqueta aplicando fármacos en tiempos circundantes al entrenamiento débil, o con la síntesis de PRPs, al aplicar inhibidores en momentos cercanos al evento fuerte. Si se genera amnesia por escasez en la síntesis de proteínas, esperaríamos que un segundo evento dador de PRPs revierta la amnesia. Por otro lado, la administración de drogas cerca del evento débil puede interferir con la etiqueta y generar amnesia también, y en ese caso la provisión de PRPs no podrá prevenirla ni revertirla. Una alternativa adicional es estudiar situaciones de aprendizaje fuerte, que llevan a la consolidación de una MLT; por lo tanto no solo establecen la etiqueta sino que disparan las síntesis de PRPs. La infusión de drogas próxima a este momento puede interferir con cualquiera de los dos procesos, pero si un segundo evento es capaz de proveer nuevas PRPs y aún existen casos de amnesia, posiblemente sea que tengan un efecto perjudicial sobre la etiqueta conductual.

Sea que estén involucrados actores iguales o diferentes en el establecimiento de una etiqueta de aprendizaje y la síntesis de PRPs, una maquinaria de receptores, segundos mensajeros y proteínas estructurales apuntan a ser parte de los mecanismos celulares capaces de sostener estos procesos.

El enfoque más actual considera la etiqueta como un ensamble de moléculas que tienden a modificar la morfología de la dendrita (Martin y Kosik 2002; Frey y Frey 2008; Ramachandran y Frey 2009; Redondo y Morris 2011). ¿Cuáles podrían ser los componentes? De acuerdo a experimentos de plasticidad sináptica como de aprendizaje y memoria, dos características resultan importantes de la etiqueta: su establecimiento es independiente de síntesis proteica y su duración es transiente (Frey y Morris 1997, Sajikumar 2007, Moncada 2011, Viola 2014). Las quinasas resultan targeus interesantes debido tanto a su rápida activación como su velocidad para modificar la respuesta de receptores y la morfología estructural; α CAMKII, PKA, and ERK 1/2 son candidatos muy adecuados dado su papel bien estudiado en la formación de MLTs (McGaugh 2000; Izquierdo y col 2006; Medina y Viola 2018). Su rol fue evaluado en tareas de EI y los resultados sugieren que α CAMKII y PKA, junto

con PKMz, pero no las ERK 1/2, tienen un rol esencial en el establecimiento de la etiqueta conductual (Moncada 2011). Sin embargo, las ERK 1/2 podrían ser específicamente requeridas para el establecimiento de etiquetas sinápticas asociadas a procesos de LTD (Navakkode y col 2005; Sajikumar y col 2007). Por supuesto, diferentes experiencias y aprendizajes pueden involucrar diferentes mediadores. Otro cuerpo de datos acerca de la maquinaria de etiquetado proviene de experimentos que estudian el papel del receptor de BDNF, TrkB. Ensayos realizados con paradigmas de EI y otros de electrofisiología in vitro (Lu y col 2011) lo postulan como un potencial componente de la etiqueta sináptica y del aprendizaje.

En general todos los componentes propuestos como parte de la maquinaria de etiquetado en los mecanismos de EC son consistentes con aquellos identificados en los modelos electrofisiológicos del etiquetado sináptico (Sajikumar y col 2005, 2007; Redondo y col 2010).

En cuanto a las PRPs ¿Cuáles podrían estar involucradas? Una de las candidatas más firmes es la proteína asociada al citoesqueleto Arc, cuyo gen se activa luego de la estimulación tanto a nivel de LTP como de muchos tipos de aprendizaje (Barco y col 2008; Bramham y col 2010). Ha sido demostrado que participa en la formación y consolidación de diversos tipos de memorias, procesadas en distintas regiones del cerebro y que dependen de estímulos de modalidad variada. Mediante su interacción con las proteínas que modifican la estructura del citoesqueleto en las terminales dendríticas, Arc forma parte de los procesos de plasticidad sináptica (Tzingounis y Nicoll 2006; Bramham y col 2010; Wibrand et al. 2012). Un experimento interesante ha permitido observar efectos deletéreos en la promoción de la memoria de EI al limitar con un mRNA antisense la cantidad disponible de Arc, inducida por la exploración a un ambiente novedoso, lo cual sugiere a Arc como una de las PRPs necesarias para promocionar la MLT de EI (Martínez et al. 2012).

Otras proteínas candidatas como PRPs son CREB y BDNF, justamente río abajo de cascadas de señalización que involucran moléculas como PKA (propuesta como parte de la etiqueta), claves en procesos de plasticidad neuronal e involucradas en la consolidación de distintas memorias (Bourtchuladze y col 1994; Josselyn y col 2001; Lee y col 2004; Barco y col 2008; Bekinschtein y col 2013).

Diversos estudios en los que un evento novedoso genera promoción de MLTs como dador de PRP han apoyado la participación de los receptores de dopamina D1/D5 o beta-adrenérgicos, en la inducción de las PRPs (Moncada 2015). En contraste, el estudio de receptores de glutamato del tipo NMDA (NMDAR) en la tarea de EI ha demostrado que son requeridos tanto para el etiquetado como para los procesos que llevan a la traducción de proteínas (Moncada 2011).

Alien vs Depredador: la competencia de las memorias

La interacción entre dos tareas conductuales no siempre deja como resultado la promoción de la memoria. Como hemos visto en los estudios de Muller y Pilzecker realizados en humanos, la memoria del aprendizaje de una nueva información puede ser interrumpida por el aprendizaje de otra posterior, y esto incluso fue lo que ellos postularon que sería la base del olvido en las tareas cotidianas. Podemos pensar que la capacidad de almacenamiento del cerebro es limitada en cuanto a plasticidad, número de conexiones sinápticas o PRPs. Bajo la hipótesis del EC hemos descrito que la utilización de los recursos proteicos lleva a la estabilización de las memorias, pero el marco conceptual de esta hipótesis también contempla que haya competencia entre dos trazas mnésicas para su consolidación, cuando los recursos proteicos son limitados y/o se “disputan” entre las terminales sinápticas activadas. Hallazgos recientes (Fonseca 2004; Govindarajan 2011) proveen evidencias a favor de la existencia de competencia por PRPs entre sinapsis activadas. ¿Habría un mecanismo similar a nivel conductual? Basado en esta idea, nuestro grupo de trabajo demostró que un entrenamiento suave de EI genera interferencia sobre la formación de la MLT de exploración a un CA, experimentado anteriormente; de forma paralela, la MLT de la tarea aversiva fue promovida en forma dependiente de la síntesis proteica inducida por el CA (Martinez y col 2012). Estos experimentos sugirieron que, bajo síntesis limitada de proteínas, ya que las PRPs en este caso solo

fueron inducidas por el CA, la MLT de una tarea se forma en detrimento de la otra, y proveen la primera evidencia de los eventos moleculares subyacentes.

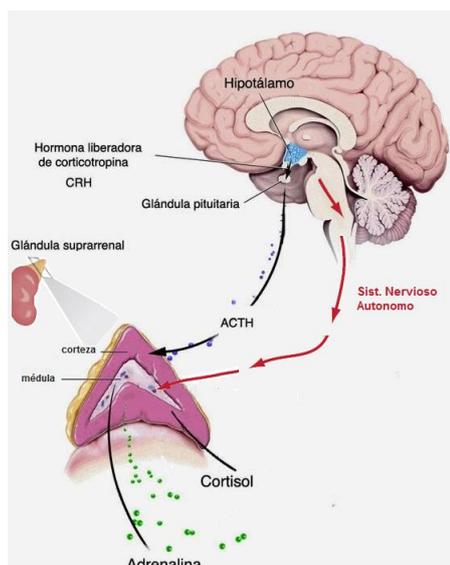
Trabajos más recientes realizados en nuestro laboratorio han analizado los mecanismos celulares de procesos de interferencia retrógrada utilizando los paradigmas de reconocimiento de objeto novedoso y de objeto en contexto, en ratas. En estos experimentos se combinaron dos entrenamientos fuertes en estas tareas y se observó que cuando dos trazas de memoria están siendo procesadas, la segunda interfiere con la consolidación de la primera. Los resultados sugieren competencia por los recursos proteicos que ambas trazas de memorias necesitan para consolidarse, requiriéndose además actividad del hipocampo dorsal y la corteza medial prefrontal (Martinez y col 2014; Villar y col 2016).

¿De qué hablamos cuando hablamos de estrés?

Queda claro que la duración de las memorias no depende únicamente del evento de aprendizaje y revela la trascendencia de otros sucesos circundantes en el almacenamiento de una traza mnésica (Moncada y Viola 2007, Ballarini y col 2009). Teniendo en cuenta el consenso en la literatura acerca de los efectos moduladores del estrés sobre las funciones cognitivas en general (McEwen and Sapolsky 1995; de Kloet y col 1999; Fuchs y col 2006), y particularmente los procesos de aprendizaje y memoria (Cahill y McGaugh 1996; Buchanan y Lovallo 2001, Roozendaal 2002; Joëls y col 2006; McGaugh 2013; Lalumiere y col 2017), consideramos que un evento estresante puede influenciar la formación de memorias a través de un proceso de etiquetado conductual. Postulamos que el estrés es capaz de promover la formación de una MLT a partir de una situación de aprendizaje débil, al proveer las PRPs necesarias, pero creemos también que puede perjudicar formación de una memoria duradera inducida por un evento de aprendizaje fuerte, al competir por ellas. En esta tesis se testearon estos supuestos.

¿Pero que entendemos por estrés? El término se utiliza para referirse a los cambios fisiológicos y psicológicos que experimentamos frente a estímulos, externos o internos, que alteran la homeostasis. Al sentir estos estímulos o interpretar eventos como circunstancias adversas, amenazantes, demandantes, o que representan un desafío físico o cognitivo, una batería de cambios se producen en el organismo a favor de adoptar el comportamiento más relevante para tal situación (de Kloet y col 1999; Ness y Calabrese 2016). Es una experiencia subjetiva, porque iguales eventos no son percibidos igual por diferentes individuos.

Si una situación es percibida estresante, neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo sintetizan la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), que genera liberación de adenocorticotrofina (ACTH) desde la hipófisis (o glándula pituitaria) al torrente sanguíneo. La ACTH actúa sobre la glándula adrenal e induce la liberación de glucocorticoides (GC) desde la corteza suprarrenal (Esquema 5). Además de la activación de este eje, denominado HPA, es crucial la activación del sistema nervioso autónomo, que a diferencia del primero dispara una respuesta más rápida, permitiendo la liberación de adrenalina y noradrenalina desde la medula de la glándula suprarrenal, cuya acción periférica estimula indirectamente la producción de las mismas catecolaminas en el sistema nervioso central (Rodrigues y col 2009; Ness y Calabrese 2016). Los GC y catecolaminas alteran la función de muchos tejidos con el fin de movilizar energía y satisfacer las demandas que el evento estresante genera. Aumentan la frecuencia cardíaca y respiratoria, la presión arterial, movilizan la energía almacenada principalmente hacia las extremidades y el cerebro y generan inhibición de procesos costosos como la digestión y la reproducción. Además influyen en variados circuitos neuronales, donde se encuentran numerosos receptores para estas sustancias (Prager y Johnson 2009). Incluso otras hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos son liberados luego de experiencias estresantes, lo que ayuda a los organismos a adaptarse exitosamente frente al estresor y recuperar la homeostasis (McIntyre y col 2012).



Esquema 5. Eje Hipotálamo- Pituitaria- Adrenal y activación simpática en respuesta a situaciones de estrés.

Los receptores de glucocorticoides en el SNC

Las propiedades lipofílicas de los GC permiten que éstos atraviesen la membrana plasmática de las células y se unan a receptores intracelulares alojados en el citosol. Los GC se acoplan a receptores de mineralocorticoides (MR) o de glucocorticoides propiamente dichos (GR), siendo la afinidad por los MRs diez veces mayor que para los GRs (de Kloet 2005). Estos receptores son homólogos en sus dominios estructurales y poseen un sitio de unión al ADN. En presencia del ligando, sufren cambios conformacionales que los disocian de proteínas chaperonas, homodimerizan y pueden translocarse al núcleo; allí se unen a secuencias específicas de ADN en el sitio promotor de varios genes, activando o reprimiendo su transcripción, o interactúan con otros factores de transcripción, controlando así la expresión génica (Beato y Sánchez-Pacheco 1996; Sandi 2004; Datson y col 2008; Zalachoras y col 2013). La unión de los GC a estos receptores regula la transcripción de genes relacionados a transducción de señales, receptores sinápticos (como el receptor glutamatérgico AMPA) y también modifica la expresión de proteínas relacionadas con la morfología de la neurona (Groc y col 2008;

Harrel y col 2004). De esta manera, los GC pueden directamente tener efectos sobre la plasticidad estructural y la plasticidad sináptica a través de mecanismos genómicos.

Sumado a los receptores intracelulares, existen MRs and GRs localizados en la membrana (mMRs y mGRs). Estos pueden afectar la expresión de ciertos genes a través de complejos, río abajo, que incluyen proteínas G y quinasas como ERK y JNK (Li y col 2001; Qiu t col 2001) Pero también pueden, rápidamente y a través de mecanismos genómico-independientes, modular otros procesos; por ejemplo, los GC unidos a estos receptores aumentan la liberación presináptica de glutamato en amígdala, hipocampo y corteza prefrontal y modulan el tráfico de las subunidades del receptor AMPA (AMPA) en la post-sinapsis, lo que lleva a un aumento en la frecuencia de corrientes postsinápticas excitatorias miniatura (Finsterwald y Alberini 2014). Afectando la conductancia de canales de iones específicos, los mMRs y mGRs pueden mediar efectos en la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal, y también regular la plasticidad, por ejemplo, alterando la cantidad de calcio presente en las sinapsis, lo que podría determinar si se produce un LTP (Tasker y col 2006; Prager y Johnson 2009, Groeneweg y col 2011; Sarabdjitsingh y col 2012).

Estrés: un modulador potente de los recuerdos

Si uno revisa la literatura, puede encontrarse con una gran variabilidad de efectos del estrés sobre los procesos de memoria. Sin embargo, con el foco en distintos factores explicativos, varios autores nos permiten actualmente generar una visión más clara e integradora sobre su interacción. Por ejemplo, gran parte de esa variabilidad puede ser explicada por la intensidad del estresor, y el enfoque más aceptado es que los niveles de estrés (o de las hormonas liberadas) inducen un efecto de U invertida dosis-dependiente en relación con el aprendizaje, la memoria y la plasticidad (de Kloet y col 1999; Joels 2006; Andreano y Cahill 2006; Finsterwald y Alberini 2014). Un segundo factor relevante es la duración del evento de estrés, observándose distintos efectos ante un estrés puntual

que tiene lugar por poco tiempo en contraposición a situaciones estresantes repetitivas (estrés crónico), que suelen contribuir al desarrollo de patologías. Estas diferencias no solo son a nivel cognitivo, sino que también afectan la estructura y función del cerebro (Sandi y Loscertales 1999; S. Pinnock y Herbert 2001). Un tercer factor es la fase de la memoria en la cual el evento estresante se presenta, teniendo en general efectos opuestos durante la consolidación y la evocación (de Quervain 2000; Roozendaal 2002; Abercrombie 2003; Kuhlmann y col 2005; Joëls 2011). Por otro lado, factores como la controlabilidad y predictibilidad de los estresores, median el impacto psicofisiológico del estrés (Mineka y Hendersen 1985; Maier y Watkins 2005). Otro elemento que debemos tomar en cuenta son diferencias propias entre individuos, como la edad o el sexo, por ejemplo, que parecen ser importantes moduladores de la interacción estrés-memoria (Shors 2004; Joëls y Baram 2009). Para entender como el estrés afecta los procesos cognitivos, es importante también el contexto en el cual el estrés es experimentado, es decir cuál es la información particular procesada. En general el estrés facilita la memoria para material con saliencia emocional o para aquel con el cual esta relacionado, respecto a información con contenido neutral (Sandi 1998; de Kloet y col 1999; Joëls y col 2006; Payne 2006; Dunsmoor y col 2015). Finalmente, el tipo de estresor influenciará la población de neuronas y la clase de mediadores que participarán en la respuesta adaptativa de estrés; estresores físicos como la pérdida de sangre rápidamente reclutan regiones hipotalámicas y del tronco cerebral, mientras que estresores psicológicos como los exámenes principalmente involucran regiones del cerebro vinculadas a la emoción (amígdala) el aprendizaje y la memoria (el hipocampo) y la toma de decisiones (corteza prefrontal) (Joëls y Baram 2009).

La mayoría de los trabajos de investigación en roedores estudian los efectos ocasionados por los GC y se ha observado que la administración de corticosterona intraperitoneal aumenta la MLT de algunas memorias aversivas y espaciales (Sandi y col 1997; Okuda y col 2004; Abrari y col, 2009; Mc Reynolds y col 2010). La administración local en el hipocampo de ratas de agonistas o antagonistas de los GR, por otro lado, ha demostrado modular la MLT de evitación inhibitoria y del laberinto acuático de Morris (Roozendaal y McGaugh 1997; Roozendaal y col 1999). Esta reportado que las neuronas del hipocampo de ratas expresan altos niveles de receptores para corticosteroides

adrenales, como los MR y GR, los cuales ejercen efectos transcripcionales; incluso han sido identificados los genes que responden a ellos en el hipocampo (Datson y col 2001, Prager y Johnson 2009). También se ha reportado que la actividad de los receptores de glucocorticoides de membrana en el hipocampo media la acetilación de la cromatina, lo cual sería una marca epigenética para el mantenimiento de los procesos transcripcionales (Roozendaal y col, 2010). Resulta entonces posible que el hipocampo responda al estrés directamente mediante la activación de dichos receptores aumentando la síntesis de proteínas.

Los GC y la adrenalina liberados en respuesta al estrés actúan también sobre el complejo basolateral de la amígdala (BLA) aumentando la señalización noradrenérgica y afectando positivamente la etapa de consolidación (Roozendaal y col 2008; McReynolds y col 2010; Atsak y col 2015). La activación o el bloqueo farmacológico de la BLA modula la consolidación de diferentes clases de memorias a través de la interacción con otras regiones del cerebro (McGaugh 2004; McIntyre y col 2005; Roozendaal 2009; McReynolds y col 2014). La hipótesis de “etiquetado emocional”, introducida por Richter-Levin y Akirav (2003), caracteriza la relevancia de factores afectivos en la determinación de procesos mnésicos. Con su foco en la activación de la amígdala, demuestra la modulación de la plasticidad neuronal en otras regiones cerebrales involucradas en la formación de memorias emocionales.

En otros estudios, la presencia de un estrés agudo, como por ejemplo la restricción por inmovilización o un shock, generalmente facilita la consolidación de la memoria adquirida; ello se ha observado con distintos paradigmas de aprendizaje y memoria (Cordero y col, 2003; Rodríguez Manzanares y col 2005; Sandi y Pinelo-Nava, 2007; Maldonado y col 2011; Uysal y col 2012). Sin embargo algunos trabajos han obtenido los resultados opuestos (Inoue y col 2018, Yu y col 2018).

Evidencia adicional sobre el rol de los glucocorticoides deriva de estudios farmacológicos en humanos. La administración de cortisol previa a un aprendizaje sobre un repertorio de imágenes, mostro reforzar la memoria gráfica, especialmente para aquellas imágenes con contenido emocional (Buchanan y Lovallo 2001); interesantemente, esta ventaja en la memoria mostró ser dependiente de noradrenalina, al ser prevenida por la administración de un beta-bloqueante (Cahill y col 1994).

En otros estudios, la administración oral de cortisol en tiempos cercanos al aprendizaje mejoró la memoria tanto de información neutra como de aquella con saliencia emocional (Abercrombie y col 2003), mientras la inhibición de la síntesis de GC redujó la MLT para estas memorias (Lupien y col 2002; Maheu y col 2004).

Nielson y Arentsen (2012), por otro lado, examinaron los efectos de un estrés moderado generado por la visualización de un video, sobre una lectura realizada previamente al mismo o sobre aquellas realizadas los días anterior o posterior. Los autores demostraron una mejora en la MLT de las personas que visualizaron el video estresante (respecto a los controles), específicamente para la información que habían aprendido previa a dicho video. Incluso, un trabajo realizado por Steidl y colaboradores reveló la influencia de una circunstancia estresante en memorias procedurales; la presencia de imágenes con contenido emocional durante un aprendizaje implícito permitió conservar la habilidad aprendida por mayor tiempo que para las situaciones control, reflejando la importancia de sucesos estresantes sobre memorias tanto declarativas como no declarativas. También se ha estudiado el efecto del estrés sobre la reconsolidación de la memoria en humanos y mientras algunos trabajos proponen que el estresor tiene efectos positivos sobre la misma (Cocoz 2011; Finn y Roediger 2011) otros han encontrado distintos resultados (Cai y col 2006; Wang y col), requiriéndose mayor investigación.

Estudios sobre la interacción estrés-memoria en ámbitos educacionales han sido integrados recientemente por Vogel y Schwabe (2016). En este trabajo se toman en consideración los efectos del estrés sobre la consolidación, evocación y actualización (reconsolidación) de la información, como la predominancia de estos efectos cuando el material aprendido tiene valencia emocional. Nuestro grupo de trabajo tiene especial interés en entender como distintos eventos pueden modular los aprendizajes dentro del aula y parte de esta tesis esta avocada a entender cuál es el efecto de una situación de estrés sobre la formación o modulación de una MLT cuando es experimentado a tiempos cercanos a un aprendizaje.

En conclusión, la mayor parte de la bibliografía estudia el efecto de la administración de corticosterona, o evalúa la acción de diversos fármacos administrados en hipocampo o amígdala, en la modulación de la memoria. Así mismo, en muchos trabajos se investigan los efectos del estrés sobre tareas con un componente estresante o saliente intrínseco. Menos estudiados se encuentran, sin embargo, los efectos de un estrés extrínseco (a diversos tiempos anteriores y posteriores) sobre un determinado evento de aprendizaje, donde la información codificada no necesariamente se relaciona en contenido con la situación de estrés. Recientemente fue propuesto que el estrés puede mejorar la memoria de otras experiencias usando un mecanismo de etiquetado sináptico y captura (Bergado y col 2011). Sin embargo, un protocolo detallado para demostrarlo no ha sido realizado. En un marco teórico novedoso, intentamos entender globalmente como las experiencias vividas interaccionan a nivel molecular en el sistema nervioso de los individuos. El planteo central y original de esta tesis se basa en estudiar si una experiencia estresante induce la síntesis de proteínas, en qué momento y de qué forma lo hace, buscando una explicación que integra los conceptos de etiquetado emocional (Richter-Levin y Akirav 2003) con los de etiquetado conductual (Moncada y Viola 2007) y etiquetado sináptico (Frey y Morris 1997).

OBJETIVOS

Objetivo general

Los recuerdos pueden verse afectados por distintas experiencias y es necesario identificar cuáles, y de qué manera, colaboran o interfieren con la adquisición, el guardado y la evocación de la información. Es nuestro objetivo contribuir en esta temática, orientados a descubrir cómo una experiencia estresante conduce al hipocampo a un estado inductivo para el procesamiento de una memoria débil.

El objetivo general de esta tesis doctoral consistió en evaluar si una experiencia estresante puede generar una MLT inducida por aprendizajes débiles, temporalmente desfasados a ella, bajo qué condiciones lo hace y de verse el fenómeno, investigar la existencia de un mecanismo de “etiquetado conductual” en estos procesos de aprendizaje y memoria.

Comenzamos el trabajo estudiando en roedores los efectos de la exposición a una situación estresante sobre la promoción de la MLT de reconocimiento espacial de objetos, y llevamos a cabo experimentos farmacológicos para caracterizar los procesos que sugerimos subyacen a este fenómeno. Luego evaluamos los efectos del estrés en una memoria diferente, de evitación inhibitoria. El trabajo culminó investigando el impacto del estrés sobre aprendizajes dentro del aula, en estudiantes de escuela secundaria.

Nuestros objetivos particulares fueron:

- Caracterizar conductualmente el fenómeno de promoción de MLTs por estrés: estudiar en roedores si la MCT inducida por un entrenamiento débil (de REO o EI) puede establecerse en una MLT, al asociarse dicho entrenamiento con la exposición a un evento de estrés.
- Evaluar las curvas temporales de interacción de los eventos.

- Estudiar la dependencia de síntesis de proteínas y la participación de receptores a hormonas durante el proceso. Identificar proteínas necesarias para el fenómeno de promoción.
- Evaluar el efecto del estrés en humanos: estudiar si un evento de estrés relacionado con la enseñanza escolar tiene efectos promotores/modulatorios sobre la formación de otras memorias dentro del aula, y el curso temporal de este posible efecto.

Nuestra hipótesis postula que un evento de estrés presente antes o después de un aprendizaje débil, que solo induce MCT, promoverá la consolidación de la MLT. Ello dependerá de la síntesis de proteínas inducida por el estrés, como de que éstas sean capturadas por una “etiqueta”, inducida por el aprendizaje débil, en el sustrato neuronal activado. Dado que la etiqueta es de duración transiente, y la síntesis/ degradación de las proteínas tiene una cinética determinada, predecimos una ventana de efectividad dada por la convergencia de ambos fenómenos. En situaciones de aprendizaje fuerte, en cambio, nuestra hipótesis contempla que el estrés puede impedir la formación de memorias duraderas al competir por los recursos proteicos.

Basados en que muchos mecanismos de formación de MLTs se encuentran evolutivamente conservados, nuestra hipótesis para los estudios llevados a cabo en el ámbito escolar postula que el estrés tendrá efectos similares, pudiendo mejorar o perjudicar las MLTs en humanos.

CAPÍTULO I:

Efectos del estrés sobre el aprendizaje y la memoria en roedores





MATERIALES Y MÉTODOS I

SUJETOS EXPERIMENTALES

Se utilizaron ratas Wistar macho de 2-3 meses de edad, con un peso aproximado entre 200-350 gr. Para los experimentos en el paradigma de REO, se usaron animales provenientes de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, mientras que para los protocolos de EI, los mismos fueron obtenidos desde la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA. Las ratas fueron mantenidas en jaulas de rejas en grupos de cinco, a temperatura ambiental constante de 21° C y bajo un ciclo luz/oscuridad de 12 h (encendiéndose la luz a las 7 am y apagándose 7 pm). Todas tuvieron agua y comida disponible ad libitum.

Los animales fueron manipulados durante 2 minutos por día, durante dos días consecutivos, antes de los experimentos. Todos los procedimientos cumplieron con la Guía de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Publicación nro. 80-23, revisada en 1996) y fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Buenos Aires.

CIRUGÍA Y ADMINISTRACIÓN DE DROGAS

Los animales utilizados en los experimentos farmacológicos fueron sometidos a cirugía para la implantación de cánulas guías bilaterales de un calibre de 0.7mm (22G). Dicho proceso fue realizado bajo anestesia, siendo los animales inyectados de forma intraperitoneal con una solución de ketamina (70 mg/kg) y xilacina (7 mg/kg). Las cánulas fueron dirigidas con un marco estereotáxico a la región CA1 del hipocampo dorsal, según las coordenadas del Atlas de Cerebro de Rata (Paxinos y Watson 2007): eje antero-posterior: -3.9 mm, laterales: \pm 3.0 mm, eje dorso-ventral: -3.0 mm (desde

la posición de Bregma). Las cánulas fueron fijadas al cráneo con acrílico dental (Foto 1-izquierda) y para evitar la obstrucción, una aguja con calibre de 0.3mm (30G) fue colocada dentro de la cánula. Durante la cirugía se suministró de manera subcutánea el analgésico Meloxicam (0.2 mg/kg) y el antibiótico Gentamicina (3 mg/kg). Se permitió que los animales se recuperaran de la cirugía al menos durante cinco días, antes de comenzar con los experimentos.

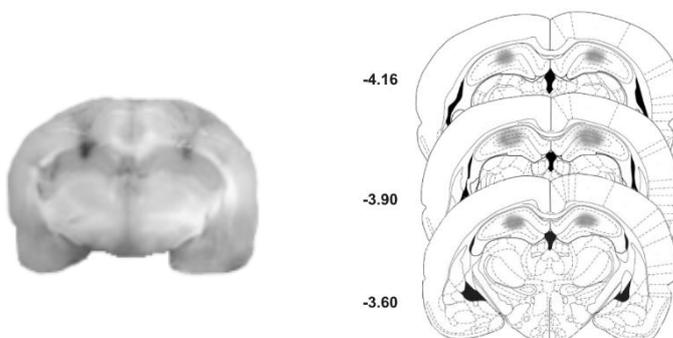
Para infundir las drogas se utilizó una aguja 30G un mm más larga que la cánula guía, inyectando en el área CA1 del hipocampo dorsal. Las agujas de infusión fueron conectadas mediante una manguera de polietileno de 0.015" a una microjeringa Hamilton para dispensar los volúmenes correspondientes de cada droga. La manipulación de las ratas fue realizada delicadamente para minimizar el estrés, pero restringiendo los movimientos de las mismas durante la infusión (Foto 1-derecha). El tiempo de este proceso fue similar para todos los animales, con una demora total de 3 minutos en la administración de los fármacos de manera bilateral: aproximadamente 30 segundos para la inyección en sí misma y 1 minuto adicional antes de remover la aguja de infusión para permitir la difusión y evitar el reflujo, para cada lado. Las drogas fueron infundidas 15 min antes de la sesión estrés.



Foto 1. Rata luego de la cirugía, con sus cánulas implantadas de acuerdo con las coordenadas correspondientes (izquierda). Durante la realización de los experimentos el animal se inmoviliza para la infusión de las drogas, colocándose la aguja de infusión, conectada con la microjeringa Hamilton, en una cánula por vez (derecha).

HISTOLOGÍA

Luego de los experimentos, se realizaron controles histológicos de la ubicación de las cánulas, mediante la infusión de 0,8 μ l/lado de azul de metileno al 5% (Esquema 6). Los animales fueron decapitados y sus cerebros removidos y cortados en rodajas para chequear el área de difusión, que se registró en aproximadamente 1.5 mm³ (Villar y col 2016). Solamente los datos de los animales con las cánulas ubicadas en el lugar correcto (95% de los casos) fueron incluidos en los análisis estadísticos.



Esquema 6. Corte de cerebro donde se observa la región donde infundió el colorante (izquierda). Representación del área de infusión luego de las pruebas histológicas con azul de metileno. La región coloreada de gris corresponde al área CA1 de hipocampo dorsal

DROGAS

Las drogas utilizadas fueron compradas a Sigma, St. Louis, MO, USA. Todas las dosis preparadas fueron inyectadas en el hipocampo dorsal de ambos hemisferios de la rata. Los inhibidores de síntesis proteica usados fueron Anisomicina (aniso, 80 μ g/0,8 μ l) y Emetina (emet, 50 μ g/ μ l). La aniso fue disuelta en HCl y diluida en solución fisiológica; luego se agregaron dosis de NaOH a distintas concentraciones hasta lograr un pH 7 en la solución. La emet fue disuelta en solución salina hasta

lograr la concentración adecuada. Tanto el antagonista de los receptores de mineralocorticoides (MR), Spironolactona (spiro, 75 ng/ μ l) como el antagonista de los receptores de glucocorticoides (GR) Mifepristona (mife, 20 ng/ μ l) fueron disueltos en DMSO y diluidos en solución fisiológica para lograr una concentración final de DMSO 5%. Las dosis fueron determinadas por bibliografía previa (Korte y col 1995; Moncada y col 2011; Xing y col 2014) y experimentos piloto realizados en nuestro laboratorio. El anticuerpo para bloquear la actividad de BDNF (anti-BDNF, Chemicon, Temecula, CA; AB1513P) fue diluido en solución fisiológica para lograr la concentración final (0,5 μ g/0,8 μ l) según los trabajos realizados por Slipczuk y col 2009.

PROCEDIMIENTOS CONDUCTUALES

❖ Reconocimiento espacial de objetos (REO)

A través de la memoria de reconocimiento un individuo es consciente de que un estímulo ha sido experimentado con anterioridad. Esto requiere que las características percibidas de los eventos sean identificadas y comparadas contra una memoria que contiene información y características de los eventos previamente vividos (Steckler y col 1998). Si bien en roedores existen diversas tareas para evaluar una memoria de reconocimiento, una de ellas utiliza la preferencia innata de los mismos por la novedad sobre la familiaridad: luego de realizar una sola sesión de entrenamiento en un contexto se testea la capacidad de los roedores de reconocer características nuevas, las cuales serán exploradas preferentemente, sin ser requeridos refuerzos positivos o negativos. El aprendizaje en esta tarea ocurre bajo condiciones relativamente bajas de estrés y alerta y se basa en comportamientos espontáneos de los animales (Ennaceur y Delacour 1988).

Particularmente, la memoria de reconocimiento espacial de objetos (REO), utilizada en el desarrollo de esta tesis, demuestra la capacidad de aprender y detectar el desplazamiento en el espacio de objetos previamente explorados. Si a una rata se le presentan objetos conocidos en una posición familiar (ya explorada) o novedosa (no utilizada anteriormente), pasara más tiempo explorando el objeto desplazado (nueva posición) en relación con aquel estacionario, que nunca se movió (Dere y col 2005).

Utilizamos para el desarrollo de estos experimentos una caja en la cual presentar a los roedores objetos que en una sesión posterior serían desplazados a una nueva localización (Foto 2).



Foto 2. Contexto utilizado para evaluar reconocimiento de objetos en el espacio (REO) (izquierda) La rata es colocada dentro de la caja con los objetos y se mide el tiempo que los explora mediante cronometro manual (derecha)

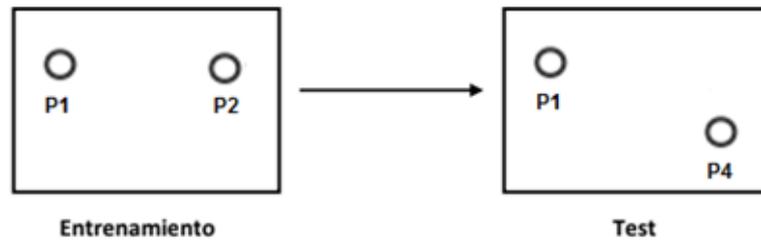
La caja utilizada es de acrílico, con 60 cm de largo, 40 cm de profundidad y 50 cm de altura. La pared frontal de la caja es transparente y la trasera rayada con líneas blancas y negras, siendo las paredes laterales blancas y con diferentes claves visuales. La habitación donde tuvo lugar el protocolo estuvo débilmente iluminada.

En el día del entrenamiento (TR), dos objetos idénticos (se utilizaron en forma aleatoria objetos de aluminio, vidrio o plástico, todos con dimensiones similares) se incluyeron dentro de la caja, cercanos a las dos esquinas adyacentes de la misma, en una línea paralela a las paredes de mayor

longitud; las posiciones fueron: P1 y P2 cuando los objetos se ubicaron cerca de la pared trasera, o P3 y P4 cuando estuvieron más próximos a la pared frontal transparente. Se les permitió a los animales explorar la arena por 5 minutos en los entrenamientos débiles (REOd) o 10 minutos en los casos de entrenamientos fuertes (REOf). Se registró con cronómetros manuales el tiempo de exploración de los animales a cada objeto, definido como olfatearlo, tocarlo con la nariz o con sus patas delanteras (Foto 2-derecha). Se excluyeron de los análisis aquellas ratas que durante el TR exploraron uno de los objetos más del 65% del tiempo total de exploración (es decir el dedicado a ambos objetos), ya que es requisito en esta sesión no mostrar preferencias por alguno de los objetos y/o sus localizaciones. Durante la sesión de testeo (TS), realizada 30 minutos luego (cuando se evaluó MCT) o 24 horas después (en caso de MLT), uno de los objetos fue cambiado a una posición nueva y el tiempo de exploración a cada uno de ellos se registró una vez más (Esquema 7). La duración de la sesión de testeo fue de 2 minutos y se excluyeron aquellos animales que presentaron un tiempo total de exploración menor a 10 segundos. Los resultados se expresan como *Índice de Preferencia*: $[\text{Tiempo de exploración de la posición novedosa (Tn)} - \text{Tiempo de exploración de la posición familiar (Tf)}] / [\text{Tn} + \text{Tf}]$. Un índice positivo y significativamente distinto de cero indica memoria. En promedio y de manera representativa, el tiempo total de exploración de los animales controles durante un entrenamiento de REOd se estimó en 51.04 ± 1.80 seg y 17.63 ± 0.59 seg durante la fase de testeo. Para cada uno de los sujetos experimentales, las posiciones de los objetos en el TR y su condición de familiar o novedosa durante el TS fue balanceada. La caja y los objetos fueron limpiados entre ensayos.

Tomando en cuenta el trabajo de Roozendaal y col 2006, decidimos no exponer los animales a la caja hasta realizar el TR, es decir que no hubo una etapa de habituación al contexto. En el citado trabajo, la administración de corticosterona luego de un entrenamiento en la tarea de reconocimiento de objetos mejoró la memoria del mismo en ratas naive, pero no en aquellas previamente habituadas y solo se observó un aumento de la memoria en estas últimas cuando fue estimulada la liberación de norepinefrina farmacológicamente. Los autores sugirieron una interacción entre los glucocorticoides y la activación noradrenérgica inducida específicamente por

las características del TR, novedoso y saliente, siendo ello crítico en el efecto de los glucocorticoides sobre la consolidación de la memoria. Como mencionamos anteriormente, durante los entrenamientos para tareas de reconocimiento no hay estímulos recompensados ni castigo, sin embargo, existe cierto nivel de “arousal”, que una habituación al contexto previa y extensiva puede atenuar (Okuda y col 2004).



Esquema 7. Protocolo de REO. Los objetos se ubican dentro de la caja experimental en posiciones específicas durante la sesión de entrenamiento (TR). En el testeo uno de los dos objetos se mantiene en la posición original (P1) y el otro es ubicado en una localización nueva (P2 → P4)

❖ Evitación inhibitoria (EI)

Se encuentra dentro de los paradigmas que se consideran condicionamientos operantes de tipo aversivo, donde el animal asocia la ejecución de una acción propia con la recepción de un castigo. La memoria de evitación inhibitoria (EI) representa la capacidad de aprender sobre el ambiente e inhibir el comportamiento innato de exploración por la llegada de estímulos aversivos. En este paradigma las ratas se colocan sobre una pequeña tarima dentro de una caja y cuando descienden para explorar el ambiente reciben un shock eléctrico; de este modo cuando son colocadas nuevamente en la tarima, inhibirán el comportamiento de descenso, eludiendo así la llegada del estímulo negativo (Izquierdo y col 1997; Giovaninni 2015). Resulta de utilidad la posibilidad de variar la fuerza del entrenamiento cambiando la intensidad del shock aplicado.

El aparato utilizado fue una caja de 60 cm de largo, 25 cm de profundidad y 30 cm de alto. En el interior de la misma, en el extremo lateral izquierdo, se encuentra una tarima de 10 cm de largo y 5 cm de altura, sobre una serie de varillas de bronce (0.2 cm. de calibre, espaciadas 1.0 cm) que conforman el piso de la caja y a las cuales puede aplicarse una corriente eléctrica.

En la sesión de entrenamiento se colocó a la rata sobre la tarima e inmediatamente después de bajar de la misma, se le aplicó un shock eléctrico (Foto 3). La intensidad del shock fue de 0.30 mA, con duración de 2 seg, en los casos de entrenamientos débiles (EId) o de 0.5 mA x 2 seg para los entrenamientos fuertes (EIf). Se registró el tiempo que los animales tardaron en bajar a la grilla (con sus cuatro patas) con un cronómetro acoplado al software, que permitió, a su vez, administrar el shock. Se excluyeron de los análisis aquellas ratas que tardaron más de 30 seg en bajar de la tarima, por pasar un tiempo significativamente mayor que el promedio para esta fase de la tarea.

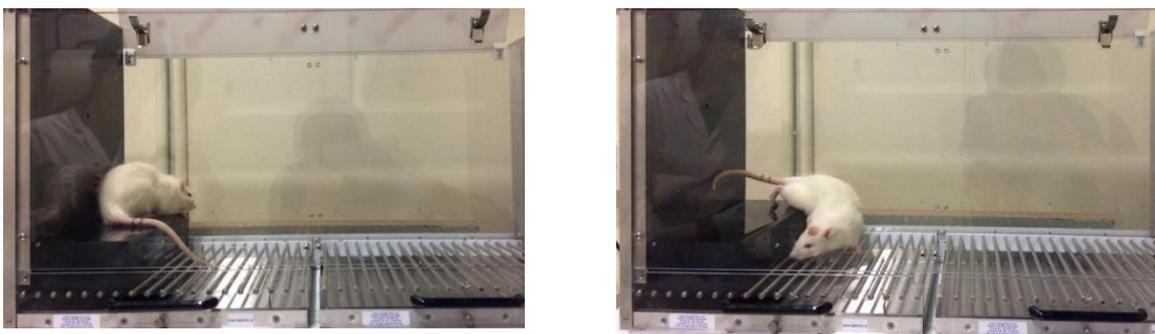
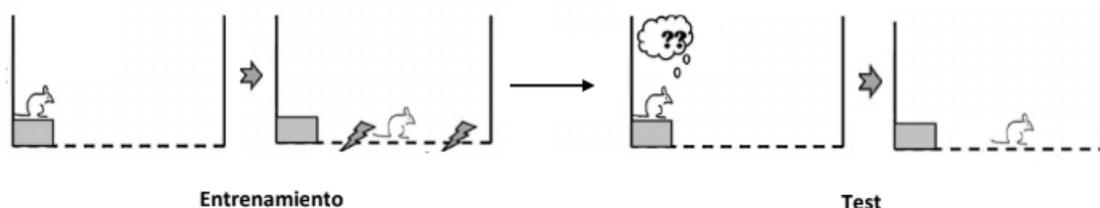


Foto 3. Caja utilizada en el paradigma de evitación inhibitoria (EI). Las ratas se colocan sobre la tarima negra situada en el extremo izquierdo de la caja, por encima de la grilla de varillas que conforman el suelo (izquierda). Durante el TR el animal explora la plataforma por unos segundos y al bajar las cuatro patas recibe una descarga eléctrica en sus patas (derecha)

En la sesión de testeo (TS), realizada 15 minutos luego (cuando se evaluó MCT) o 24 horas después (en caso de MLT), se colocó nuevamente el animal sobre la tarima y se registró el tiempo que demoró en bajar a la grilla, pero esta vez en ausencia de shock (Esquema 8). Entre ensayos la caja fue limpiada y desodorizada.

Los resultados se expresan como *Latencias*: tiempo que demora la rata en descender de la tarima durante el TS (medido en segundos). Si este valor es significativamente mayor a la latencia del TR es indicativo de memoria (Moncada y Viola 2007).



Esquema 8. Protocolo de EI. Durante el TR la rata es colocada en la tarima y al descender recibe un shock eléctrico a través de las varillas. En la sesión de TS se vuelve a colocar al animal en la tarima y si decide bajar, no recibirá el shock.

❖ Campo abierto (CA)

El dispositivo consiste en una caja cuadrada de madera 50x50 cm, con 40 cm de alto. Las paredes y el piso son negros y éste se encuentra dividido en nueve cuadrantes por líneas blancas (Foto 4). Cuando los animales fueron expuestos al CA se les permitió la exploración de la caja durante 5 minutos, bajo condiciones normales de luminosidad (Moncada and Viola, 2007). En este contexto las ratas no mostraron signos de inmovilidad (*freezing*), sino que demostraron un típico comportamiento exploratorio espontáneo. Al comienzo del ensayo las ratas fueron colocadas en un cuadrante perimetral y se registró la actividad locomotora y exploratoria durante los 5 minutos. El registro consistió en medir la cantidad de veces que un animal cruza los cuadrantes (cruces) y el número de episodios en los que adopta posición vertical, apoyándose en sus patas traseras, para examinar el ambiente (exploraciones aéreas). La medición se realizó por minuto, durante los cinco minutos, y se observó, como se esperaba, que el grado de habituación del animal fue inverso al de exploración. En promedio y de manera representativa, para un sujeto control la cantidad total de cruces (\pm SEM)

durante la exploración fue de 98.38 ± 3.11 y el número de exploraciones aéreas de 49.19 ± 2.27 (n=21).

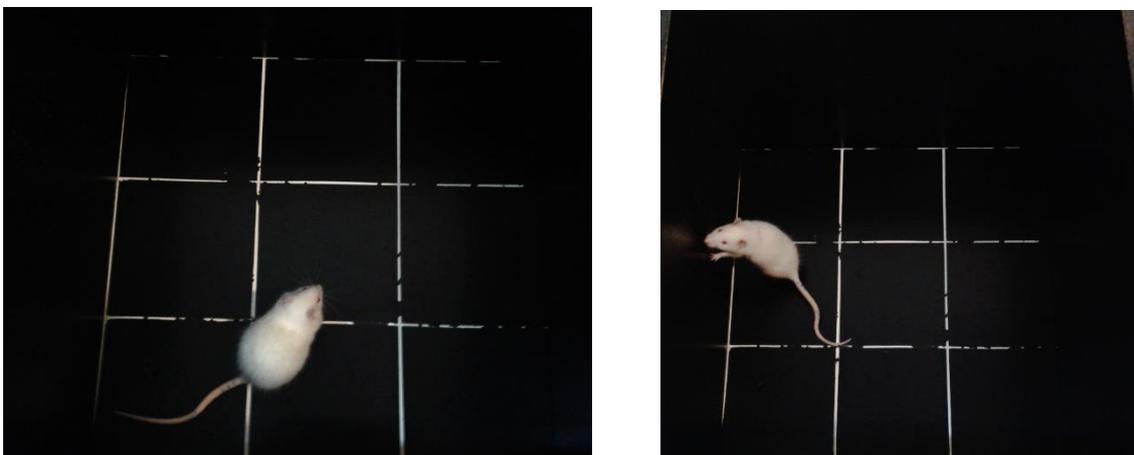


Foto 4. Caja de CA. La actividad exploratoria del animal se determinó registrando el número de cruces (izquierda) y exploraciones aéreas (derecha) que realizó durante una sesión de 5 minutos

❖ **Plataforma elevada (PE)**

La situación de estrés, para aquellos animales asignados a estos grupos durante los experimentos, consistió en la exposición durante 30 minutos a una plataforma elevada (hecha de acrílico blanco, con un cuadrante de apoyo de 20x20 cm y 80 cm de altura -Foto 5) bajo condiciones de luz intensa blanca (Degroot y col 2004). Durante este tiempo, los animales mostraron signos comportamentales de estrés (*freezing*, piloerección, orina y defecación). En los experimentos iniciales, luego de la sesión de PE se extrajeron muestras de sangre de las ratas para medir los niveles plasmáticos de corticosterona (mediante RIA). La presentación de la PE en los experimentos correspondientes se realizó antes o después del TR, lo que se especificará en cada caso.



Foto 5. Exposición de las ratas a una plataforma elevada, durante 30 min, bajo condiciones de luz intensa.

RADIOINMUNOENSAYO

Las muestras de sangre fueron obtenidas de animales expuestos a la PE (una vez finalizada la sesión de estrés) o de animales naive. Las mismas fueron almacenadas en tubos conteniendo EDTA 6% hasta realizarse los ensayos para Corticosterona en suero con un kit específico (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA), tal como se describió previamente (Cymeryng y col 1998).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos de los datos comportamentales fueron realizados usando el software Graph Pad Prism. Las diferencias entre grupos fueron determinadas usando el test t-Student no pareado o ANOVA de un factor. Las comparaciones post-hoc utilizadas fueron los test de Newman-Keuls (comparaciones múltiples) o Dunnett (comparaciones contra el grupo control).



RESULTADOS I

En esta primera sección de la tesis se mostrarán los resultados obtenidos en roedores sobre la formación de la MLT de REO y EI bajo un entorno de estrés.

Con los experimentos reunidos a continuación nuestro objetivo fue caracterizar los fenómenos de promoción de MLTs o eventos de competencia entre trazas mnésicas, evaluar requerimientos temporales para la presencia de estos fenómenos como así también, a través de aproximaciones farmacológicas, conocer los mecanismos subyacentes.

La plataforma elevada produce un aumento en el nivel de glucocorticoides

La activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y la liberación final de GC en condiciones de estrés es una respuesta adaptativa que es fundamental para la supervivencia de todos los vertebrados. Pero además de su respuesta homeostática al estrés, el eje HPA exhibe un ritmo diario característico, con una secreción máxima de GC que se produce antes del inicio de la actividad, ayudando a preparar al organismo para las mayores demandas energéticas que enfrentará al estar despierto. Este pico de GC se observa a la mañana para los humanos y en la noche para los animales nocturnos, como las ratas (Wotus y col 2013).

Independientemente de las oscilaciones diarias en el nivel de glucocorticoides, su liberación aumenta notablemente en respuesta a factores estresantes (Joëls y col 2003), como así también lo hacen las catecolaminas. Los niveles de GC aumentan dentro de un rango de minutos y vuelven a la línea de base entre 60 y 90 minutos después de presentarse el estímulo estresante (Karst y col 2005). La secreción de estos neuromoduladores varía según el grado y tiempo de exposición al estrés, y tiene influencia en variados circuitos neuronales de forma directa o indirecta, a través de distintos receptores (Prager y Jonhson 2009; Finsterwald y Alberini 2014).

En el presente trabajo decidimos utilizar una plataforma elevada (PE) como estresor agudo, teniendo en cuenta estudios como el de Degroot et al (2004) y Kavushansky y Richter-Levin (2006), donde se ven claros aumentos en los niveles de corticosterona (Cort), glucocorticoide endógeno de los roedores, con la exposición de los animales a la PE.

En el primer experimento que llevamos a cabo, las ratas fueron asignadas al azar a uno de dos grupos: el de los animales no expuestos a la PE y que denominamos control (CTR), o el de los animales colocados en la PE durante 30 minutos (grupo PE). Para observar los niveles de Cort en plasma, como un índice sistémico del estrés conductual, los niveles de la hormona fueron medidos mediante RIA (Fig. 1) en ambos grupos. La medición fue realizada una vez terminada la sesión de PE y se confirmaron cantidades aumentadas de esta hormona en los roedores que atravesaron la situación estresante, encontrándose valores de $3.44 \pm 0.73 \mu\text{g/dl}$ en el grupo control y de $82.2 \pm 7.73 \mu\text{g/dl}$ en el grupo de ratas expuesto a la PE ($n=11$; $p<0.001$ Test t-Student).

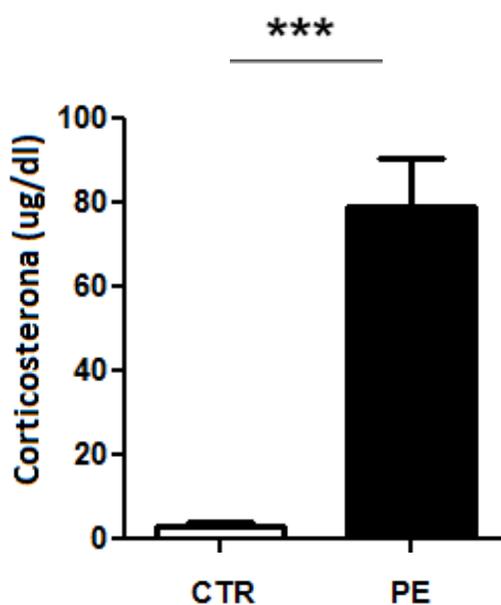


Figura 1. La exposición a la PE induce un aumento en los niveles de Corticosterona. Los animales del grupo experimental (PE) fueron colocados durante 30 minutos en la PE, bajo condiciones de luminosidad intensa, y al finalizar dicha exposición se extrajeron las muestras de sangre para la medición de Cort mediante RIA ($n=6$). Los animales del grupo control (CTR) solo fueron manipulados y luego se extrajeron las muestras ($n=5$). Los datos son expresados como concentración de Cort en plasma sanguíneo (ug/dl). Test t- Student, $t_{(9)}=10.96$; $***p<0.001$.

El estrés agudo una hora después de un entrenamiento de REO que solo induce MCT, promueve la MLT de esta tarea

La nueva información adquirida puede ser guardada temporalmente en, por lo menos, dos tipos diferentes de memorias, la MCT y la MLT (Izquierdo y Medina 1998; Vianna y col 2000). Se ha propuesto que las MLT son almacenadas mediante cambios estables en las conexiones sinápticas que modifican la actividad de determinados circuitos neuronales (Martin y col 2000) y que para que ello ocurra se requiere el suministro de nuevas proteínas relacionadas con la plasticidad (McGaugh 2000). Un aprendizaje saliente induce la síntesis de proteínas necesarias para su consolidación (Schafe y col 1999; Quevedo y col 2004; Costa-Mattioli y Sonenberg 2008), sin embargo, nuestro grupo han demostrado que es posible formar una MLT de una experiencia que normalmente habría producido solo MCT, si es acoplada con otro evento que induce la expresión génica y/o la síntesis de proteínas en la misma población neuronal, mecanismo al que hemos llamado EC, y que posteriormente ha sido evidenciado en otros grupos de trabajo.

En principio, para estudiar este fenómeno utilizamos el paradigma de REO en ratas. En este protocolo experimental, la sesión de aprendizaje o entrenamiento (TR) de los roedores consistió en una sesión de exploración de 5 minutos de un contexto conteniendo dos objetos idénticos. En grupos independientes de ratas, la memoria de posición de los objetos fue testada a 30 minutos luego del entrenamiento, para evaluar MCT, o a 24hs cuando evaluamos una MLT. Un tercer grupo de ratas fue expuesto a un evento estresante (PE por 30 minutos) una hora luego del TR, y testado a 24 hs. El horario de la situación estresante fue elegido en base a los estudios previos del laboratorio (Ballarini y col 2009). En la sesión de testeo (TS) se re-expuso a los animales al mismo contexto, pero con uno de los objetos desplazado respecto de su posición inicial durante el TR. Los resultados fueron expresados como un índice de preferencia, que compara la exploración del objeto en la posición novedosa con la de aquel cuyo lugar no cambió. Un índice positivo y distinto de cero implica mayor tiempo de exploración del objeto en la posición novedosa, y por lo tanto memoria.

Como se observa en la Fig. 2 los animales del grupo MCT fueron capaces de formar una memoria a corto plazo de la posición de los objetos en el contexto en el que fueron entrenados. Sin embargo, al testear a 24 horas luego del TR a un grupo independiente de ratas que tuvieron la misma experiencia, no se observó una MLT ($p < 0.01$ vs MCT). Denominamos a este entrenamiento, capaz de formar MCT pero no MLT, como un entrenamiento débil (REOd). El grupo expuesto a la situación de estrés 60 minutos después del TR (MLT STR+60), sí fue capaz de formar una memoria duradera ($p < 0.05$ vs MLT).

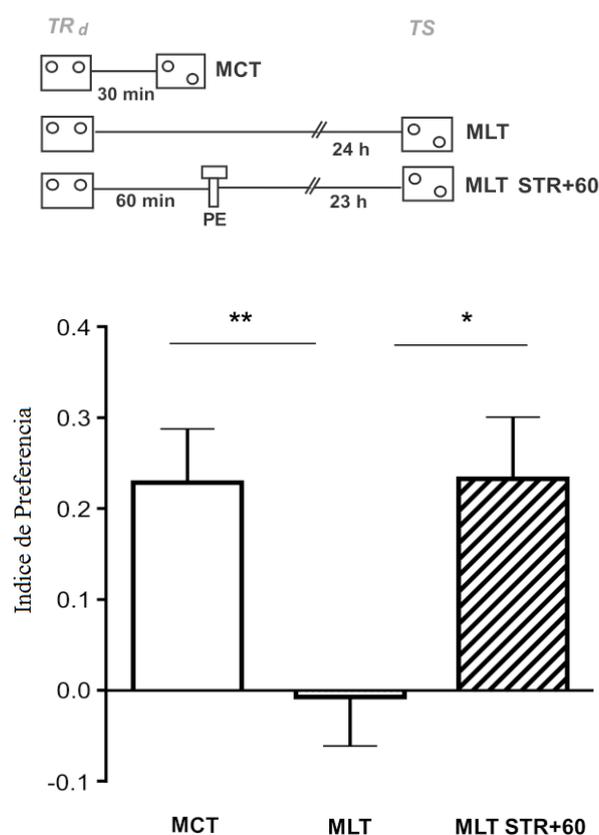


Figura 2. Un evento estresante experimentado una hora después de un entrenamiento de REO débil promueve la formación de MLT. Un esquema del protocolo experimental es presentado en la parte superior de la figura. Los animales fueron entrenados en el paradigma de REO y grupos independientes de ratas se testearon a 30 min (MCT, $n=14$) o 24 h (MLT, $n=19$) luego del TR. Los animales MLT STR +60 ($n=12$) fueron expuestos a una PE 60 min luego del TR y testeados a 24 hs del mismo. Los datos son expresados como Índice de Preferencia (\pm SEM). Análisis de Newman-Keuls luego del ANOVA de un factor, $F_{(2,42)}=5.838$; $*p < 0.05$ $**p < 0.01$

Estos experimentos muestran que un evento de estrés agudo induce la formación de una MLT para una tarea dependiente de hipocampo, en ratas entrenadas con un protocolo débil que solo es capaz de generar MCT pero no de consolidar dicha traza.

El efecto promotor del estrés depende de la actividad de los receptores de mineralocorticoides (MR) y glucocorticoides (GR).

Extensa evidencia indica que la activación de los receptores de glucocorticoides en áreas específicas del cerebro, consecuencia de la liberación de estas hormonas en situaciones de “arousal” o estresantes, media la modulación que los glucocorticoides ejercen sobre la memoria (de Kloet 1999; McGaugh & Roozendaal 2002; Revest 2005; Prager y Johnson 2009). La regulación de estos procesos involucra tanto a los MR como a los GR, con distinta afinidad por los glucocorticoides.

Como la tarea de REO es un aprendizaje dependiente de hipocampo, se estudió si el fenómeno de promoción de la memoria de REO, inducido por estrés, era dependiente de la actividad de los receptores de glucocorticoides en esta estructura. De esta manera, administramos antagonistas de GR o MR en la región CA1 del hipocampo dorsal de las ratas y evaluamos si la promoción de la memoria resultaba bloqueada. Las ratas fueron entrenadas en el protocolo de REO y expuestas a un evento estresante una hora luego del mismo (grupos STR+ 60). Las que no tuvieron estrés formaron el grupo control (CTR). Grupos independientes de animales recibieron infusiones del antagonista de los GR, mifepristona (mife), o del antagonista de los MR, spironolactona (spiro), o del vehículo (DMSO 5%), 15 min antes de la PE. El test fue realizado 24 hs después del TR. Los animales expuestos a la situación estresante una hora luego del entrenamiento e inyectados con vehículo, generaron una MLT ($p < 0.01$ vs CTR), tal como sucedió en los casos anteriores (Fig. 3). En contraste, las ratas infundidas con mife o spiro no expresaron memoria ($p < 0.01$ vs veh); estos grupos mostraron

un índice de preferencia bajo y similar al obtenido por el grupo control. De esta forma, el fenómeno de promoción fue bloqueado o prevenido.

Estos resultados nos permiten observar que la formación de la MLT de REO inducida por el evento estresante es dependiente de ambos receptores de glucocorticoides.

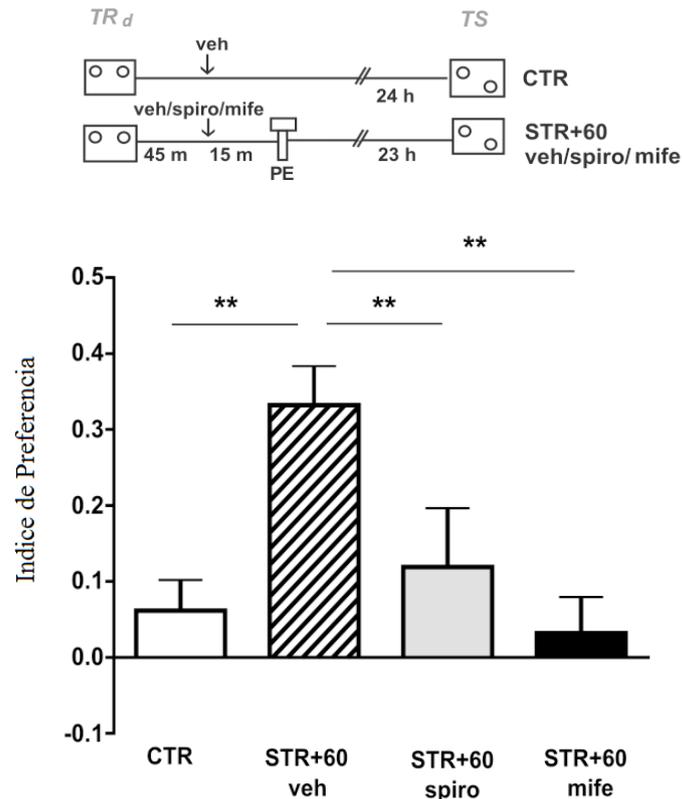


Fig 3. El efecto promotor del estrés sobre la formación de MLT de REO depende de la actividad de GR y MR en el **hipocampo dorsal**. Un esquema del protocolo experimental es presentado en la parte superior de la figura. Los animales del grupo STR+60 fueron expuestos a la PE 60 min luego del TR y recibieron intra CA-1 infusiones de vehículo (STR+60 veh, n=15), spironolactona (STR+60 spiro, n=10) o mifepristona (STR+60 mife n=11) 15 min antes de la PE. Un grupo de animales inyectado con vehículo no fue expuesto a PE (CTRL, n=12). La MLT de REO fue testada 24 hs luego del TR. Los datos son expresados como Índice de Preferencia (\pm SEM). Análisis post-hoc de Newman-Keules, luego del ANOVA de un factor, $F_{(3,44)}=7.074$; $**p<0.01$.

El efecto promotor del estrés depende de la síntesis de proteínas y de la actividad de BDNF.

El aporte de nuevas proteínas, como hemos mencionado, es necesario para consolidar las MLT. Tomando la hipótesis del EC como un posible mecanismo subyacente a la formación de memorias duraderas, proponemos que el evento estresante actúa como disparador de la síntesis de PRPs, permitiendo la consolidación de la memoria de REO luego de un entrenamiento débil.

De esta manera, distintos grupos de ratas fueron entrenados en el paradigma de REO, expuestos a un evento estresante una hora luego del mismo y recibieron infusiones en la región CA1 del hipocampo dorsal de anisomicina (aniso) o emetina (emet), ambos inhibidores de la síntesis proteica, o de su vehículo (sol. fisiológica). Las infusiones fueron realizadas 15 minutos antes de la PE. El test fue realizado 24 hs después del TR. En la Fig. 4A se observa que los animales expuestos a la situación estresante 60 min luego del TR e inyectados con vehículo (STR+60 veh), a diferencia de los que no la experimentaron (CTR), generan una MLT ($p < 0.001$ vs CTR). Este efecto de promoción de la memoria de REO es bloqueado con la infusión intrahipocampal de aniso ($p < 0.01$ vs veh) o eme ($p < 0.05$ vs veh).

Luego evaluamos el rol de la proteína BDNF en la promoción de la MLT de REO inducida por estrés, mediante la administración del anticuerpo anti-BDNF en la región CA1, 15 min antes de la PE. Los resultados nos permitieron observar en los animales estresados infundidos con la solución vehículo (STR+60 veh) la formación de la MLT ($p < 0.001$ vs CTR), mientras que en aquellos infundidos con anti-BDNF la promoción de la MLT fue bloqueada ($p < 0.01$ vs veh, Fig. 4B).

El fenómeno de promoción de la memoria de REO observado en este trabajo, generado por la exposición a una PE post-aprendizaje, es dependiente de la síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal y particularmente de la función de BDNF

Existe una ventana de tiempo acotada en que el estrés agudo promueve la formación de MLT de REO.

A continuación decidimos estudiar si la promoción de la MLT por el evento estresante ocurre cuando es experimentado a otros tiempos alrededor del TR de REO. Postulamos que existe una ventana temporal acotada dentro de la cual resulta efectiva la promoción de una memoria por un evento de estrés.

Para testarlo grupos independientes de ratas fueron entrenados bajo el paradigma de REO y expuestos a un evento estresante a diferentes tiempos pre o post entrenamiento: 30 o 60 minutos antes del REO o 30, 60 o 90 minutos luego del mismo. La memoria fue testeada 24 hs post-TR. Como se observa en la Fig. 5, luego de un entrenamiento de REO de 5 min de duración los animales control (no expuestos a la PE) no generan MLT. Tampoco lo hacen aquellos animales con un estrés previo al TR, independiente de si estos dos eventos fueron separados 30 o 60 minutos, ni aquellas ratas que experimentaron una situación de estrés 30 o 90 minutos posterior al TR ($p > 0.05$ vs CTR). Sí observamos MLT, tal como esperábamos, en aquellas ratas que experimentaron estrés 60 minutos luego de su entrenamiento ($p < 0.05$ vs CTR), confirmando los resultados anteriores. Sugerimos entonces que hay una ventana temporal crítica en la cual el evento de estrés promueve la formación de memorias extrínsecas a él. Únicamente el estrés experimentado una hora luego de una sesión de un entrenamiento que solo produce MCT, puede promover la formación de su MLT.

El estrés experimentado una hora antes de un entrenamiento de REO tiene un efecto prejudicial sobre la MLT de REO.

Una característica del proceso de EC es que puede ser simétrico, lo que significa que el evento

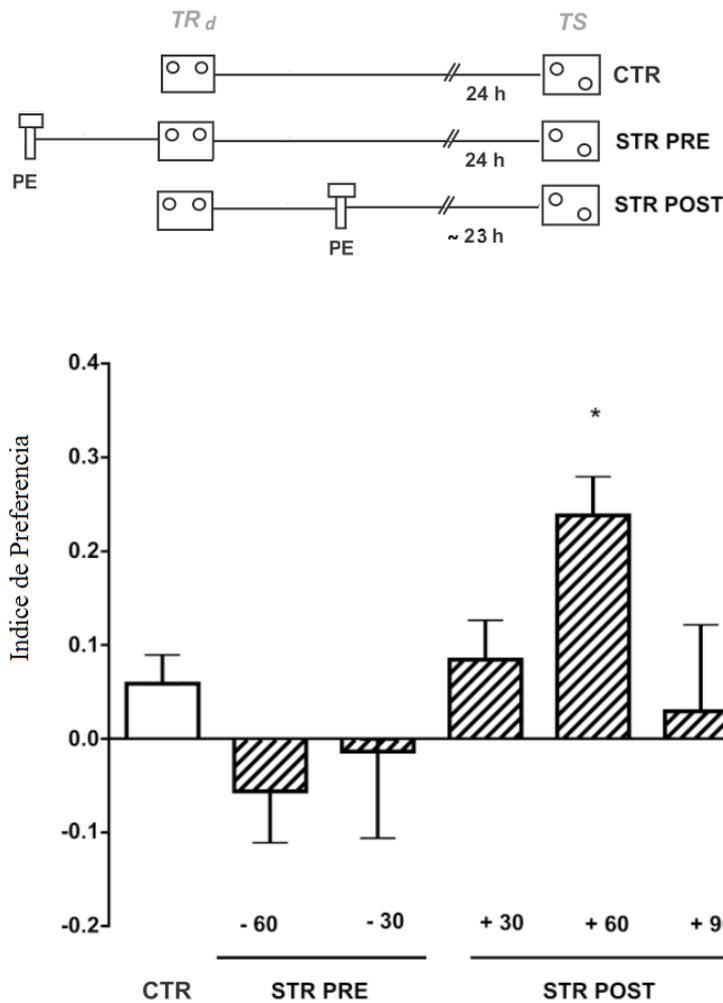


Figura 5. Hay una ventana de tiempo crítica para el efecto promotor del estrés: solo experimentado una hora luego de un entrenamiento débil promueve la formación de la MLT de REO. Un esquema del protocolo experimental es presentado en la parte superior de la figura. Los animales fueron expuestos a un REOd y grupos independientes de ratas fueron colocados, o no (CTR, n=23) en una PE a diferentes tiempos cercanos al entrenamiento: 30 o 60 min antes (STR PRE -30, n=8 o STR PRE -60, n=13) o 30, 60 o 90 min después (STR POST +30, n=12; STR POST +60, n=20; STR POST +90, n=12). La MLT fue registrada 24 hs después del TR. Los datos son expresados como Índice de Preferencia (\pm SEM). Análisis post-hoc de Dunnett, luego de un ANOVA de un factor, $F_{(5,82)}=4.07$; * $p<0.05$ vs CTR

que proporciona las PRPs puede promover la formación de una MLT independientemente de si se experimentó antes o después del aprendizaje satélite. Sin embargo, del análisis del curso temporal de los efectos del estrés sobre la promoción de la MLT, hemos observado que la exposición a la PE 60 min antes del REOd carece de efectos promnésicos. De hecho, el estrés experimentado a otros

tiempos pre-TR tampoco indujo la formación de MLT. Pensamos entonces que en estos casos la exposición al estrés puede estar afectando negativamente la inducción o el establecimiento de la etiqueta de REO generada por el aprendizaje débil, y de esta manera impide formar la MLT.

Si la falta de memoria no está relacionada con el suministro de PRPs sino con la etiqueta, el efecto promotor del estrés no podría ser recuperado incluso con un evento adicional que brinde tales proteínas, como por ejemplo la exploración de un CA. La exploración de un CA demostró promover la MLT para una gran cantidad de tareas de aprendizaje diferentes, incluida la tarea de REO, a través de la inducción de la síntesis proteica (Ballarini y col 2009; Moncada y col 2015). La hipótesis del EC postula que cualquier evento proveedor de PRPs permitirá la formación de la MLT en aquellos lugares donde la etiqueta se mantenga intacta, la cual resulta esencial para determinar la información que se almacenará, así como el sustrato para hacerlo; si este marcado se interrumpe, generará amnesia (Moncada y col 2015)

Para analizar esta idea, en esta parte del trabajo las ratas se expusieron nuevamente a un REOd y adicionalmente a un CA. Entonces, un grupo de ratas fue sometido a un evento estresante 60 min antes del TR, momento en que no es capaz de promover la memoria y una hora post-TR se les permitió la exploración del CA (grupo STR-60 CA). Otro grupo independiente de animales fue entrenado y solamente expuesto al CA 1h luego del TR (grupo CA). El test de todas las ratas se realizó a 24 hs post-TR. Como se observa en la Fig. 6A, la exploración del CA 60 min luego del REOd indujo MLT ($p < 0.05$ vs CTR); sin embargo, en el grupo de animales que experimenta la PE 60 minutos antes del TR, el efecto promotor generado por la exploración del CA no fue observado ($p < 0.05$ vs CA).

Por otro lado, si el estrés previo interfiere de alguna forma con la etiqueta del aprendizaje de REO, entonces no permitiría tampoco la consolidación de la memoria en un entrenamiento fuerte en este paradigma, el cual genera MLT per se. Decidimos realizar este estudio en otro grupo de animales. El TR fuerte (REOf) consistió en una sesión de exploración de 10 minutos del contexto conteniendo los objetos y el testeó se realizó 24 hs después. Un grupo de ratas fue expuesto a la PE 60 min antes del REOf y el otro, utilizado como control, no atravesó esta experiencia de estrés. En la Fig. 6B podemos observar que los animales que no tuvieron asociado al TR el evento estresante fueron

capaces de formar una MLT, mientras que los animales estresados fueron amnésicos ($p < 0.05$ vs CTR), resultado que no pudo ser revertido por la exposición a un CA 60 min después del REOf ($p < 0.05$ vs CTR). La MLT de REO no fue afectada por exponer a las ratas a un CA 60 min después de un entrenamiento fuerte (índice de preferencia (\pm SEM), CA: 0.23 ± 0.07 vs CTR: 0.21 ± 0.05 , $p > 0.05$ luego de Test t-Student).

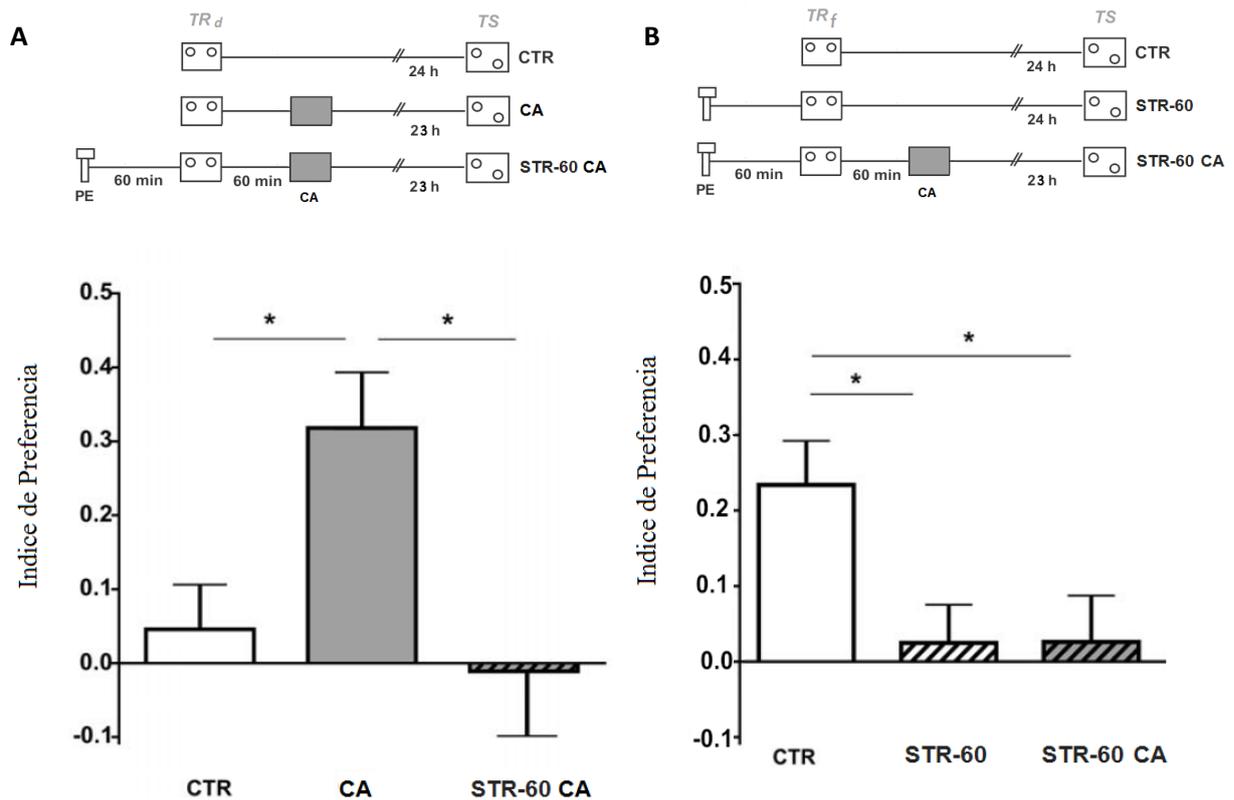


Figura 6. El estrés experimentado 60 min antes del entrenamiento de REO previene la formación de la MLT de esta tarea. Los protocolos experimentales son presentados encima de cada figura. A) El estrés previo al REOd bloquea el efecto promotor de un CA sobre la MLT de REO. Un grupo de ratas fue expuesto solo al TR (CTR, n=7), mientras otro grupo, 60 min luego del mismo, experimentó la exploración de un CA (CA, n=10). Un tercer grupo se expuso, además del CA, a una PE 60 min antes del REOd (STR-60 CA, n=9). La memoria fue testada 24 hs después del TR. Los datos son expresados como Índice de Preferencia (\pm SEM). Análisis post-hoc de Newman-Keules luego de un ANOVA de un factor, $F_{(2,23)}=5.187$; $*p < 0.05$ B) El estrés previene la formación de la MLT de REO inducida por un TRf y el efecto no pudo ser revertido por la exposición a un CA. El grupo control de ratas (CTR, n=19) fue entrenado con un REOf. Un segundo grupo fue colocado en la PE 60 min antes del TRf (STR-60, n=11) y un grupo diferente, además de la PE, exploró un CA 60 min post-TR (STR-60 CA, n= 13). La memoria fue testada 24 hs luego del TR. Los datos son expresados como Índice de Preferencia (\pm SEM). Análisis post-hoc de Newman-Keules luego de un ANOVA de un factor, $F_{(2,40)}=4.517$; $*p < 0.05$

Finalmente nos preguntamos si el evento estresante previo al aprendizaje de REO afecta de forma negativa solo y específicamente la formación de la MLT, sin tener efectos sobre la adquisición de la información. De esta manera, expusimos a las ratas nuevamente a la PE 60 min antes de un REOf (grupo STR-60) pero esta vez realizamos el testeo luego de 30 min para registrar MCT. La Fig. 7 muestra que tanto los animales estresados como aquellos que no fueron expuestos a la PE pueden codificar la información y expresar MCT ($p > 0.05$ vs CTR), lo cual sugiere que el efecto del estrés es selectivo sobre el proceso de consolidación de la memoria.

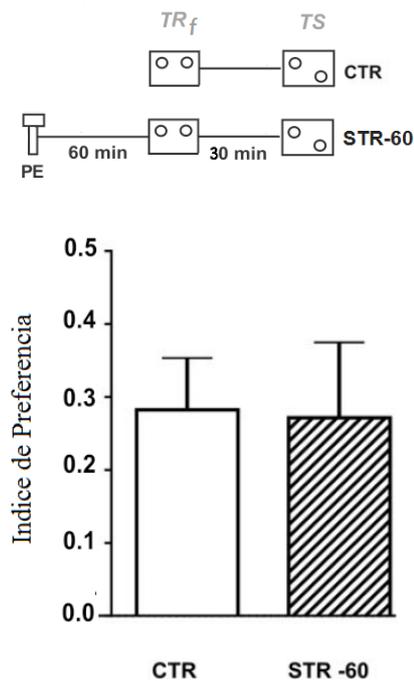


Figura 7. El estrés no impide formar una MCT de REO. Las ratas fueron expuestas a un REOf (CTR, n=9) y un grupo de animales fue adicionalmente colocado en la PE 60 min antes del TR (STR-60, n=14). La MCT se registró a los 30 min luego del TR. Los datos son expresados como Índices de Preferencia (\pm SEM). Test t-Student, $t_{(21)} = 0.076$; $p > 0.05$

El estrés experimentado una hora después de un entrenamiento fuerte de REO interfiere con la MLT de REO.

En términos del EC, cuando un fenómeno de promoción ocurre, tanto el aprendizaje débil como el evento que provee las proteínas necesarias para su consolidación, son procesados en las mismas

estructuras y dentro de una ventana de tiempo en común. De esta manera, las trazas de ambas experiencias se encuentran compartiendo un pool común de PRPs, de las cuales el aprendizaje débil puede beneficiarse.

En tales condiciones, sin embargo, si los diferentes eventos atraviesan un proceso de consolidación, puede generarse una competencia intracelular por los recursos, que definirá cuál de las trazas de memoria se estabilizará en la red neuronal activada. Mecanismos de intercambio, de interferencia y de captura resultan importantes para la consolidación de cambios plásticos, al menos a nivel celular, y un fenómeno similar podría estar ocurriendo después de la adquisición de nueva información (Moncada y col 2015). En el laboratorio, por ejemplo, se han observado casos de interferencia retrograda sobre aprendizajes que generan memorias duraderas al presentarse consecutivamente nuevas tareas (Martínez y col 2014; Villar y col 2016).

En una última tanda de experimentos en el paradigma de REO, expusimos a las ratas a un entrenamiento fuerte y este generó, tal como se esperaba, una MLT de la tarea; sin embargo, la presentación de una PE 60 min luego de dicho entrenamiento impidió la formación de una memoria duradera: los animales de este grupo (STR+60) mostraron índices de preferencia cercanos a cero y diferentes a los animales no estresados ($p < 0.05$ vs CTR, Fig. 8). Como la PE 60 min luego de un entrenamiento débil de REO sí promovió la formación de una MLT (Figs. 2 a 5), este resultado no se explicaría por impedirse la inducción o establecimiento de la etiqueta del aprendizaje de REO. Antecedentes en nuestro laboratorio (Ballarini y col 2009) demuestran que la exposición al CA tanto una hora antes como una hora después del REO induce la síntesis de proteínas y genera promoción de la MLT de REO, por lo cual realizamos una exposición al CA previo al REO con el objetivo de evaluar si la etiqueta es o no afectada negativamente por la PE post-TR. Si el estrés la afecta, tal como se planteó para los experimentos anteriores, el CA no podrá prevenir la amnesia, aún gatille la síntesis de proteínas y aumente los recursos proteicos disponibles.

En un tercer grupo, entonces, las ratas fueron expuestas a una sesión de CA 60 minutos antes del REO y una hora luego del mismo se presentó la PE (grupo CA STR+60); la amnesia observada por la con la PE fue revertida por el CA ($p < 0.05$ vs STR+60, Fig. 8). Estos resultados sugieren que el estrés

posterior a un REOf podría competir por los recursos proteicos propios del REOf. Adicionalmente, evaluamos si el CA 60 min antes del REOf modifica la MLT del REO. Observamos que la presentación del CA no afectó la formación de esta memoria (índice de preferencia (\pm SEM), OF: 0.17 ± 0.06 vs CTR: 0.26 ± 0.06 , $p > 0.05$; Test t-Student).

De esta manera, la PE 60 min luego de una tarea de aprendizaje en el paradigma de REO puede tener distintas consecuencias: si el entrenamiento es débil promueve una MLT pero luego de un entrenamiento fuerte la perjudica, probablemente por proveer o competir por las PRPs, respectivamente.

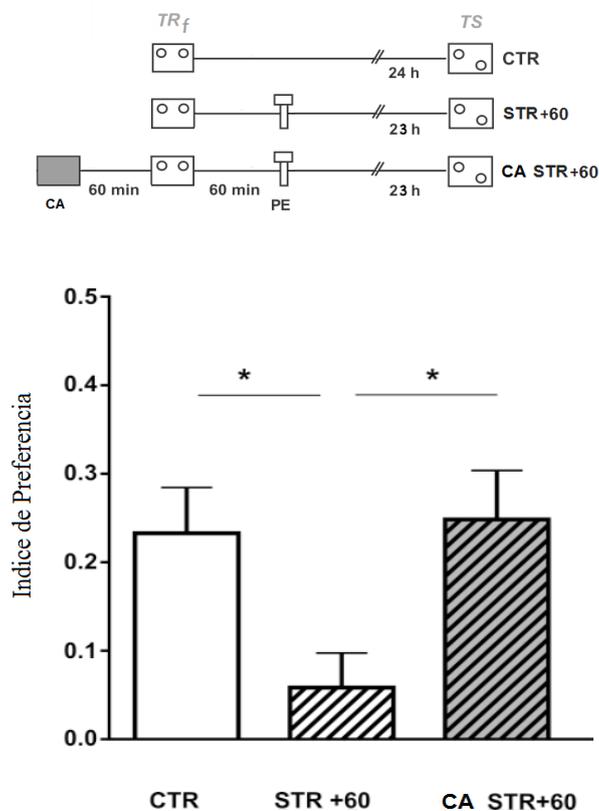


Figura 8. El estrés 60 min después de un entrenamiento de REO fuerte impide la formación de la MLT de REO y este efecto es prevenido con la exposición a un CA. El esquema del protocolo experimental es mostrado en la parte superior de la figura. El grupo control de ratas (CTR, $n=18$) fue expuesto a un REOf y un segundo grupo, independiente, fue colocado en la PE 60 min después del TR (STR+60, $n=12$); un grupo diferente, además de la PE, exploró un CA 60 min antes del REOf (CA STR+60, $n=17$). La memoria de REO fue testeada 24 hs después del TR. Los datos son expresados como Índices de Preferencia (\pm SEM). Análisis post-hoc de Newman-Keules luego de un ANOVA de un factor, $F_{(2,44)}=3.540$; $*p < 0.05$

El estrés agudo una hora antes de un entrenamiento de EI débil, que solo induce MCT, promueve EI-MLT.

Con el objetivo de extender el estudio sobre las condiciones que posibilitan la formación de MLTs en situaciones de estrés, se utilizó un paradigma de aprendizaje diferente; evaluamos en esta sección una memoria asociativa, de tipo aversiva.

Lo interesante en este tipo de aprendizajes es que la memoria subyacente a estas experiencias se forma a partir de una situación que de por sí tiene un grado de saliencia y estrés, que podría facilitar su almacenamiento. De hecho, mediante distintos enfoques, se ha demostrado que el grado de estrés experimentado durante el aprendizaje podría estar relacionado con la fortaleza de la memoria que se forma (Sandi y Pinelo-Nava 2007). Asegurar la evocación futura de estímulos que resultaron aversivos y/o las estrategias desarrolladas para hacer frente a tales experiencias representa una clara ventaja evolutiva. De esta manera nos preguntamos si una situación de estrés adicional, asociada a estos eventos, puede tener efecto en la consolidación de una MLT en este tipo de memorias. Estudiamos si el estrés afecta la formación de una memoria aversiva y si hay diferencias con los efectos que ejerce sobre memorias de reconocimiento, como vimos en la sección anterior.

En la tarea de EI el animal aprende a inhibir sus tendencias innatas de exploración, por asociar dicha acción con la llegada de un estímulo nocivo. Durante la sesión de TR se colocó a los animales sobre una pequeña tarima dentro de la caja de EI, y una vez que descendieron con sus cuatro patas de la misma, se les aplicó un shock de 0.30 mA y 2 seg de duración. En grupos independientes de ratas la memoria fue testada a los 15 minutos luego del TR, para evaluar la MCT, o a 24 hs para analizar la MLT. Un tercer grupo de ratas fue expuesto a la PE, una hora antes del TR, y testado a 24 horas. Tanto la intensidad y duración del shock, como el horario de la situación de estrés, fueron elegidos en base a estudios piloto en el laboratorio y bibliografía (Moncada y Viola 2007; Moncada y col 2011). Durante el TS, los animales fueron colocados nuevamente en la tarima dentro de la caja

experimental, sin aplicarse el shock cuando bajaron a la grilla. Los resultados se expresan como latencias, que representan el tiempo que el animal demora en bajar de la tarima durante el TS, el cual, si es significativamente mayor a las latencias registradas en el TR, es indicativo de memoria.

Como se observa en la Fig. 9 los animales del grupo MCT fueron capaces de formar una memoria a corto plazo sobre la experiencia aversiva; las latencias elevadas reflejan que los animales permanecieron en la tarima, evitando el descenso, y son diferentes a las del TR ($p < 0.05$). Sin embargo, al testear a 24 horas un grupo independiente de ratas sujetas a la misma experiencia, no se observó una MLT ($p < 0.01$ vs MCT). Denominamos a este entrenamiento, capaz de formar MCT pero no MLT, entrenamiento débil (Eld). El grupo expuesto a la situación de estrés 60 minutos antes del TR (MLT STR-60), sí fue capaz de formar una memoria duradera ($p < 0.01$ vs MLT).

Estos experimentos muestran que un evento de estrés agudo presentado previo al aprendizaje de Eld induce la consolidación de la información adquirida en la tarea.

El efecto promotor del estrés depende de la actividad de los receptores de glucocorticoides (GR).

En un experimento posterior, evaluamos si el efecto promotor del estrés sobre la tarea de El podía ser bloqueado al administrar antagonistas de GR en la región CA1 del hipocampo dorsal. El aporte de nuevas proteínas es necesario para consolidar las MLT, ¿los receptores de glucocorticoides podrían ser los mediadores de esta respuesta?

Las ratas fueron entrenadas en el protocolo de Eld y expuestas al evento estresante una hora antes del mismo (grupos STR-60). El grupo control de ratas (CTR) no se sometió a la PE. Grupos independientes de animales estresados recibieron infusiones de mifepristona (mife) o de solución

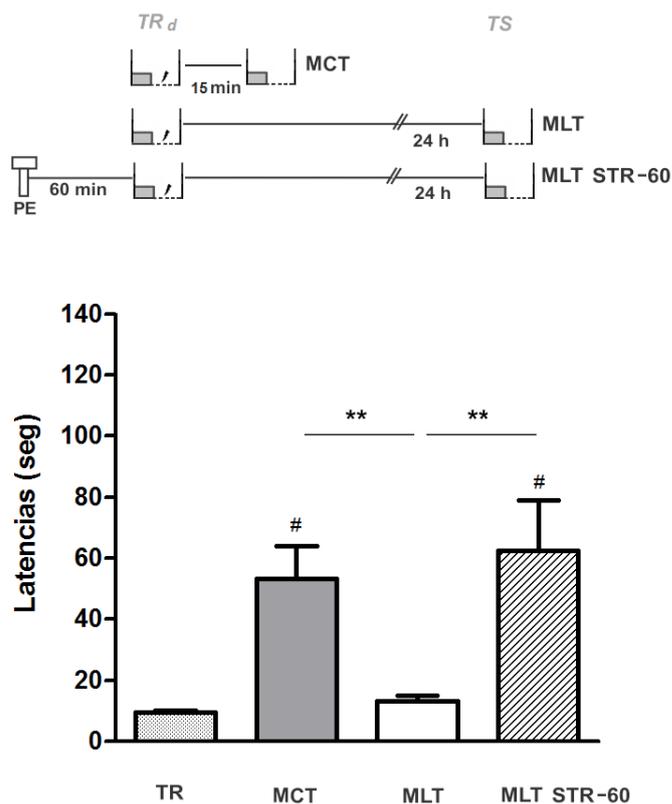


Figura 9. Un evento estresante experimentado una hora antes de un entrenamiento de EI débil promueve la formación de MLT. Un esquema del protocolo experimental se presenta en la parte superior de la figura. Los animales fueron entrenados en el paradigma de EI y grupos independientes de ratas se testearon a 15 min (MCT, n=13) o 24 h (MLT, n=14) luego del TR. Los animales MLT STR -60 (n=10) fueron expuestos a una PE 60 min antes del TR y testeados a 24 hs del mismo. Los datos son expresados como tiempos de Latencia (\pm SEM). Análisis de Newman-Keuls luego del ANOVA de un factor, $F_{(2,34)}=7.05$; ** $p<0.01$ vs MLT; # $p<0.05$ vs TR

vehículo (DMSO 5%), 15 min antes de la PE. El test fue realizado 24 hs después del TR. En la Fig. 10 puede observarse que, como era esperado, los animales CTR no mostraron retención de la tarea ($p>0.05$ vs TR) y aquellos que experimentaron la situación de estrés una hora antes del EI, inyectados con vehículo, sí mostraron MLT ($p<0.05$ vs CTR); en cambio las ratas infundidas con mife no expresaron dicha memoria ($p<0.05$ vs Veh).

Estos resultados permiten afirmar que los receptores de glucocorticoides en el hipocampo dorsal son necesarios para la promoción de la MLT de EI, inducida por la presencia del evento estresante.

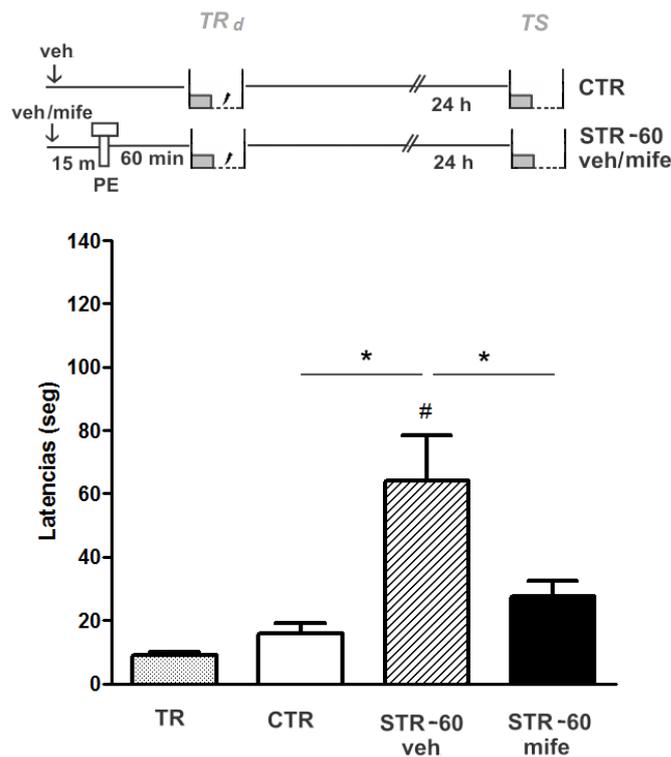


Figura 10. El efecto promotor del estrés sobre la formación de MLT de EI depende de la actividad de GR en el hipocampo dorsal. Un esquema del protocolo experimental es presentado en la parte superior de la figura. Los animales del grupo STR-60 fueron expuestos a la PE 60 min antes del TR y recibieron intra CA-1 infusiones de vehículo (STR-60 veh, n=13) o mifepristona (STR -60 mife, n=9) 15 min antes de la PE. Un grupo de animales que no fue expuesto a la PE se infundió con vehículo (CTRL, n=8). La MLT de EI fue testada 24 hs luego del TR. Los datos son expresados como tiempos de Latencia (\pm SEM). Análisis post-hoc de Newman-Keules, luego del ANOVA de un factor, $F_{(2,27)}=5.15$; * $p<0.05$ vs STR-60 veh; # $p<0.05$ vs TR

El efecto promotor del estrés depende de la síntesis de proteínas

Nuestra hipótesis propone que el aporte de nuevas proteínas es necesario para la formación de una memoria duradera y el evento estresante actuaría como disparador y dador de las PRPs necesarias para la consolidación de la memoria de EI. Para poner a prueba dicha hipótesis, en otra serie de experimentos se estudió la dependencia del fenómeno de promoción por estrés a la síntesis de proteínas. Grupos independientes de ratas fueron inyectados en la región CA1 del hipocampo dorsal con inhibidores de síntesis proteica (aniso o emet) o solución vehículo (sol. fisiológica.); 15 min

luego se expusieron a la PE y pasados 60 min fueron entrenados en la tarea Eld (grupos STR -60). En el caso de los controles, las ratas fueron infundidas con vehículo y no fueron colocadas en la PE. El test fue realizado 24 hs después del TR. En la Fig. 11 se observa que los animales que no atravesaron la situación de estrés tuvieron latencias similares a las del TR ($p>0.05$ vs TR), a diferencia de aquellos estresados 60 min antes del Eld e inyectados con vehículo (STR-60 veh), que generaron una MLT de EI ($p<0.01$ vs CTR). El efecto de promoción inducido por la PE fue bloqueado por la infusión intrahipocampal de aniso o emet ($p<0.01$ emet vs veh; $p<0.05$ aniso vs veh), lo que se evidencia en las latencias obtenidas por estos grupos, similares al grupo control.

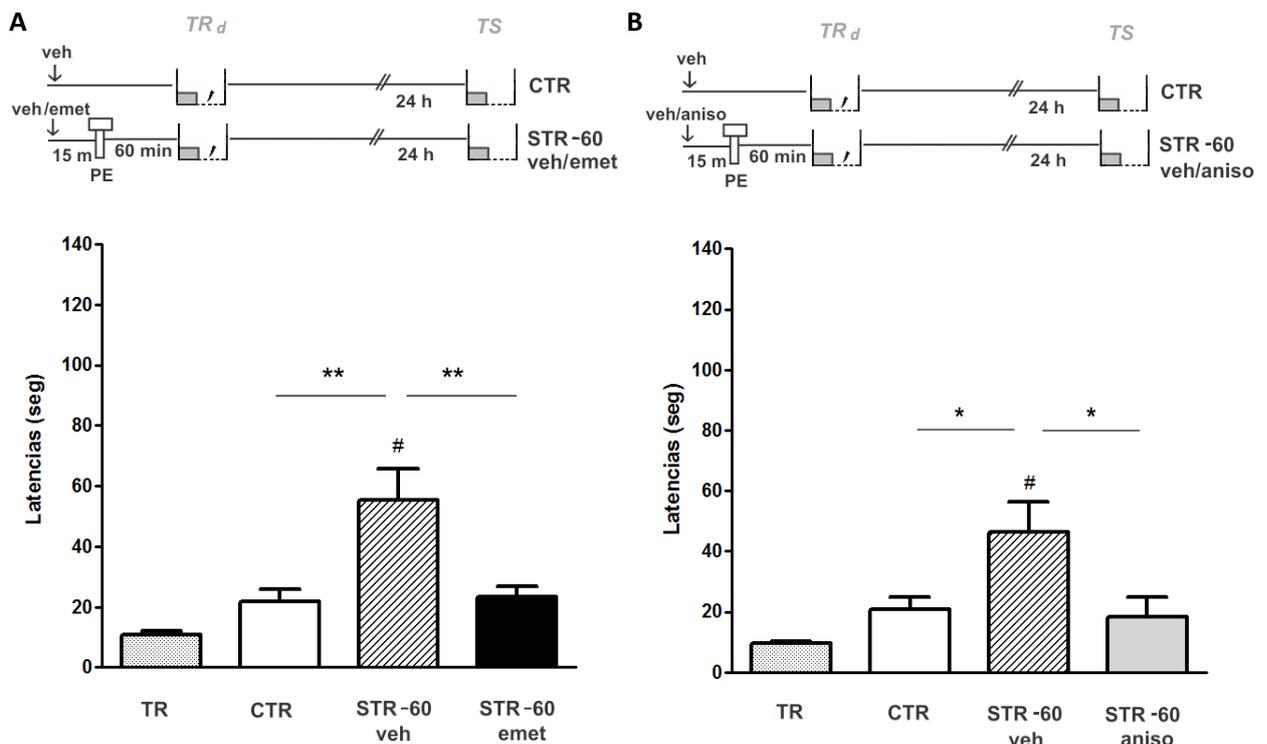


Figura 11. El efecto promotor del estrés sobre la formación de MLT de EI es dependiente de síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal. Los protocolos experimentales se esquematizan en la parte superior de cada figura. A) Los animales se colocaron en la PE 60 min antes del Eld; un grupo recibió, intra CA-1, infusiones de vehículo (STR-60 Veh, $n=17$) mientras otro fue infundido con emetina (STR-60 emet, $n=12$), realizándose ambas infusiones 15 min antes de la PE. El grupo control (CTR, $n=13$) fue expuesto al Eld sin pasar por la PE, pero recibió una infusión de vehículo. La MLT de EI fue testeada 24 hs luego del TR. Los datos son expresados como Latencias (\pm SEM). Análisis post-hoc de Newman-Keules, luego de un ANOVA de un factor, $F_{(2,39)}=6.37$; ** $p<0.01$ vs STR-60 veh; # $p<0.05$ vs TR. B) Idem, solo que se inyectó aniso como inhibidor de síntesis proteica en lugar de emet; n CTR= 8, n STR-60 veh=13, n STR-60 ani=8. Análisis post-hoc de Newman-Keules, luego de un ANOVA de un factor, $F_{(2,27)}= 6.40$; ** $p<0.05$ vs STR-60 veh; # $p<0.05$ vs TR

Estos resultados sugieren que el fenómeno de promoción de la memoria de EI por un evento de estrés es dependiente de la síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal

Existe una ventana de tiempo acotada en que el estrés agudo promueve la formación de MLT de EI.

Decidimos estudiar si la promoción de la MLT por el evento estresante ocurre cuando éste es experimentado a otros tiempos alrededor del TR ¿Existe, como con el paradigma REO, una ventana de tiempo acotada para este fenómeno?

Un grupo de ratas se sometió al entrenamiento de Eid y adicionalmente tres grupos independientes entre sí fueron expuestos, además, a la PE antes o después del TR: un grupo se colocó en la PE 60 min antes del TR (STR PRE -60), otro 30 min después del TR (STR POST +30) y el tercero 60 min después del mismo (STR POST +60), siendo todos los animales testeados a 24 hs post-TR. Como se observa en la Fig. 12 los animales del grupo control (CTR), que no experimentaron la situación de estrés, tuvieron latencias bajas y por lo tanto no evidenciaron MLT ($p > 0.05$ vs TR). En cambio, la PE 60 min antes del TR fue capaz de promover la formación de una MLT de EI ($p < 0.01$ vs CTR), fenómeno que no se observó cuando la PE tuvo lugar 30 o 60 min post-Eid ($p > 0.05$ vs CTR).

Tal como sucedió en el paradigma de REO, existe una ventana temporal crítica en la cual el evento de estrés promueve la formación de una memoria de EI. Únicamente el estrés experimentado una hora antes de una sesión de un entrenamiento que solo produce MCT, puede promover la formación de su MLT.

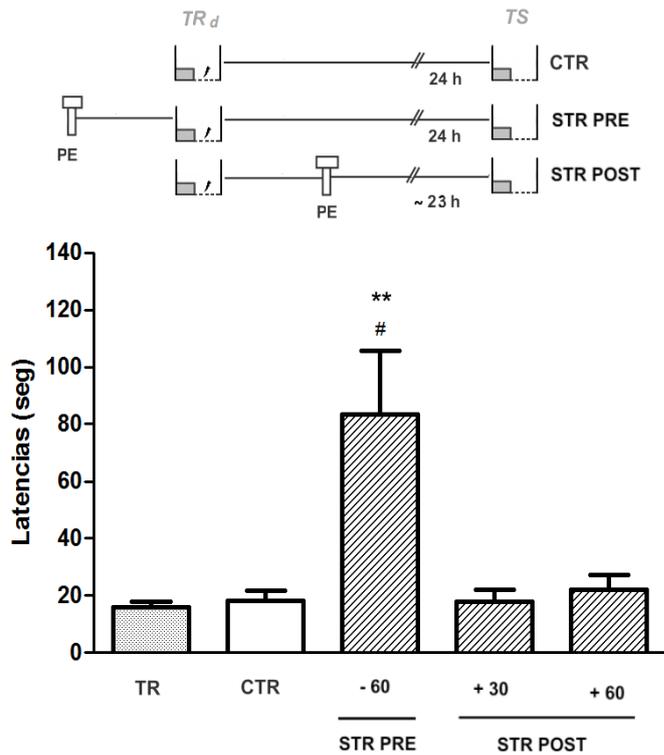


Fig 12. Hay una ventana de tiempo crítica para el efecto promotor del estrés: solo experimentado una hora antes de un entrenamiento de EI débil, promueve la formación de la MLT de EI. El esquema experimental es mostrado en la parte superior de la figura. Los animales fueron expuestos al EI y grupos independientes de ratas fueron colocados, o no (CTR, n=12), en una PE a diferentes tiempos cercanos al TR: 60 min antes (STR PRE -60, n= 12) o 30 o 60 min después (STR POST +30, n= 10; STR POST +60, n=6). La MLT fue registrada 24 hs después del TR. Los datos son expresados como Latencias (\pm SEM). Análisis post-hoc de Dunnet, luego de un ANOVA de un factor, $F_{(3,39)}=6.01$; ** $p<0.01$ vs CTR; # $p<0.05$ vs TR

El estrés experimentado una hora antes de un entrenamiento fuerte de EI interfiere con la MLT de EI.

Otro aspecto del proceso de EC, como hemos visto ya, contempla competencia por los recursos proteicos, en el caso que haya más de una etiqueta capaz de capturar las PRPs y distintas trazas intenten ser consolidadas. En estos casos, una de ellas puede resultar estabilizada en detrimento de la otra.

Así como en el paradigma de REO llevamos a cabo experimentos para poner a prueba si dos aprendizajes fuertes podían interferirse, en el protocolo de EI buscamos responder la misma pregunta. Para ello expusimos a un grupo de ratas a un Elf (CTR) y observamos que los animales formaron una MLT de EI ($p < 0.05$ vs TR). Sin embargo, la presentación de una PE 60 min antes de dicho entrenamiento en un grupo independiente de ratas (STR-60) redujo la memoria en este grupo, ya que se vio una disminución significativa de las latencias ($p < 0.05$ vs CTR, Fig. 13). Estos resultados sugieren que un evento de estrés previo al entrenamiento de EI puede tener distintos efectos: es beneficioso en caso de aprendizajes débiles y perjudicial cuando se encuentra asociado a aprendizajes fuertes.

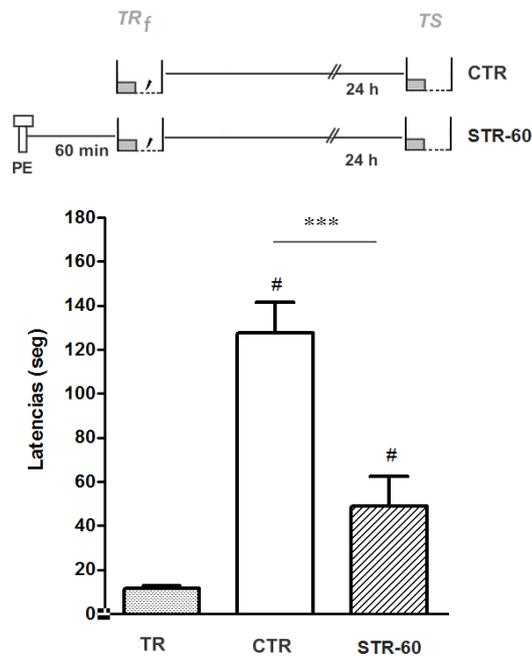


Figura 13. El estrés 60 min antes de un entrenamiento fuerte de EI reduce la MLT de EI. El esquema del protocolo experimental es mostrado en la parte superior de la figura. El grupo control de ratas (CTR, $n=7$) fue expuesto a un Elf, mientras un segundo conjunto de animales fue colocado en la PE 60 min antes de dicho TR (STR-60, $n=8$). El test de la memoria de EI fue realizado 24 hs post-TR. Los datos son expresados como Latencias (\pm SEM). Análisis post-hoc Newman-Keules, luego de un ANOVA de un factor, $F_{(2,27)}=47.48$; $***p < 0.001$; $\# p < 0.05$ vs TR



DISCUSIÓN I

Los eventos de estrés desencadenan la activación del eje HPA, que conduce a la liberación de GC desde las glándulas suprarrenales, y una rápida respuesta del sistema nervioso simpático, mediada fundamentalmente por catecolaminas. La activación de estas vías incide sobre varios órganos y permite desarrollar una respuesta exitosa frente a la situación estresante. En el cerebro son activadas regiones específicas como el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal, las cuales se encuentran enriquecidas con los receptores de las hormonas de estrés (Deppermann y col, 2014; Ness y Calabrese 2016). Allí, estas señales moleculares resultan en una serie de cambios funcionales tales como alteraciones en la actividad sináptica, organización dendrítica y neurogénesis (de Kloet y col 2005; Kim y col 2006; Howland y Wang 2008; Holmes y Wellman 2009; de Kloet 2014).

Existe una gran cantidad de estudios sobre los efectos del estrés en los procesos cognitivos, destacándose principalmente su participación en procesos de aprendizaje y memoria (Roosendaal 2002; Joëls 2006, Joëls y Baram 2009; Finsterwald y Alberini 2014). La influencia del estrés sobre el almacenamiento de la información depende de variados factores: duración del estresor, su intensidad, en qué momento ocurre, qué información está siendo procesada, entre otros. La intensidad del estresor es uno de los factores críticos en su impacto en los procesos cognitivos, y es conocido que, específicamente respecto a la memoria, ambos se relacionan como una U-invertida, encontrándose la máxima capacidad de recordar una tarea cuando los niveles de estrés experimentados son intermedios (ver review Finsterwald y Alberini 2014). Esta relación fue descrita originalmente por Yerkes y Dodson (1908), y enfatiza la importancia del grado de estrés, la complejidad de los aprendizajes y las estructuras involucradas en el procesamiento de la memoria. Distintos trabajos han apoyado que mientras una cantidad limitada de glucocorticoides llevan a efectos positivos sobre la cognición, una concentración muy elevada y la exposición prolongada a ellos tiene efectos perjudiciales, explicándose por qué situaciones de estrés pueden tener efectos opuestos (de Kloet y col 1999; Joëls 2006; Lupien y col 2007).

Así mismo, la influencia del estrés depende de forma crítica de la fase de procesamiento de la memoria a la cual se asocia el evento estresante. La exposición a estresores a tiempos cercanos al aprendizaje suele tener un efecto positivo en la consolidación de la memoria; sin embargo, se ha observado que si el estrés es presentado antes de un test de memoria, en la fase de evocación de la información, generalmente es experimentado un deterioro en la expresión de los recuerdos (Roosendaal 2002; McGaugh y Roosendaal 2002; Roosendaal 2004; Joëls 2011).

En muchos casos los estudios realizados sobre el estrés describen la modulación que ejerce cuando es intrínseco a la tarea de aprendizaje y preferentemente en relación a la consolidación de la memoria (McGaugh 2013; Lalumiere et al, 2017). Se ha estudiado que aumentar la intensidad del estrés durante un aprendizaje no solo suele mejorar las MLTs de distintas tareas (Sandi y Pinelo-Nava 2007), sino que acelera la consolidación de sistemas y la generalización de la memoria en un proceso disparado por la liberación de glucocorticoides y noradrenalina en el hipocampo (Pedraza y col 2016). Una experiencia de estrés extrínseca, sin embargo, también afecta la memoria de aprendizajes temporalmente asociados (Roosendaal 2000; Sandi y Pinelo-Nava 2007; Joëls y Baram 2009). Una teoría unificadora descrita por Joëls y colaboradores (2006) establece que el estrés que ocurre cercano a otro evento, ejerce su acción en algunos circuitos superpuestos y facilita el proceso de aprendizaje y memoria. El estrés influye en la adquisición de información no relacionada y lo hace de una manera tiempo-dependiente, teniendo un efecto potenciador cuando es cercano al aprendizaje y perjudicial o nulo cuando la separación temporal es mayor (Cadle y Zoladz 2015). Estas afirmaciones concuerdan con las premisas de la hipótesis del etiquetado conductual, que considera como requerimientos de la formación de una MLT el establecimiento de una etiqueta o marca durante el aprendizaje y la síntesis de proteínas necesarias para la consolidación, las cuales pueden ser generadas por el mismo aprendizaje o por eventos cercanos (Viola y col, 2014). Así, en este trabajo de tesis nos hemos propuesto estudiar si el estrés afecta positivamente diferentes memorias dentro de una ventana de tiempo específica al proveer las PRPs a los sitios etiquetados por el aprendizaje. Postulamos también que el estrés podría impedir la formación de una memoria “satélite” al afectar

el establecimiento o configuración de la etiqueta del aprendizaje o compitiendo por las PRPs necesarias para la consolidación.

En este capítulo de la tesis, encontramos que un estrés agudo por exposición a una PE presentado posterior al entrenamiento de REO tuvo un efecto promotor de la MLT, dentro de una ventana de tiempo acotada y cuando estuvo asociado a un entrenamiento débil. El efecto promotor del estrés fue bloqueado por inhibidores de la síntesis proteica, anticuerpos anti-BDNF y antagonistas de los GR y MR, todos infundidos en el hipocampo dorsal previo a la PE. Cuando el entrenamiento de REO fue lo suficientemente fuerte, en cambio, el estrés post-entrenamiento impidió la formación de la MLT de esta tarea. En contraste, el estrés experimentado previo al entrenamiento perjudicó específicamente la MLT de REO, sin afectar la MCT. Este efecto fue independiente de la fuerza del entrenamiento y no pudo revertirse por la exposición a un CA, evento inductor de síntesis proteica.

Adicionalmente, observamos que un evento de estrés por PE fue capaz de promover la MLT de EI. Ello ocurrió cuando la PE se presentó antes del entrenamiento débil. La promoción fue dependiente de la síntesis proteica y de la actividad de los GR en hipocampo dorsal (el rol de MR no pudo ser testeado). Como ocurrió con la tarea de REO, la PE impidió la formación de la MLT de EI cuando fue asociada a entrenamientos fuertes.

Nuestros hallazgos en la tarea de REO son consistentes con otros estudios que muestran que el aumento de corticosterona post-TR mejora la memoria de tareas espaciales (Sandi y col 1997; Okuda y col 2004). Así mismo, se observó que una PE luego de un entrenamiento débil es capaz de promover una de memoria de reconocimiento en ratas, a través de un mecanismo que involucra a los GR en la amígdala, pero perjudica una MLT de reconocimiento ya consolidada (Maroun y Akirav 2008; Segev y col 2012).

Los resultados observados en el aprendizaje de EI también muestran congruencia con otros trabajos donde la presentación de estresores o el aumento de corticosterona previo al entrenamiento puede mejorar la MLT de condicionamientos aversivos de la misma u otras tareas (Cordero y col 2003; Manzanares y col 2005; Ganon-Elazar y Akirav 2009; de Oliveira Alvares y col 2010). Experimentos adicionales han mostrado que eventos de estrés o intervenciones

farmacológicas post-TR cercanos al entramiento pueden ejercer influencia sobre la memoria del condicionamiento aversivo pero los resultados son menos homogéneos (Sandi y Pinelo-Nava 2007; Rodrigues y col 2009). En el trabajo realizado por Rau y colaboradores (2005), los autores sugieren que al experimentar durante el aprendizaje eventos similares al estímulo estresante previo, la respuesta al estrés se reactiva y ello puede facilitar o sensibilizar la percepción de estímulos similares o incluso neutros que ahora se perciben como amenazantes. La idea de que estos aprendizajes pueden ser mayormente sensibles a los estresores también es discutida en la revisión realizada por Raio y Phelps (2015), que propone que los circuitos neuronales subyacentes a la regulación de estímulos aversivos se superponen con los sistemas neuronales que organizan la respuesta y recuperación a la exposición al estrés, de manera que experiencias como las aprendidas durante la evitación inhibitoria pueden ser especialmente sensibles a los efectos del estrés. La ventana de tiempo en que el estrés tiene influencia sobre el aprendizaje de EI podría y parece ser distinta a lo observado para paradigmas no aversivos como los de REO.

La regulación que el estrés ejerce involucra tanto a los MR como a los GR, los cuales poseen diferente afinidad por los GC y parecen tener diferentes roles en la adquisición, guardado y evocación de la información (ter Horst y col 2012). La activación de los MR regularía la fase inicial de codificación de la información, incluyendo la respuesta a la novedad, mientras que los GR serían más importantes en el proceso de consolidación. El grado de activación de ambos receptores es crítico en los efectos del estrés sobre la cognición, observándose facilitación de la memoria cuando los receptores de mayor afinidad, los MR, se encuentran ocupados, y los GR, de menor afinidad, parcialmente activados; la saturación de los GR está asociada a los déficits en la memoria (de Kloet y col 1999; Lupien y col 2007). La infusión post-training de corticosterona o agonistas de GR en hipocampo particularmente ha mostrado influenciar distintos tipos de memorias (Roosendaal y McGaugh 1997; McGaugh y Roosendaal 2002; Revest 2005) y está ampliamente estudiado que estos receptores tienen efectos sobre la transcripción de genes en hipocampo, convirtiéndose ésta en una estructura fundamental en la respuesta al estrés (Datson y col 2001; Prager y Johnson 2009; Roosendaal y col 2010). El aporte de nuevas proteínas es necesario para consolidar las MLT y nos preguntamos si los

receptores de glucocorticoides podrían ser los mediadores de este proceso en los casos donde observamos promoción por el evento estresante.

Nuestros resultados permiten observar que, en ambos paradigmas de aprendizaje evaluados, la participación de los receptores de GC es fundamental para la promoción de las MLTs, ya que cuando son bloqueados previo a la PE, no se observa memoria ni para la tarea de REO ni la de EI. Proponemos que los GC inducidos por la situación de estrés interactúan con sus receptores en el hipocampo dorsal y desencadenan la cascada molecular necesaria para la síntesis de nuevas PRPs, requeridas para la consolidación de la información. La infusión en hipocampo dorsal de inhibidores de la síntesis proteica (anisomicina y emetina) previa a la exposición a la PE ha mostrado revertir el efecto promotor del estrés sobre la memoria, lo cual apoya el sugerido rol del evento estresante como dador de las PRPs que permiten el reforzamiento de la traza y la consolidación de la MLT tanto de REO como de EI.

Varias vías de señalización molecular fueron propuestas de ser inducidas por la activación de GR en el hipocampo, incluida la liberación de glutamato, el incremento en la expresión de GluA1 sináptico, como la fosforilación de CaMKII, TrkB y CREB (Finsterwald y Alberini 2014). Dados los efectos del pCREB sobre la transcripción génica, la cual incluye el incremento del mRNA de BDNF y Arc (Ying y col 2002; Barco y col 2005) y los efectos transcripcionales y traduccionales de los GR y MR en el hipocampo (Datson y col 2001; Roozendaal y col 2010), el estrés podría efectivamente incrementar la expresión de la síntesis de proteínas. Es interesante destacar que el receptor de BDNF, TrkB, fue postulado como un potencial componente de la etiqueta comportamental, siendo el BDNF un candidato obvio a ser una de las PRPs (Lu y col 2011). Adicionalmente, hay resultados que sugieren el rol de Arc, GluA1 y Homer -1a como diferentes moléculas que actúan como PRPs (Moncada y col 2015).

Si bien se han identificado cambios en la expresión de numerosas proteínas en relación con eventos de plasticidad sináptica y la formación de memorias (Arthur y col. 2004; Bramham y col 2008; Alberini 2009), decidimos estudiar el rol de BDNF en la promoción de la memoria por estrés, dado los antecedentes citados anteriormente, sus reconocidos efectos promnésicos y su rol tanto en la

formación de sinapsis como en la plasticidad sináptica (Lu 2014; Bekinschtein 2014). En el paradigma de REO, demostramos que la infusión de anticuerpos anti-BDNF previo al evento estresante bloquea la promoción de la memoria, pudiendo ser una de las proteínas necesarias en la consolidación de esta tarea. En el trabajo de Revest y colaboradores (2014) fue reportado que el incremento en la liberación de GC por estrés induce la expresión de pro-BDNF y el activador tisular del plasminógeno, que permite un procesamiento proteolítico adicional del pro-BDNF en BDNF. Así mismo, ha sido mostrado que la experiencia de un estrés de corta duración puede inducir un aumento significativo en los niveles de ARNm de BDNF en todo el hipocampo de rata, seguido de un incremento en el nivel de proteína de BDNF, probablemente por los efectos de los GC en la liberación de glutamato en el hipocampo (Marmigère y col 2003). También se ha documentado el aumento de BDNF por la activación de GR (Chen y col 2012; Depperman y col 2014). En línea con nuestros resultados, estudios más recientes han demostrado que la amnesia generada por anisomicina en un paradigma de REO puede ser revertida con la infusión de BDNF en el hipocampo dorsal, lo cual sugiere un importante rol del BDNF como producto de la síntesis de proteínas requerida para la consolidación de esta tarea (Aarse y col 2016; Ozawa y col 2014).

Otro aspecto importante del proceso de EC es que la etiqueta establecida por un entrenamiento débil puede utilizar las PRPs inducidas por un evento adicional que ocurra tanto antes del entrenamiento como posterior a él. De acuerdo al modelo propuesto, las etiquetas y PRPs deben estar presentes al mismo tiempo y en el mismo sustrato neural, sin importar el orden en que ocurra la síntesis de dichas proteínas y el marcado de los sitios neuronales. Sin embargo, en este trabajo hemos observado que mientras una PE experimentada por los animales 60 min luego del entrenamiento débil de REO tuvo efectos promotores sobre la memoria, una PE presentada 60 min antes del REO no permitió la promoción de la MLT. Hallazgos previos utilizando distintos estresores sobre la MLT de un laberinto espacial acuático concuerdan con estos resultados (Kim y col 2005; Park y 2008). El efecto negativo que observamos de la PE previa al entrenamiento de REO fue específico sobre la consolidación de la memoria, permaneciendo la adquisición y la expresión de la MCT intacta. Además, este efecto no pudo ser revertido por la exposición adicional a un segundo evento inductor

de PRPs como es el CA, lo cual sugiere que la amnesia no se debe a que los recursos proteicos necesarios en el proceso de consolidación son limitados, sino probablemente a un efecto negativo sobre la etiqueta del aprendizaje. La PE previa al REO puede estar impidiendo el establecimiento de la etiqueta inducida por el aprendizaje e independientemente del suministro de PRPs por estrés, la MLT de REO no puede ser consolidada porque no hay sitios marcados que capturen dichas PRPs. Una posible explicación a este efecto del estrés considera el "priming" o preconditionamiento: un primer cambio en la plasticidad sináptica condiciona un cambio posterior. Este fenómeno, referido como metaplasticidad (Abraham y Bear 1996), si bien se definió y estudió inicialmente a nivel sináptico y celular, resulta útil para describir los cambios de plasticidad a un nivel más global, referido como "metaplasticidad conductual" (Schmidt et al, 2013). El establecimiento de la etiqueta no requiere síntesis de proteínas, y está basado en cambios postraduccionales y un reensamblaje del citoesqueleto que lleva a cambios en la morfología de las espinas dendríticas (Martin y Kosik 2002; Frey S y Frey J 2008; Ramachandran y Frey 2009; Redondo y Morris 2011). Sugerimos entonces que los cambios sinápticos inducidos por la exposición a la PE podrían afectar las modificaciones sinápticas subsiguientes inducidas por un entrenamiento de REO, afectando la etiqueta y conduciendo al detrimento en la formación de la MLT de REO.

¿Pero por qué la PE previa al aprendizaje tiene efectos perjudiciales en la formación de la MLT de REO y no en la de EI?. La hipótesis de plasticidad sináptica y memoria (Martin y col 2000) establece que la actividad neural inducida por el aprendizaje dispara cambios en la fuerza de las conexiones sinápticas y que esta plasticidad, en las sinapsis adecuadas, es necesaria para el almacenamiento de la información. Estos cambios pueden involucrar tanto una regulación positiva como negativa de la fuerza sináptica, y generar fenómenos de LTP como de LTD, respectivamente, que se asumen como el mecanismo por el cual las trazas de memoria se codifican y almacenan (Martin y Morris 2002; Izquierdo y col 2006). Bajo el marco de la hipótesis de STC debe considerarse que las etiquetas asociadas a procesos de LTP presentan diferencias moleculares a las inducidas por LTD (Navakkode y col 2005; Sajikumar y col 2007; Redondo y col 2010) y ello podría responder porque el estrés tiene diferentes efectos sobre aprendizajes distintos, lo cual se discute a continuación.

De acuerdo a la bibliografía, las tareas espaciales no aversivas inducirían fenómenos de plasticidad similar al LTD. Registros en la región hipocampal CA1 en roedores con libertad de movimiento muestran que aprendizajes sobre espacios novedosos disparan LTD endógenos (Goh y Manahan-Vaughan 2013). Específicamente el LTD fue observado en ratones que aprendieron sobre constelaciones de objetos o fueron expuestos a la tarea de REO, sugiriendo un rol crítico de este tipo de plasticidad sináptica en la formación de la memoria hipocampo-dependiente. Estos resultados acuerdan con el rol sugerido del LTD en el reconocimiento de objetos y la exploración espacial en ratas (Kemp y Manahan-Vaughan 2004, Dong y col 2012). Sin embargo, el aprendizaje de condicionamientos tales como el de El está relacionado con procesos similares a LTP (Whitlock 2006).

En la literatura se ha descrito que diferentes tipos de plasticidad sináptica podrían estar asociados a distintos tipos de etiquetas en el sustrato neuronal. Cada una de las tareas de aprendizaje utilizadas en esta tesis podría generar entonces etiquetas diferentes. Mediante experimentos electrofisiológicos bajo el modelo de etiquetado sináptico se observó que la etiqueta asociada a eventos de LTP requiere de la actividad de α CAMKII, PKA y PKMz. Por otra parte, ERK 1/2 es requerida para el establecimiento de etiquetas asociadas a fenómenos de LTD (Navakkode 2005; Sajikumar 2007; Redondo 2010). Estos datos son consistentes con los resultados de Moncada y col (2011) donde se ve que la etiqueta de El requiere α CAMKII, PKA y PKMz pero no de las quinasas ERK 1/2. Experimentos recientes en nuestro laboratorio, aún no publicados, sugieren que la activación de ERK 1/2 al momento del aprendizaje de REO es necesaria para el establecimiento de la etiqueta conductual; en ellos observamos que la infusión en hipocampo dorsal de U0126 (inhibidor de MEKs que activan ERK 1/2) previo a un entrenamiento débil de REO impide la promoción de la MLT inducida por la exploración de un CA. La actividad de α CAMKII, PKA, PKMz y ERK 1/2 parecería ser requerida por un periodo de tiempo acotado y distintas intervenciones pueden interrumpir el establecimiento de etiquetas específicas.

Los eventos de estrés muestran resultados más heterogéneos y algunos trabajos describen cambios en la plasticidad hipocampal que lo asocian con el LTP mientras otros con el LTD (Blank y col 2002; Diamond y col 2004; Rodrigues y col 2009; Fan y col 2019). Esto podría depender incluso de

distintas características del estresor (Rodrigues y col 2009; de Kloet y col 1999). De cualquier forma, dado que los paradigmas de aprendizaje de REO y de EI parecen inducir mecanismos de plasticidad sináptica opuestos, la interacción previa con un evento de estrés agudo podría generar como resultado que en un caso la PE obstaculice los eventos moleculares necesarios para establecer la etiqueta mientras que en el otro no.

La hipótesis del EC postula que una única experiencia de aprendizaje con características débiles no puede inducir la síntesis de PRPs necesarias para el establecimiento de la traza, pero sí puede activar en el sustrato neuronal una etiqueta. Un segundo evento, fuerte e independiente, que afecte la misma población neuronal será entonces el que contribuya a la consolidación de la memoria brindando dichas PRPs, que serán capturadas por la etiqueta y permitirán los procesos de plasticidad duraderos selectivamente en los inputs activados por el estímulo débil. Ello predice una ventana de efectividad dado por la convergencia de proteínas, sintetizadas producto del estrés en nuestro protocolo, y su captura hacia la marca inducida por el aprendizaje débil de REO o EI, ya que tanto los procesos de etiquetado como de síntesis/degradación de PRPs tienen una duración transitoria y una cinética particular. Si las PRPs están presentes cuando la etiqueta ya decayó el mecanismo de captura no debería funcionar (Viola y col 2014). Sugerimos que esta es la razón por la cual la PE 90 minutos después de un entrenamiento débil de REO no promueve una MLT de esta tarea. Así mismo, la ausencia de promoción de la memoria de REO cuando la PE es experimentada 30 min antes o después de la tarea podría deberse a que el estrés en ventanas de tiempo más cercanas a este entrenamiento impide el establecimiento y mantenimiento de la etiqueta de REO. Una ventana temporal crítica pudo observarse también para la promoción de la MLT de EI, pero diferente a la de REO; pensamos que si las etiquetas son diferentes en cada uno de los aprendizajes experimentados, la interacción con las PRPs brindadas por el evento de estrés y la dinámica de estos procesos pueden ser disímiles en ambos paradigmas. En el caso de la tarea de EI la exposición a una PE 30 o 60 minutos luego de un entrenamiento débil no generó promoción de la memoria y ello podría suceder de verse afectado el proceso de etiquetado o por el decaimiento de la etiqueta respectivamente.

Finalmente, la hipótesis de EC predice que las etiquetas generadas por diferentes eventos y localizadas en una población de neuronas en común pueden competir en la captura de las PRPs disponibles (Moncada y col 2015). Un entrenamiento débil que establece una etiqueta, pero es incapaz de sintetizar PRPs, puede solamente beneficiarse con las PRPs provenientes de la experiencia de otros eventos. Sin embargo, cuando dos eventos lo suficientemente salientes establecen sus propias etiquetas e inducen sus propias PRPs, éstas podrán ser capturadas hacia cualquiera de los tipos de etiquetas establecidas, surgiendo una competencia por la formación de MLTs. Sugerimos que esto podría suceder en los casos donde la PE tuvo efectos perjudiciales sobre la MLT generada por un aprendizaje fuerte. En la tarea de REO esto fue observado cuando la PE fue experimentada 60 min post-entrenamiento fuerte. De hecho, el suministro extra de PRPs por un CA 60 minutos antes de dicho entrenamiento previene el efecto deletéreo, sugiriendo que la etiqueta gatillada por este aprendizaje se encuentra activa y que las PRPs adicionales permiten recuperar la MLT. Por otro lado, observamos que la PE tuvo efectos negativos sobre la MLT de EI obtenida de un entrenamiento fuerte cuando tuvo lugar 60 min antes del mismo. Es interesante recalcar que los tiempos a los que vimos la modulación negativa del estrés sobre la MLT son los mismos en que se observan los fenómenos de promoción cuando los entrenamientos son débiles; ello apoya la existencia de una ventana específica y crítica para la interacción particular entre el evento de estrés y el aprendizaje de cada una de las diferentes tareas. Fenómenos de competencia de PRPs fueron observados a nivel celular entre sinapsis activadas (Fonseca y col 2004; Govindarajan y col 2011) y también a nivel conductual; en este último caso se observó que cuando una traza de memoria está siendo consolidada, la ejecución de un segundo aprendizaje fuerte en otra tarea interfiere con la consolidación de la primera (Martinez y col 2014; Villar y col 2016).

En conclusión, nuestros resultados en roedores muestran que un estrés agudo afecta la formación de una memoria "satélite" de REO o EI. Un evento de estrés una hora posterior a un entrenamiento de REO es capaz de promocionar una memoria duradera, si la sesión de entrenamiento es débil; sin embargo el mismo estrés impide la formación de la MLT de REO cuando el entrenamiento es fuerte. La experiencia estresante siempre previene la formación de la MLT de

REO cuando se experimenta antes de un entrenamiento de REO, sea éste débil o fuerte. En cambio, un evento estresante una hora antes de un entrenamiento de EI puede promocionar la memoria de condicionamiento aversivo, si la sesión de entrenamiento es débil, ya que si la sesión de aprendizaje es fuerte el estrés modula negativamente la MLT. El estrés no permite la formación de la MLT de EI cuando ocurre después del entrenamiento.

Hemos discutido nuestros resultados de acuerdo a las predicciones de la hipótesis del EC, y en este sentido, al sumar el marco conceptual del EC a los de "etiquetado sináptico y captura" y "etiquetado emocional", surge un mecanismo fisiológico global para explicar la promoción y los efectos benéficos como deletéreos del estrés sobre la formación de MLTs de aprendizajes no relacionados, pero temporalmente cercanos.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que los mecanismos celulares y moleculares desencadenados por el estrés interactúan en el hipocampo dorsal con los inducidos por el entrenamiento, permitiendo o no la formación de una MLT de REO o EI, de acuerdo a las predicciones del EC. Debido al rol protagónico del hipocampo en estos paradigmas de aprendizaje y memoria, hemos estudiado los efectos del estrés a través de intervenciones farmacológicas en dicha estructura, pero debemos advertir que la respuesta de estrés es un fenómeno muy complejo que involucra también a otras áreas cerebrales. Los múltiples efectos del estrés sobre la amígdala, por ejemplo, y su impacto en regiones del cerebro con las cuales se conecta, incluido el hipocampo, afectarían los diferentes procesos de plasticidad sináptica y memoria (Richter-Levin y Maroun, 2010; McGaugh, 2013). Incluso la administración de agonistas de los GR en corteza prefrontal medial ha mostrado también tener efectos sobre la etapa de consolidación (Roosendaal 2009 JN) considerando la importancia de esta estructura en los efectos del estrés.



CAPÍTULO II:
Efectos del estrés sobre el
aprendizaje y la memoria en humanos



MATERIALES Y MÉTODOS II

SUJETOS EXPERIMENTALES

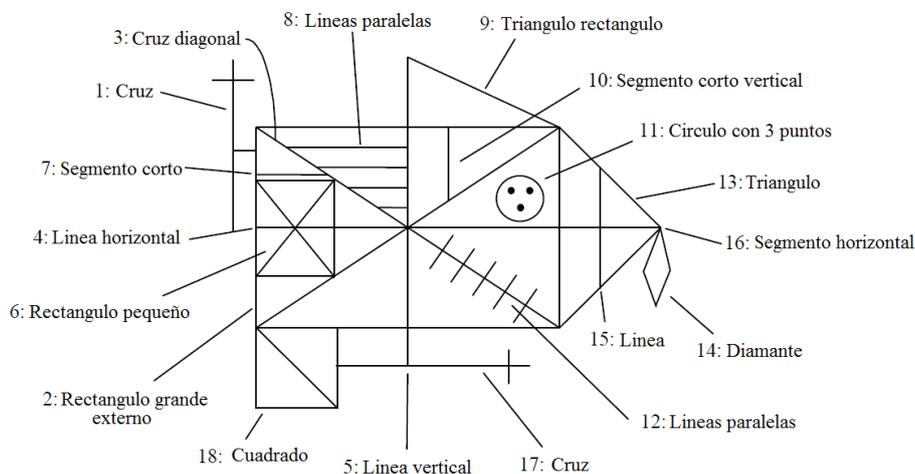
637 estudiantes de entre 12 y 17 años de seis escuelas diferentes de la Ciudad de Buenos Aires participaron de las actividades, sin tener ninguno de ellos experiencias previas en las tareas presentadas. En la sección de resultados se incluye una tabla detallando las escuelas que participaron, los cursos de estudiantes y otros detalles pertinentes.

El estudio fue llevado a cabo con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, siendo los procedimientos revisados y aprobados por la máxima autoridad de las instituciones educativas participantes. Así mismo, un consentimiento fue firmado por los padres de los estudiantes. Los estudiantes desconocían el protocolo de actividades, las realizaron de forma anónima y existió la posibilidad de retirarse de las actividades en cualquier momento que lo desearan.

FIGURA DE REY OSTERRIETH

Con el objetivo de estudiar los efectos del estrés sobre una memoria gráfica, elegimos enseñarles un dibujo a los estudiantes y evaluar la MLT formada del mismo. El protocolo que diseñamos estuvo basado en el Test de la figura de Rey Osterrieth (Rey 1959; Ballarini y col 2013). En éste test se presenta a los participantes una figura geométrica compuesta por 18 elementos (Esquema 9), que luego serán evaluados según la posición y la forma en la que son realizados por cada individuo. La elección de este paradigma se apoya en la existencia de una cuantificación estandarizada de los elementos que son parte de la figura y, por otro lado, en que resulta una imagen desconocida en la currícula escolar, asegurándonos que la información codificada por los estudiantes

es nueva y no existe ningún “background” o experiencia previa que pueda ayudarlos a recordar mejor esta información aprendida.

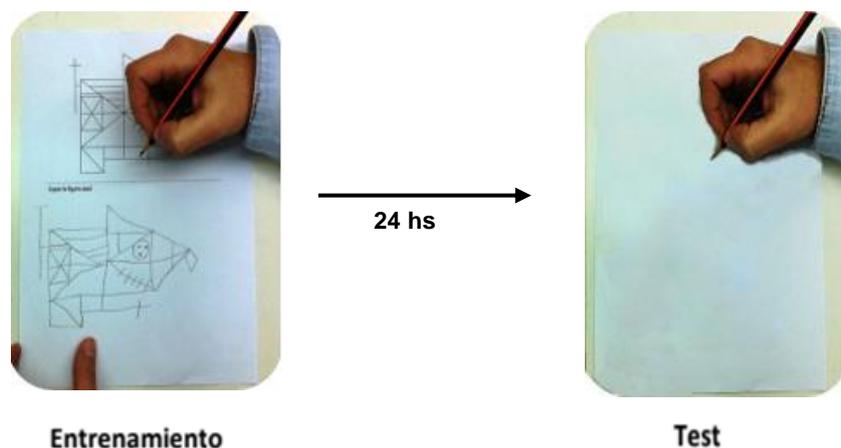


Esquema 9. Figura de Rey utilizada en los protocolos de aprendizaje en el aula. Consta de 18 elementos que se analizaron según como fueron copiados en el TR y cómo luego se dibujaron en el TS

En lo que llamamos el día del entrenamiento (TR) los alumnos recibieron una hoja con la figura de Rey y se les solicitó copiarlo a mano alzada en la parte inferior de la misma (en blanco), en un periodo de 5 minutos. Una vez finalizada la copia, las hojas fueron recogidas. El test (TS) de la MLT se efectuó 24 hs después, al pedir a los estudiantes dibujar nuevamente, en 5 minutos, la figura de Rey, para lo cual se les entregó una hoja en blanco (Esquema 10). Tanto las actividades del TR como las del TS fueron dirigidas por los investigadores.

Finalizado el testeo, se analizaron los dibujos realizados y se calculó para cada estudiante cuál fue el índice de retención individual, tomando en consideración cada uno de los 18 elementos especificados anteriormente y comparándolos contra sí mismos en la copia realizada el día anterior. Se analizó la ubicación, precisión y organización de los elementos de acuerdo al esquema de puntaje estandarizado de Rey-Osterrieth's (Shin et al 2006). Brevemente, cuando un elemento no es dibujado obtiene un puntaje de 0 (nulo); si es dibujado pero en una ubicación incorrecta y con errores, el puntaje obtenido es 0.5 (bajo); si el elemento se encuentra en la posición correcta pero con errores,

así como en la posición incorrecta pero dibujado con precisión, el puntaje otorgado es 1 (medio). Solo cuando tanto la ubicación como el dibujo son correctos, sin errores, el puntaje es de 2 (máximo). De esta manera, cuando la figura es dibujada a la perfección se le otorgan 36 puntos (2 por cada uno de los 18 elementos). Se calculó para cada estudiante, entonces, lo que denominamos *Índice de Memoria*: proporción entre la performance obtenida en el dibujo realizado el día del TS y la obtenida al dibujar la figura en el día del TR. Como podemos notar, la copia de la figura el día del TR es importante para nosotros, ya que si un elemento no es dibujado en ese momento no es evaluado en el día del TS. También cuantificamos los elementos con puntaje nulo, bajo, medio o máximo y comparamos cada una de esas cantidades con la cantidad total de elementos, calculando de esta forma la *Proporción de Puntajes* obtenida por los estudiantes el día del TS. Este parámetro es un número entre 0 y 1.



Esquema 10. Protocolo para evaluar una memoria gráfica en estudiantes. Durante el TR los alumnos realizan una copia de la Figura de Rey Osterriett. Un día después, durante el TS, se les pide a los alumnos volver a dibujar la figura, según lo que recuerden

Los estudiantes fueron asignados a diferentes grupos según si tuvieron el día del TR, o no, un examen en el aula. Aquellos cursos que a tiempos anteriores o posteriores de la copia de la figura de Rey (entre 0 y 4 hs, según el curso) tuvieron un examen curricular, por escrito, dentro del aula, fueron asignados como grupos examen (EXM). Los cursos sin examen en el día de la copia fueron

denominados como grupos control (CTR). En el día del TS, ninguno de los grupos tuvo exámenes. El examen en todos los casos fue establecido con anticipación y aplicado por los docentes.

Se compararon entonces los índices de memoria y la proporción de puntajes obtenidos entre un grupo CTR y su grupo EXM. Siempre fue asignado a priori el grupo de estudiantes CTR a compararse con el grupo EXM, ya que el objetivo fue analizar pares de cursos provenientes de la misma institución y con estudiantes en condiciones comparables (misma edad, con similares experiencias educativas y ocurriendo el TR en el mismo día y al mismo momento). De esta forma los pares comparados fueron cursos del mismo año escolar pero distinta división. En algunos casos trabajamos con escuelas con tres divisiones por año, y en esos casos una de las divisiones fue asignada como grupo CTR y las otras dos resultaron grupos EXM diferentes, es decir con evaluaciones a distinto momento respecto de la copia de la figura. Un dado grupo CTR siempre fue pareado y comparado con su grupo EXM específico.

Adicionalmente se registró y se tomó en cuenta para un análisis posterior, el sexo de los alumnos.

EXAMEN

En una revisión reciente acerca de las implicancias del estrés en clase, Vogel y Schwabe (2016) discuten que los exámenes pueden fácilmente causar estrés en los estudiantes y que su intensidad depende en parte de la demanda cognitiva que ellos representan y la multiplicidad con que son presentados. Nosotros acordamos con estos conceptos y resaltamos la ventaja de nuestro protocolo, donde no hay exámenes masivos, sino una sola evaluación en el día en que los alumnos copian la Figura de Rey; dichos exámenes, además, fueron programados con anticipación por cada profesor,

siendo la fecha y el momento de evaluación conocido por los estudiantes, y consisten en testeos de rutina con una demanda cognitiva moderada.

Incluso, al buscar información sobre los niveles de estrés reportados frente a distintos tipos de estresores agudos, notamos que atravesar un evento de estrés psicosocial (con una duración de unos 30 minutos, en niños entre 9 y 11 años) conlleva un aumento de cortisol promedio relativamente pequeño (aumento promedio de 1.1 nmol/l). Los autores de este trabajo (de Veld y col 2014) se refieren a este estresor como uno leve. Por otro lado, una situación de estrés lograda en hombres y mujeres (con edades entre 18 y 35 años) por mantener el brazo en agua fría por 2 minutos, generó un aumento de cortisol que duplicó el basal y fue considerado, nuevamente, como un evento moderado de estrés (Hupbach y Fieman 2012).

Teniendo en cuenta estos datos, razonamos que los exámenes representan para los estudiantes situaciones de estrés moderado, y con esta premisa en mente evaluamos los efectos de un examen sobre otro aprendizaje en el aula, en este caso la Figura de Rey-Osterrieth.

Para saber cuán estresantes resultaron los exámenes en nuestro estudio particularmente, decidimos llevar a cabo una encuesta entre los estudiantes. Si bien la manera ideal de medir el nivel de estrés inducido por los exámenes es medir los niveles de cortisol de los sujetos que participaron, esto planteó la necesidad de tomar muestras de salivas de cada uno de los alumnos, un procedimiento que requería de otros permisos en el contexto en el cual llevamos a cabo la investigación. De esta manera, decidimos preguntar a los alumnos sobre el nivel de nerviosismo que ellos sintieron durante el examen; en esta encuesta recogimos información del examen (materia evaluada, momento del día en que ocurrió, cuánto duró, etc) y le pedimos específicamente a los estudiantes que elijan una cara dentro de una escala que contenía cinco opciones, redondeando con un círculo aquella que representara mejor cuál fue su estado al realizar el examen (Esquema 11). Esto fue llevado a cabo en una muestra de la población estudiantil (n=243).



Esquema 11. Escala con caras para que los alumnos identifiquen su nivel de nerviosismo al momento del examen; dicha escala se valoro del 1 al 5, siendo 1 el nivel de nerviosismo mas bajo y 5 el mas alto.

Los exámenes fueron sobre las principales asignaturas de la currícula secundaria (ej Matematica, Biologia, Historia), fueron tomados por sus docentes, requirieron respuestas escritas a mano y tuvieron la misma duración (aproximadamente una hora). Los alumnos conocieron en todos los casos la fecha de los exámenes, pero no fueron advertidos de las actividades experimentales llevadas a cabo por los investigadores, es decir que no supieron hasta el día del TR que debían realizar una copia de la figura de Rey ni tampoco fueron informados, una vez realizada esta actividad, que deberían realizar un test de memoria al día siguiente. No tomamos en cuenta el resultado de los exámenes en nuestro estudio, solo fueron considerados como estresores.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO GENERAL

Los análisis estadísticos de los datos recogidos en las escuelas fueron realizados usando el software Graph Pad Prism. Las diferencias entre grupos fueron determinadas usando el test t-Student no pareado y ANOVAS de uno o dos factores (estas últimas para aquellos casos en donde además del efecto de un examen, se estudió un posible efecto del género de los estudiantes).



RESULTADOS II

En esta última sección se mostrarán los resultados obtenidos en humanos acerca de la formación de memorias duraderas bajo un entorno de estrés.

Estudios previos en nuestro laboratorio fueron realizados en el ámbito educativo con el objetivo de conocer qué factores influyen el aprendizaje y la memoria dentro del aula y cuál es la forma en que lo hacen. En estos estudios se ha mostrado que un evento novedoso dentro de la escuela promueve la consolidación de MLTs tanto de contenido literario como de una tarea gráfica (Ballarini y col 2013). Análisis de los requerimientos temporales o de la familiaridad o novedad del evento, por ejemplo, han permitido sugerir que el mecanismo de EC puede ser subyacente a este fenómeno.

Otros trabajos realizados en contextos educativos (ver Vogel y Schwabe 2016) han mostrado que también el estrés tiene efecto sobre la memoria de aprendizajes realizados dentro del aula y nos preguntamos entonces ¿Qué efectos tiene un estrés relacionado a la enseñanza escolar sobre la formación de otras memorias? ¿existe un fenómeno de promoción por estrés sobre la memoria en humanos? Si es así, ¿podría explicarse mediante el EC? Los experimentos reunidos a continuación han intentado responder estas preguntas.

Los exámenes resultan situaciones de estrés moderado

Para evaluar los efectos del estrés sobre aprendizajes en el aula elegimos como factor estresante la presentación de exámenes. Para determinar si los mismos fueron percibidos como estresores durante nuestras actividades particularmente, decidimos llevar a cabo una encuesta entre los estudiantes. En ella les preguntamos sobre el nivel de nerviosismo percibido durante el examen realizado y les pedimos específicamente que elijan dentro de una escala con cinco opciones (con

valor de 1 a 5 en sentido creciente de nerviosismo), aquella que representara mejor cual fue su estado al realizar el examen.

Los datos mostraron que la media por curso estuvo entre los valores 2,5 y 3,5. De esta manera, pensamos que, en promedio, los exámenes actuaron como factores estresantes moderados en esta muestra de estudiantes.

Los exámenes pueden tener efectos beneficiosos o perjudiciales sobre una MLT gráfica

El protocolo diseñado tuvo como objetivo testear una memoria gráfica, y utilizamos para ello la Figura de Rey Osterrieth. Durante el TR, esta figura fue entregada impresa en una hoja a todos los estudiantes para que realicen una copia de ella. En el TS, 24 hs después, se les pidió dibujar lo que recordaban. Tomando en consideración la ubicación y precisión con que fueron dibujados los elementos que componen la Figura de Rey se calculó para cada estudiante un índice de memoria.

La MLT se evaluó en dos situaciones diferentes: cuando los cursos experimentaron un examen escrito el día del TR, a un tiempo en particular antes o después del aprendizaje de la figura (Grupos Examen- EXM) y en cursos libre de evaluaciones (Grupos Control –CTR). Un determinado grupo CTR siempre fue pareado y comparado con un grupo EXM específico, asignado a priori.

Al analizar los resultados, notamos diferencias en los índices de memoria obtenidos en los grupos de estudiantes CTR pertenecientes a diferentes instituciones educativas y observamos que el examen parecía tener efectos diferentes dependiendo de este estado basal. Mientras algunos de los grupos CTR alcanzaron un índice de memoria cercano a 0.5 (retención débil- CTRd), otros obtuvieron valores cercanos o a 0.6 (retención fuerte- CTRf). Los CTRd se compararon a través de un ANOVA de un factor y no encontramos diferencias significativas entre ellos ($F_{(6,150)}=0.74$; $p=0,62$); lo mismo sucedió entre los grupos CTRf ($F_{(6,167)}=1.72$; $p=0,12$). Pero la comparación entre los CTRd y CTRf arrojó

una diferencia significativa entre ellos (índice de memoria (\pm SEM), CTRd: 0.49 ± 0.01 vs CTRf: 0.59 ± 0.01 ; $t_{(12)}=6.65$; $p<0.001$), razón por la cual estos grupos CTR fueron analizados por separado, comparándose luego cada uno con sus correspondientes grupos EXM. Dentro de la misma institución educativa, los grupos CTR siempre pertenecieron al mismo tipo (es decir algunas instituciones tuvieron CTRd y otras CTRf).

Luego, combinamos un máximo de dos pares de cursos de la misma condición experimental (igual momento del examen), en el que el tipo de control también era el mismo. Analizamos entonces posibles diferencias entre los estudiantes de los grupos CTR y EXM.

Toda la información acerca de las escuelas involucradas, los cursos, edad y sexo de los estudiantes, para todas las condiciones experimentales se muestra en la Tabla 1.

Al analizar la performance de los estudiantes en el TR, notamos que alrededor del 85% de los participantes copiaron la figura por completo, mientras el 12% no copió un elemento y el 3% no copio 2 de ellos. Sin embargo, cuando comparamos mediante un ANOVA el índice de memoria entre los estudiantes que copiaron la totalidad de la figura con aquellos que olvidaron algún elemento, no se vieron diferencias significativas entre esos grupos, ni para los CTRd ($F_{(2,53)}=1.24$; $p=0.30$) ni para los CTRf ($F_{(2,55)}=0.04$; $p=0.96$). De esta manera, la mayor parte de los estudiantes copian la figura en su totalidad (u omiten solo uno o dos elementos) y no esperamos que sea un factor que genere cambios en el índice de memoria de los estudiantes.

En la Fig. 14 se muestran los resultados obtenidos en el testeo de la MLT para los grupos con CTRd. Todos estos controles mostraron un índice de memoria cercano a 0.5 y significativamente menor a 0.6 (Test 't' de una muestra vs 0.5: $p>0.05$; vs 0.6 $p<0.05$). De acuerdo con el momento en que se realizó el examen, los grupos fueron asignados a distintas condiciones experimentales: -0, -0.5, -1, -4 (cuando el examen tuvo lugar inmediatamente antes del TR, media, una o cuatro horas antes) o +0.5, +1, +2 (cuando el exámen se realizó media, una o dos horas post-TR). Los estudiantes que experimentaron el exámen 1 hora luego de la copia de la figura demostraron mejor retención de la misma, con un índice de memoria mayor que su grupo control (EXM+1 vs CTRd, $t_{(59)}=3.30$

Tabla 1. Detalle sobre escuelas, cursos, edad y sexo de los estudiantes según su condición experimental

Escuela	Privado/Publico	Cursos	Edad promedio	Estudiantes sexo F	Estudiantes Sexo M	CTR/EXM	Condición Extal (h)	Debil (D)/Fuerte (F)
SA	Privado	1ºA	13	11	12	CTR	-4	F
		1ºC	13	9	12	EXM	-4	F
		1ºB	13	10	6	CTR	-1	F
		1ºA	13	12	5	EXM	-1	F
		1ºC	13	12	7	EXM	-1	F
		2ºC	14	6	15	CTR	1	F
		2ºB	14	11	8	EXM	1	F
SJP	Privado	3ºP	14	0	19	CTR	-0.5	F
		3ºJ	14	0	17	EXM	-0.5	F
		3ºP	14	0	20	CTR	+0	F
		3ºS	14	0	19	EXM	+0	F
		5ºJ	16	0	18	CTR	4	F
		5ºE	16	0	11	EXM	4	F
		5ºC	16	0	6	EXM	4	F
CNBA	Publico	4º11	16	10	10	CTR	-0.5	F
		4º10	16	10	6	EXM	-0.5	F
		1º11	13	8	9	CTR	0.5	F
		1º8	13	18	7	EXM	0.5	F
		1º11	13	9	9	CTR	1	F
		1º7	13	18	14	EXM	1	F
ATE	Privado	1º CBU	13	17	1	CTR	-4	D
		1ºA	13	7	13	EXM	-4	D
		4ºCBU	16	14	5	CTR	-0.5	D
		4ºA	16	8	6	EXM	-0.5	D
		3ºCBU	15	10	5	CTR	-0	D
		2ºCBU	14	11	7	EXM	-0	D
		5ºCBU	17	13	4	CTR	1	D
EP	Privado	5ºA	17	10	10	EXM	1	D
		2ºC	14	9	15	CTR	-1	D
		2ºS	14	16	8	EXM	-1	D
		1ºS	13	13	4	CTR	0.5	D
		1ºC	13	13	13	EXM	0.5	D
		1ºS	13	13	4	CTR	2	D
		1ºB	13	10	4	EXM	2	D
		5ºS	17	6	10	CTR	2	D
IP	Privado	5ºA	17	5	8	CTR	1	D
		5ºB	17	5	5	EXM	1	D

$p < 0.01$). Los otros grupos EXM, cuyos estudiantes tuvieron un examen pre-TR o a otros tiempos post-TR mostraron índices de memoria similar en comparación con sus respectivos grupos control (EXM vs CTRd correspondiente, $p > 0.05$).

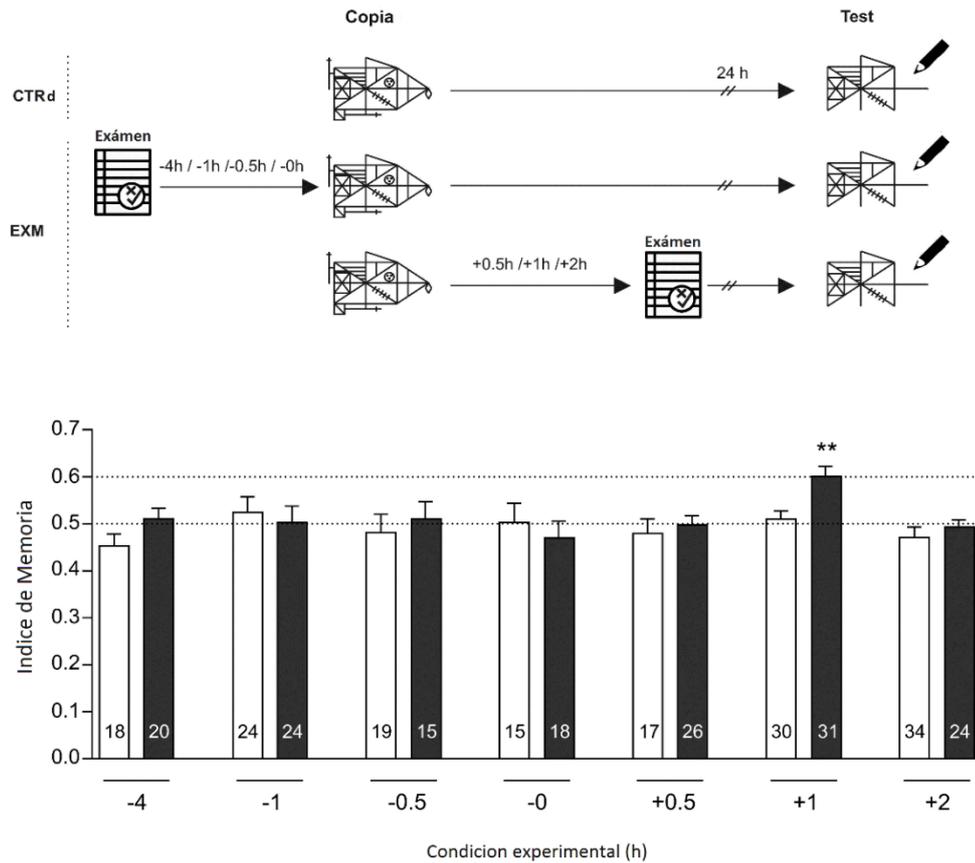


Figura 14. Un exámen puede tener un efecto positivo sobre la MLT de una tarea gráfica dentro de una ventana de tiempo acotada. Un esquema del protocolo experimental se muestra en la parte superior de la figura: se pidió a los estudiantes que copiaran la Figura de Rey y, excepto en los grupos CTRd, un examen escrito fue realizado por ellos antes o después de la copia. El momento de la copia es el tiempo cero y las condiciones experimentales, expresadas en horas, indican la distancia temporal de los exámenes respecto al mismo. La MLT de esta figura fue testeada 24 h después. El Índice de Memoria se muestra como la media \pm SEM para los grupos controles (CTRd, barras blancas) y para los grupos que tuvieron un examen a diferentes tiempos alrededor del TR (EXM, barras negras). El número de participantes se escribe en cada barra. Test t-Student, CTRd vs. grupo EXM respectivo; ** $p < 0.01$

En la Fig. 15 se muestra la performance en el test de la MLT para los grupos con CTRf. Todos estos controles mostraron un índice de memoria cercano a 0.6 y significativamente menor que 0.5 (Test 't' de una muestra vs valor 0.6 $p > 0.05$; vs valor 0.5 $p < 0.05$). De acuerdo con el momento en que los estudiantes tuvieron su examen, se separaron distintas condiciones experimentales: -0.5, -1, -4 (cuando el examen se realizó media, una o cuatro horas antes del TR), o +0, +0.5, +1, +4 (cuando el examen ocurrió inmediatamente después del TR, media, una o cuatro horas más tarde). En contraste con la mejoría en la MLT observada en los resultados previos (Fig. 14), la presencia de un exámen tanto antes como después de la copia de la figura redujo significativamente el índice de memoria de los grupos EXM con respecto a sus correspondientes CTRf (EXM vs CTRf correspondiente, a -1h: $t_{(50)}=2.33$ $p < 0.05$; -0.5h: $t_{(59)}=2.24$ $p < 0.05$; +0h: $t_{(37)}=3.98$ $p < 0.001$; +0.5h: $t_{(41)}=2.92$ $p < 0.01$; +1h: $t_{(89)}=2.78$ $p < 0.01$). Solo cuando el examen tuvo lugar 4 horas antes del TR o 4 horas después, este efecto negativo sobre la MLT no fue observado ($p > 0.05$ vs CTRf correspondiente).

Estos resultados muestran que un examen, experimentado durante el horario normal de escuela, puede mejorar o perjudicar la MLT de una tarea gráfica independiente, realizada también dentro del aula, cuyo contenido no está relacionado con los del examen. Además, la modulación que ejerce el examen sobre la MLT grafica ocurre dentro de una ventana crítica de tiempo.

Los efectos del examen sobre la MLT grafica son independientes del sexo de los participantes.

El background genético de los individuos, la edad y el sexo son factores que pueden tener influencia en la respuesta de estrés generada. Todos estos factores crean una matriz compleja de moduladores, mediadores y del tipo de respuesta de estrés resultante (Sandi y Pinelo-Nava 2007; Joëls y Baram 2009).

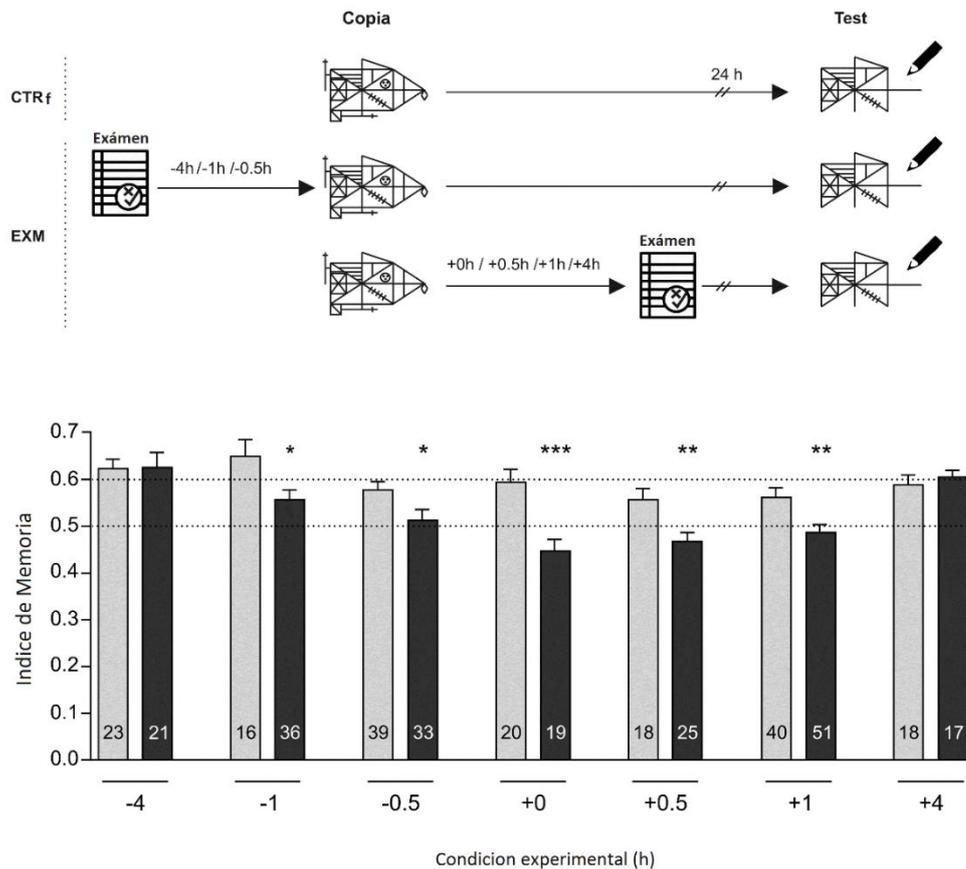


Figura 15. Un examen puede tener efecto negativo sobre la MLT de una tarea gráfica en situaciones de aprendizaje fuerte. Un esquema del protocolo experimental se muestra en la parte superior de la figura: se pidió a los estudiantes que copiaran la Figura de Rey y, excepto en los grupos CTRf, un examen escrito fue realizado por ellos antes o después de la copia. El momento de la copia es el tiempo cero y las condiciones experimentales, expresadas en horas, indican la distancia temporal de los exámenes respecto al mismo. La MLT de esta figura fue testada 24 h después. El Índice de Memoria se muestra como la media \pm SEM para los grupos controles (CTRf, barras grises) y para los grupos que tuvieron un examen a diferentes tiempos alrededor del TR (EXM, barras negras). El número de participantes se escribe en cada barra. Test t-Student, CTRf vs. grupo EXM respectivo; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

Tomando en cuenta que durante nuestras actividades hemos usado un rango de edad pequeño y la historia genética de cada individuo es un factor incontrolable en este estudio (suponemos, de cualquier modo, que las diferencias individuales quedaran atenuadas al tener una cantidad grande de representantes de cada grupo), sí nos pareció interesante examinar si el sexo de los estudiantes podía generar diferencias en los efectos del estrés sobre la MLT gráfica. Varios estudios han mostrado

que el estrés puede repercutir diferente en hombres y mujeres (Shors 2004 LM; Cadle y Zoladz 2015; Oyola 2017; LoPilato2019).

En esta oportunidad, analizamos los índices de memoria teniendo en cuenta el sexo de los estudiantes que participaron de las actividades. En cada condición experimental se separaron los datos según si el estudiante pertenecía al sexo masculino (M) o femenino (F). En un primer análisis (Fig. 16) comparamos los grupos CTRd y CTRf y notamos que más allá de las diferencias ya descritas entre ambos, los índices de memoria resultaron similares para los estudiantes M y F en cada uno de estos grupos (ANOVA de dos factores_(1,258); $F_{(TipoControl)}=57.45$, $p<0.001$; $F_{(Sexo)}=0.001$, $p=0.98$; $F_{(Interaccion)}=1.97$, $p=0.16$).

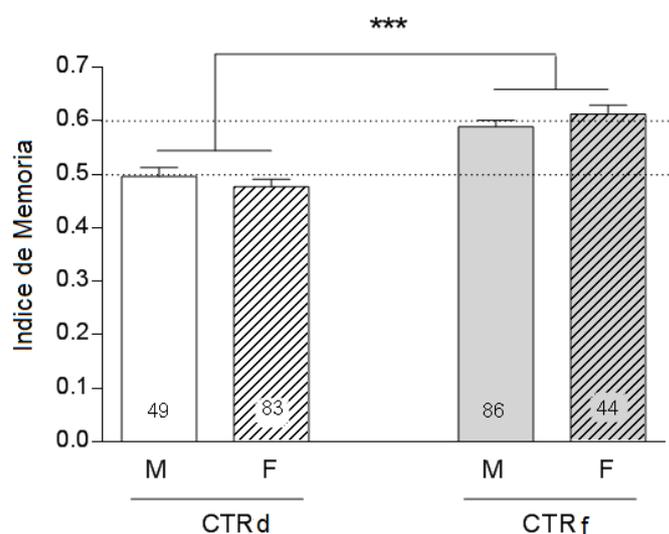


Figura 16. Las diferencias observadas en la MLT de los CTRd y CTRf son independientes del sexo de los estudiantes.

Los resultados de los estudiantes que participaron como CTR (sin exámenes) fueron analizados por separado según el género de cada individuo. El Índice de Memoria se muestra como la media \pm SEM para los grupos CTRd (barras blancas) y para los CTRf (barras grises) separándose los estudiantes del sexo masculino (M, barras lisas) y femenino (F, barras rayadas). El número de participantes se escribe en cada barra. ANOVA de dos factores, *** $p<0.001$

Examinamos también si la diferencia de memoria inducida por el examen 1 h luego del TR, en el caso de los estudiantes con grupos CTRd, mostraba alguna diferencia entre sexos. Lo que observamos (Fig. 17A) fue que el aumento en el índice de memoria en el grupo EXM+1 fue similar tanto para M

como para F (ANOVA de dos factores_(1,56); $F_{(Examen)}=11.89$, $p<0.01$; $F_{(Sexo)}=0.04$, $p=0.85$; $F_{(Interacción)}=7.75e-5$, $p=0.99$). A los demás tiempos evaluados para grupos con CTRd (Fig 17 B-G), tampoco hubo diferencias en la retención de la figura entre M y F de cada condición experimental ($p>0.05$ para efecto de examen, sexo e interacción). Solo en uno de los casos, aquellos estudiantes que tuvieron su examen 4 horas antes del TR (Condición -4h), no pudimos evaluar diferencias según el sexo por haber solo un estudiante M en uno de los grupos.

Luego examinamos en los grupos de estudiantes pertenecientes a la población con CTRf si el déficit de la memoria inducido por los exámenes mostraba diferencias entre los sexos (Fig. 18). En las condiciones experimentales donde se observó que el examen generó una menor retención, se registraron menores índices de memoria tanto para estudiantes M como F ($p>0.05$ para efecto de sexo e interacción; ver Tabla 2). Solo en una de las condiciones experimentales, la correspondiente a estudiantes con examen una hora antes del TR (Condición -1h), se observó un efecto del sexo además del efecto del examen, sin haber interacción entre estos factores (ANOVA de dos factores_(1,44); $F_{(Examen)}=4.68$ $p=0.04$; $F_{(Sexo)}=4.88$ $p=0.03$; $F_{(Interacción)}=0.001$ $p=0.97$); ello indica que la diferencia en el índice de memoria observada entre los grupos CTRf y EXM-1 no es debida a diferencias de sexo. En dos condiciones experimentales (Condición +0h y +4h) no pudimos evaluar diferencias según el sexo por no encontrarse estudiantes F en los cursos. Finalmente, para la condición experimental restante (Condición -4h), donde el examen no tuvo efecto, tampoco se observaron diferencias entre estudiantes M y F ($p>0.05$ para efecto de sexo e interacción; Tabla 2 y Fig. 18)

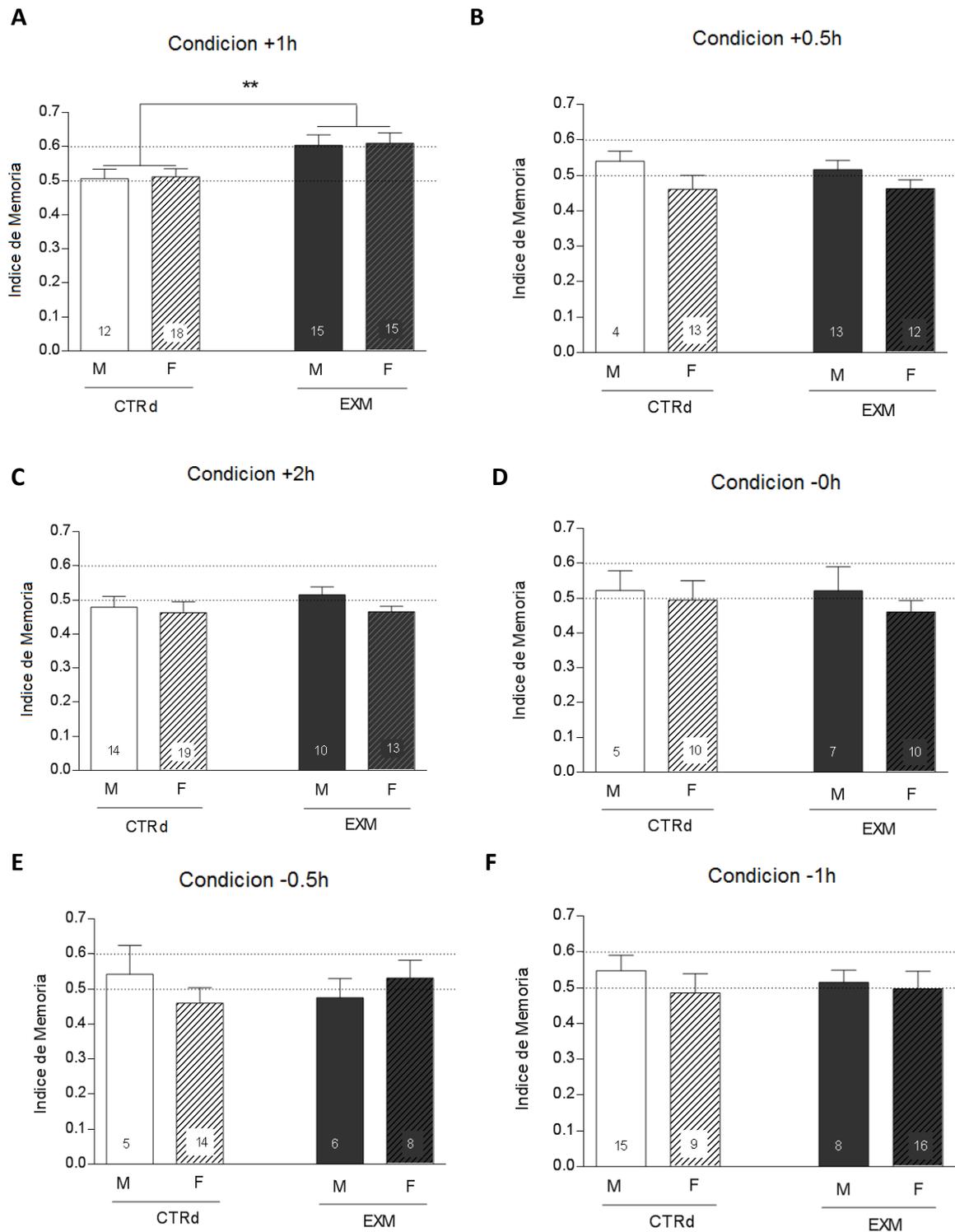


Figura 17. Para la población CTRd no se observaron diferencias en la MLT gráfica de acuerdo al sexo de los estudiantes. Se muestran los Índices de Memoria \pm SEM según el sexo de cada individuo: M (barras lisas) o F (barras rayadas), para los grupos CTRd (barras blancas) y sus respectivos grupos EXM (barras grises oscuro) de acuerdo a cada condición experimental: **A)** EXM+1 **B)** EXM+0.5 **C)** EXM+2 **D)** EXM-0 **E)** EXM-0.5 **F)** EXM-1. Número de participantes en cada una de las barras. ANOVA de dos factores, $**p < 0.01$

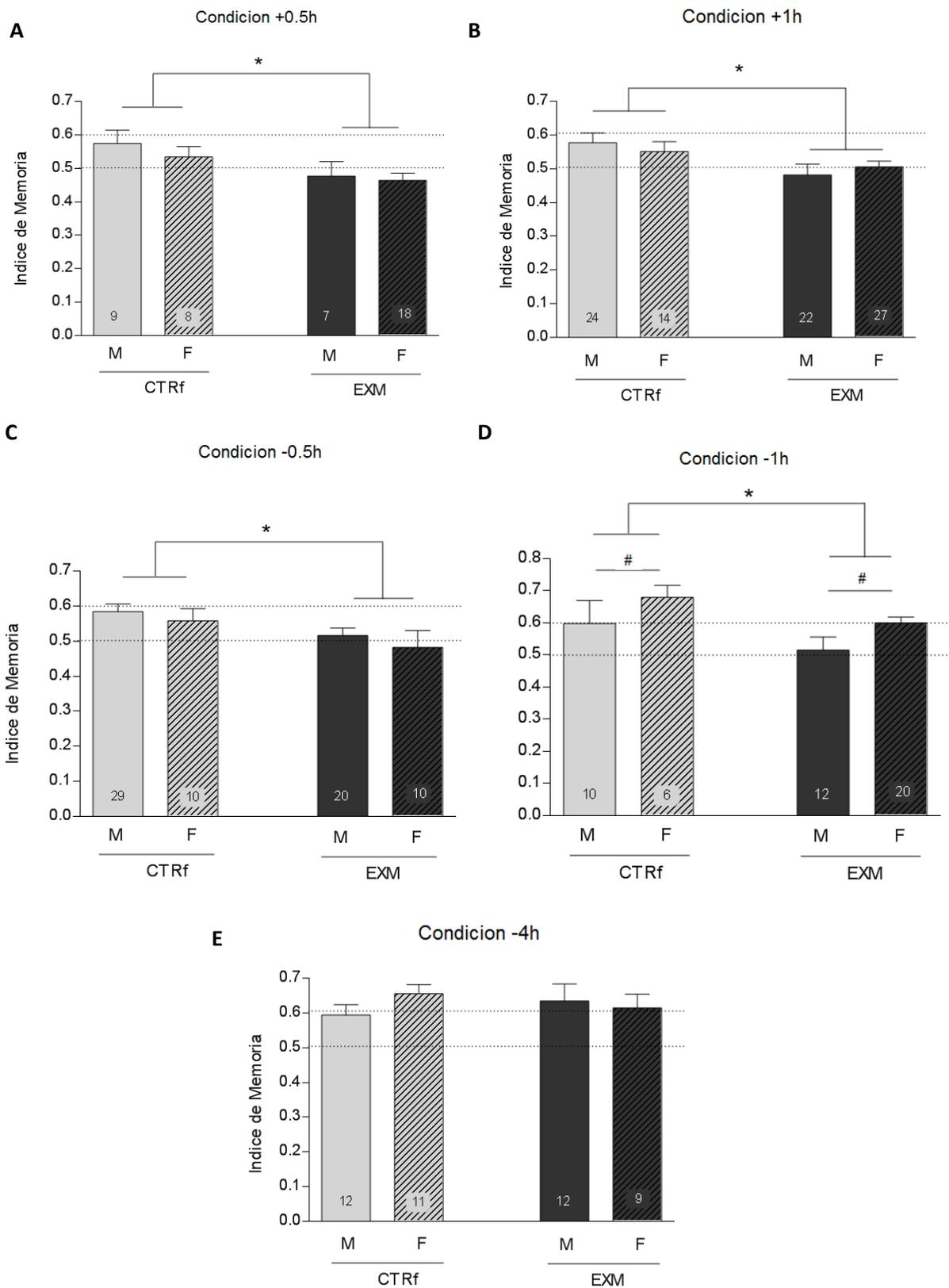


Figura 18. Para la población CTRf no se observaron diferencias en la MLT grafica de acuerdo al sexo de los estudiantes. Se muestran los Índices de Memoria \pm SEM según el sexo de cada individuo: M (barras lisas) o F (barras rayadas), para los grupos CTRf (barras grises claro) y sus correspondientes grupos EXM (barras grises oscuro) de acuerdo a cada condición experimental: **A) EXM+0.5 **B)** EXM+1 **C)** EXM-0.5 **D)** EXM-1 **E)** EXM-4. Número de participantes en cada barra. ANOVA de dos factores, * $p < 0.05$, # $p < 0.05$ M vs F**

Tabla 2. Parámetros estadísticos del ANOVA de dos factores: Condición (EXM/CTRf) x Sexo (F/M)

Figura	Analisis	Parametros ANOVA	GLe, GLd	p
18a	CTRf vs EXM+0.5	F Interaccion:0.17	1,38	0.68
		F efecto de Examen: 6.27	1,38	0.02
		F efecto de Sexo:0.65	1,38	0.42
18b	CTRf vs EXM+1	F Interaccion: 0.96	1,83	0.33
		F efecto de Examen: 6.72	1,83	0.01
		F efecto de Sexo:0.03	1,83	0.87
18c	CTRf vs EXM-0.5	F Interaccion:0.02	1,65	0.90
		F efecto de Examen: 5.59	1,65	0.02
		F of efecto de Sexo:0.98	1,65	0.33
18d	CTRf vs EXM-1	F Interaccion: 0.001	1,44	0.97
		F efecto de Examen: 4.68	1,44	0.04
		F efecto de Sexo: 4.88	1,44	0.03
18e	CTRf vs EXM-4	F Interaccion:1.14	1,40	0.29
		F efecto de Examen:0.0002	1,40	0.99
		F efecto de Sexo:0.30	1,40	0.59

El examen afecta la cantidad y la calidad de los elementos recordados

Finalmente, analizamos para cada estudiante la proporción de puntajes (nulo, bajo, medio o máximo) obtenida en el TS. Este es un número entre 0 y 1 que nos da una idea de la cantidad de elementos de la Figura de Rey que fueron omitidos, cuantos se dibujaron perfecto o con mayor o menor precisión, y estudiamos entonces si ello está influenciado por el episodio de estrés que representa el examen. Sabemos que el estrés puede influenciar de forma específica la memoria de la tarea, de acuerdo con su complejidad y las estructuras cerebrales involucradas en su procesamiento (Diamond y Zoladz 2007 NP; Sandi y Pinelo-Nava 2007)

Como hemos observado en los resultados previos, los CTRf logran una mayor retención de la Figura de Rey en comparación con los CTRd, y en la Fig. 19 notamos que el número de elementos con puntaje nulo es más bajo en estos grupos (CTRf vs CTRd, $t_{(273)}=5.59$ $p<0.001$), como así también se produce un aumento de ítems perfectamente dibujados (*puntaje máximo*; CTRf vs CTRd, $t_{(273)}=6.33$

$p < 0.001$). Por el contrario, no se observaron diferencias en la proporción de puntajes bajo y medio ($p > 0.05$).

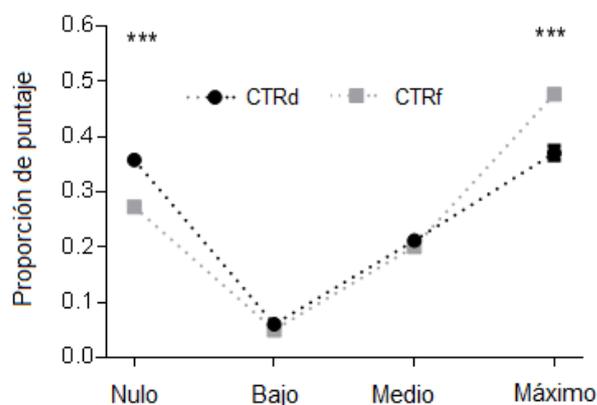


Figura 19. Existen diferencias en la proporción de puntajes de los grupos CTRd y CTRf. La Proporción de Puntajes es mostrada como la media \pm SEM para los grupos CTR, luego de analizarse la cantidad de ítems con puntaje nulo, bajo, medio o máximo en cada caso. Comparamos el perfil de los CTRd (línea punteada negra) con el de los CTRf (línea punteada gris). Test t-Student, *** $p < 0.001$

Este mismo perfil se encontró cuando comparamos el grupo EXM+1 con su respectivo CTRd (Fig. 20), donde la presencia del examen tuvo un efecto positivo sobre la memoria gráfica (EXM+1 vs CTRd; *puntaje nulo*, $t_{(59)}=3.62$ $p < 0.001$; *puntaje máximo*, $t_{(59)}=2.54$ $p < 0.05$; *puntajes bajo y medio* $p > 0.05$). Al analizar las demás condiciones experimentales no se observaron diferencias en la proporción de puntajes que obtuvieron los grupos CTRd en comparación con sus pares que experimentaron el examen (EXM vs CTRd correspondiente; para todos los puntajes $p > 0.05$), con excepción de un solo caso: los estudiantes que tuvieron examen media hora luego del TR (EXM+0.5) mostraron menos elementos con puntaje *bajo* que su grupo control (EXM+0.5 vs CTRd, $t_{(41)}=3.44$ $p < 0.01$)

Posteriormente, analizamos la proporción de puntajes en los grupos de estudiantes con CTRf (Fig. 21). En las condiciones experimentales donde el examen generó una reducción en el índice de memoria, se observó que dicha disminución en la retención de la figura recayó en el aumento de ítems con puntaje nulo y/o un menor número de elementos perfectamente dibujados, es decir aquellos con puntaje máximo (EXM vs CTRf correspondiente, *puntajes nulo y máximo* $p < 0.05$; ver

Tabla 3). En los casos donde el índice de memoria no se modificó ante la presencia de exámenes, la proporción de puntajes no tuvo diferencias entre grupos (EXM vs CTRf correspondiente; para todos los puntajes $p > 0.05$)

Tabla 3. Parámetros estadísticos del Test 't' en el análisis de la proporción de puntajes obtenida.

Figura	Análisis	Parametro		GL	p
21a	CTRf vs EXM+0	Nulo	t=3,90	38	0,0004
		Bajo	t=1,09	38	0,28
		Medio	t=1,27	38	0,21
		Max	t=2,86	38	0,007
21b	CTRf vs EXM+0.5	Nulo	t=2,26	41	0,03
		Bajo	t=1,60	41	0,1169
		Medio	t=0,59	41	0,5559
		Max	t=2,81	41	0,008
21c	CTRf vs EXM+1	Nulo	t=2,76	89	0,007
		Bajo	t=1,39	89	0,17
		Medio	t=0,54	89	0,59
		Max	t=2,28	89	0,025
21d	CTRf vs EXM+4	Nulo	t=0,32	33	0,75
		Bajo	t=0,62	33	0,54
		Medio	t=0,27	33	0,79
		Max	t=0,53	33	0,6
21e	CTRf vs EXM-0.5	Nulo	t=1,55	70	0,13
		Bajo	t=1,85	70	0,07
		Medio	t=0,04	70	0,97
		Max	t=2,25	70	0,028
21f	CTRf vs EXM-1	Nulo	t=3,25	50	0,002
		Bajo	t=1,48	50	0,15
		Medio	t=0,96	50	0,34
		Max	t=1,63	50	0,11
21g	CTRf vs EXM-4	Nulo	t=0,18	42	0,86
		Bajo	t=0,42	42	0,68
		Medio	t=0,96	42	0,34
		Max	t=0,35	42	0,73

Los resultados obtenidos en esta última sección denotan que existe una influencia del examen sobre la cantidad de elementos omitidos de la Figura de Rey como de aquellos dibujados perfectamente, efectos que difieren según el momento de aplicación del examen y la fuerza del aprendizaje. El examen puede modular positiva o negativamente la retención de la memoria gráfica.

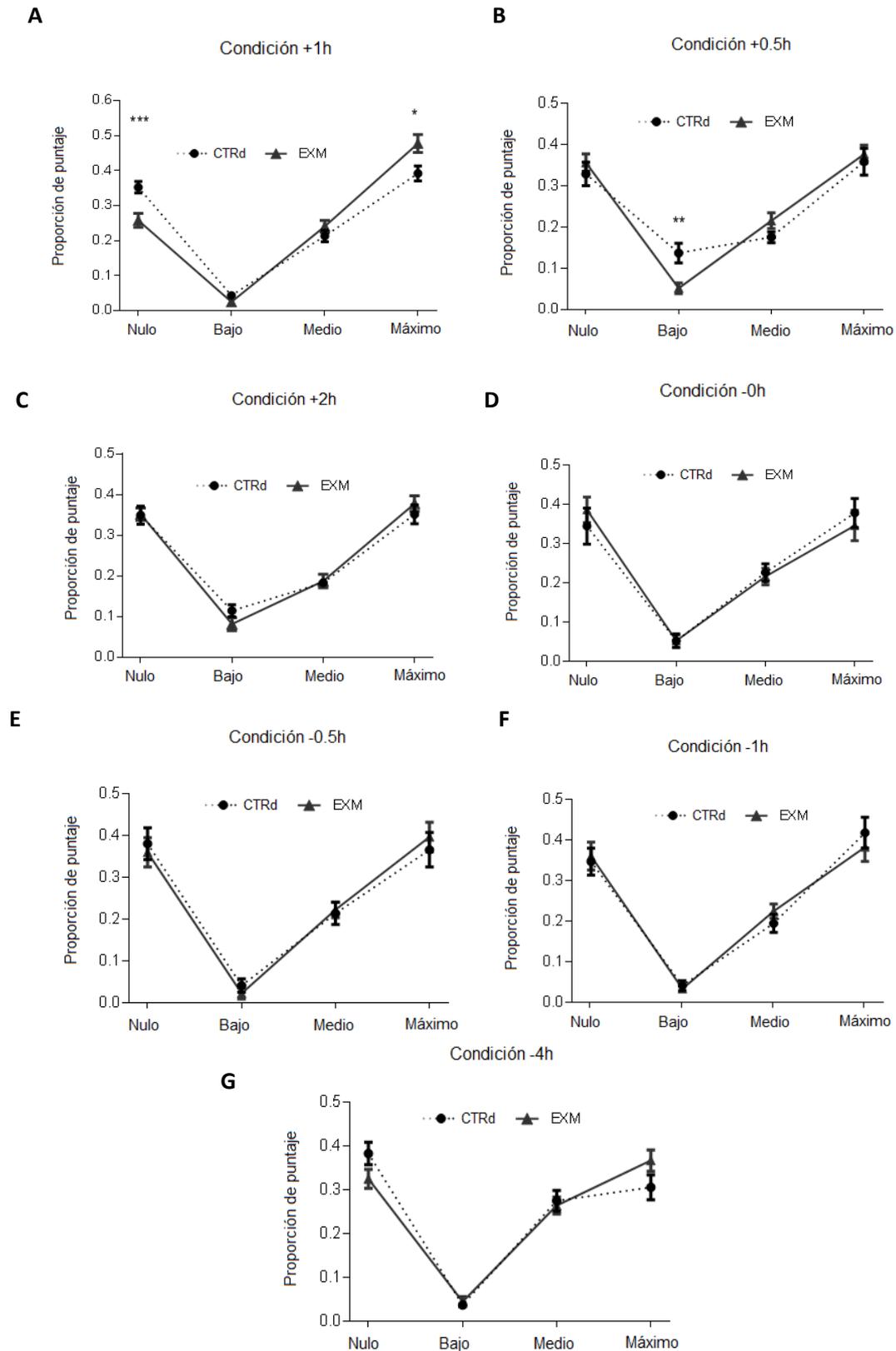


Figura 20. Existe una diferencia en la proporción de puntajes entre el CTRd y el grupo EXM en la condición donde el estrés mejoró la MLT gráfica. La Proporción de Puntajes es mostrada como la media \pm SEM. Comparamos el perfil de los CTRd (línea punteada negra) con el de sus grupos EXM (línea continuada gris oscuro con triángulos) según cada condición experimental: **A)** EXM+1 **B)** EXM+0.5 **C)** EXM+2 **D)** EXM-0 **E)** EXM -0.5 **F)** EXM -1 **G)** EXM -4. Test t-Student; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

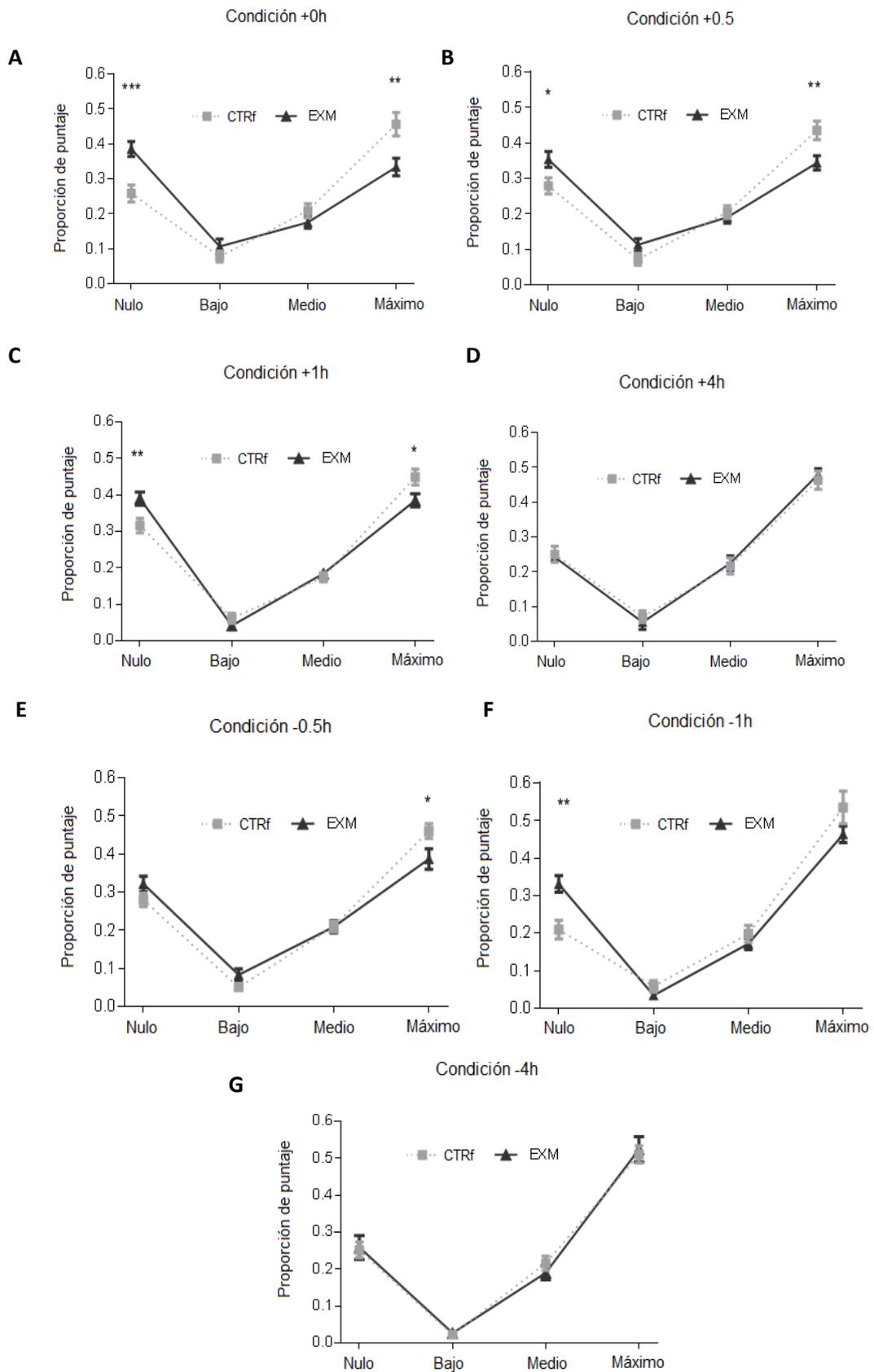


Figura 21. Existen diferencias en la proporción de puntajes entre los CTRf y los grupos EXM en aquellas condiciones donde el estrés redujo la MLT gráfica. La Proporción de Puntajes es mostrada como la media \pm SEM. Comparamos el perfil de los CTRf (línea punteada gris claro) con el de sus grupos EXM (línea continuada gris oscuro con triángulos) según cada condición experimental: **A)** EXM+0 **B)** EXM+0.5 **C)** EXM+1 **D)** EXM+4 **E)** EXM -1 **F)** EXM -1 **G)** EXM -4. Test t-Student; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$



DISCUSIÓN II

Los eventos de estrés y las hormonas y neurotransmisores liberados bajo su presencia son moduladores principales del aprendizaje y la memoria en humanos. ¿Pero puede el estrés influir en nosotros de la misma manera que lo hace en roedores? Nuestro trabajo con estudiantes apuntó a conocer los efectos del estrés sobre los procesos de aprendizaje y memoria en las personas y sus implicaciones, críticas, en el entorno educativo. Mostramos que un estrés moderado generado por un examen dentro del aula puede tener efectos tanto beneficiosos como perjudiciales sobre una memoria gráfica de largo plazo obtenida en el mismo contexto escolar, tal como se observaron efectos positivos y negativos del estrés sobre las memorias evaluadas en ratas.

Observamos que cuando los estudiantes expresaron una MLT más débil de la tarea aprendida, el examen una hora luego de la copia de la Figura de Rey, mejoró la retención de la misma. Este efecto positivo del examen (que representa un incremento del 20-25% del puntaje total de retención de los sujetos del grupo control) fue similar a la acción de la novedad sobre aprendizajes en el aula en alumnos de escuela primaria, previamente reportada por nuestro grupo de trabajo (Ballarini y col 2013). Así mismo, el momento en que el examen moduló positivamente la MLT (1h post-TR), coincidió con el momento en que se observó el fenómeno de promoción en roedores, cuando la memoria evaluada fue no-aversiva. En cambio, cuando los estudiantes expresaron una MLT más robusta de la figura, el examen empeoró la retención, fenómeno que observamos en los roedores en paradigmas de aprendizaje fuerte. De esta forma, la realización de un examen dentro del aula en momentos cercanos a una tarea gráfica logró modular la MLT de esta tarea, dependiendo el tipo de efecto de la fuerza del aprendizaje que lograron los estudiantes.

En concordancia con nuestros hallazgos, distintos estudios remarcan los efectos positivos de un estrés presentado luego de la tarea de aprendizaje. En uno de ellos se observó que estudiantes universitarios expuestos a un video emocionalmente estimulante luego de una lectura, lograron mejorar la MLT de la lectura (Nielson y Arentsen 2012), mientras en otro estudio se demostró que experiencias lo suficientemente salientes (como una estimulación eléctrica) asociadas con un

aprendizaje débil mejoraron la expresión de la MLT (Dunsmoor y col 2015). En un trabajo adicional la preparación y exposición a un discurso público, que ocurrió posterior a la visualización de un cortometraje, generó que los participantes que atravesaron dicha situación de estrés obtuvieran una mejor retención del film, tanto en los aspectos visuales como el contenido verbal (Beckner y col 2006). Incluso se observó que una situación de estrés posterior a una tarea de separación de patrones fue capaz de mejorar la discriminación de estímulos muy similares, encontrándose una correlación significativa entre la capacidad de discriminación y el aumento en el cortisol (Jiang y col 2019). Es importante destacar que, con el fin de explorar los efectos del estrés en las distintas fases de la memoria episódica, fue realizado un meta-análisis con miles de participantes (Shields y col 2017). En este último trabajo se concluye, en líneas generales, que el estrés que ocurre posterior a la codificación mejora la memoria a menos que el factor estresante se presente en un contexto físico diferente al del aprendizaje.

En cambio, eventos de estrés previos al aprendizaje muestran resultados inconsistentes. En dos estudios farmacológicos, por ejemplo, podemos observar que la administración de cortisol momentos antes del aprendizaje refuerza la memoria gráfica y verbal para estímulos neutros como para aquellos con valencia positiva o negativa (Buchanan y Lovullo 2001, Abercrombie 2003). Sin embargo, otros investigadores han reportado efectos perjudiciales o nulos sobre la memoria cuando el estrés ocurre a tiempos más distantes del aprendizaje, en contraposición a las presentaciones inmediatamente anteriores (de Quervain y col 2000; Payne y col 2006, Smeets y col 2007, Zoladz y col 2011; Cadle y Zoladz 2015) En el meta-análisis de Shields y colaboradores (2017) los autores obtienen la misma conclusión: cuando el estrés ocurre antes o durante la codificación, la memoria se ve perjudicada, a menos que la separación temporal entre ellos sea muy breve o el material que se aprende esté directamente relacionado con el factor de estrés.

La información presente en la literatura señala que los efectos del estrés sobre las MLTs no suelen estar condicionados solo por un factor sino por varios, de manera que es importante no solo el momento de presentación del estresor, sino su duración, el tipo de información almacenada, si la misma está o no conceptualmente relacionada con la situación de estrés, en qué contexto físico

ocurren el estresor y la adquisición de la nueva información, etc. Respecto a este último aspecto, un trabajo reciente (Sazma y col 2019) informa que un episodio de estrés incrementa una memoria de reconocimiento de imágenes cuando ocurre en el mismo contexto en que se realizó el aprendizaje, mientras que no parece tener efectos positivos cuando el estresor fue experimentado en un lugar distinto; incluso, el aumento de cortisol detectado en la saliva estuvo relacionado al incremento en la memoria en dicho contexto. El efecto positivo se observó independientemente del sexo de los participantes y tanto si el material aprendido tenía valencia negativa o características neutrales. En nuestro estudio, las tareas de estrés y aprendizaje fueron realizadas dentro del mismo aula y consideramos que ello puede resultar un factor clave al observar los cambios producidos por las experiencias de estrés; adicionalmente en nuestro trabajo, como en el de Sazma y colaboradores, la modulación generada por el estrés fue sobre un contenido aprendido sin ninguna saliencia emocional particular, y demostramos que la MLT de una figura neutral puede mejorarse o disminuirse.

A menudo, sin embargo, el efecto del estrés sobre la adquisición y consolidación de la información es mayor para material con impacto emocional en comparación con aprendizajes neutrales, o para aquel material relacionado con el contexto de la tarea estresante y, por lo tanto, potencialmente más relevante (Payne y col 2006; Smeets y col 2007; McGaugh 2013). Las catecolaminas, como la noradrenalina, parecen tener un rol crítico en estos efectos del estrés sobre el aprendizaje como en la saliencia o “arousal” emocional generados. Sin embargo, esta modulación involucra diversas áreas, incluyendo también la corteza prefrontal (Cahill y Alkire 2003; Maheu y col 2004; Van Stegeren y col 2010; Segal y col 2014). En este trabajo, si bien no comparamos los efectos de los exámenes sobre el aprendizaje de contenidos similares a los que fueron evaluados, pusimos a prueba si un evento de estrés podía modificar la MLT de contenidos neutrales, pero que son presentados a distintos momentos antes o después de un estresor y en el mismo contexto. Hasta el momento la mayor parte de los trabajos resaltan el efecto de los estresores sobre elementos con contenido emocional y sobre distintas etapas de la memoria. En esta tesis mostramos que un evento estresante puede modificar el almacenamiento de información neutral y estudiamos una ventana de tiempo más extensa alrededor del aprendizaje y codificación de la memoria, mostrando que el efecto

del estrés resulta acotado y que la fuerza del aprendizaje resulta un factor crítico en la modulación que ejerzan los circuitos activados por el estrés.

En los resultados presentados, vemos que los estudiantes pertenecientes a la población con retención débil de la figura aprendida se beneficiaron con el evento de estrés, mientras que aquellos con retención más fuerte no. La ley de Yerkes-Dodson (Y-D) ilustra los efectos del estrés sobre la memoria, indicando que a diferentes niveles de estrés la capacidad de almacenar recuerdos cambia; la ley Y-D es representada como una función en forma de U invertida: niveles de estrés muy bajos o muy elevados no son óptimos para la formación de la memoria, mientras que niveles intermedios llevan a rendimientos más altos (Diamond y col 2007; Calabrese 2008). En este contexto, la curva Y-D provee un marco conceptual para interpretar nuestros resultados. Podemos pensar que los estudiantes con mayor retención de la figura (grupos con CTRf) en su estado basal se encontraban más cercanos al centro de dicha U invertida, en un estado óptimo y permisible para formar y almacenar memorias nuevas; así, un evento estresante asociado a la tarea solo podrá perjudicar la memoria. Por el contrario, los estudiantes con una evocación más débil de la figura (grupos con CTRd), podrían estar experimentando un nivel basal de estrés más bajo al aprender, posicionándose en el extremo izquierdo de la curva acampanada, y por lo tanto el examen genera efectos beneficiosos sobre la retención de la información. Alternativamente, la diferencia entre estos grupos en la capacidad de recordar, bajo condiciones basales, podría reflejar una diferencia en la percepción de los estresores en cada población. Quizás los estudiantes en los grupos de retención más fuerte son más sensibles, tal que un mismo estresor puede “empujarlos” hacia la zona derecha de la curva acampanada, diferente a lo que podría estar sucediendo con la población de retención más débil. Resultados como estos fueron observados en un interesante estudio de memoria realizado en invertebrados (Hughes y col 2017) y se han reportado también que diferencias en la percepción del estrés por distintas cepas de ratas afecta su memoria (Andrews 1996). Durante la tesis no hemos realizado mediciones de cortisol entre los estudiantes que nos permitan conocer el estado basal de estrés ni hemos examinado sensibilidad a estresores, pero nos parece una idea interesante que apoya nuestros resultados. Incluso, aunque no podemos atribuir las diferencias encontradas en los

CTRd respecto de los CTRf a un factor particular, por ejemplo al rango de edad, composición de sexos en esos grupos, estatus socio-económico de los estudiantes, o la performance en los exámenes realizados, pensamos que el contexto particular de cada escuela puede hacer que una situación de aprendizaje dada sea mejor que otras. Quizás otras características que no hemos podido identificar en este estudio contribuyan a las diferencias de retención observadas entre estas dos poblaciones.

Otro resultado interesante de esta tesis se puede observar en la influencia del estrés sobre la proporción de puntajes obtenida en el test de la memoria gráfica. Para cada estudiante fue analizado la cantidad de veces que en el test obtuvo un puntaje nulo, bajo, medio o máximo, en cada una de las distintas condiciones experimentales. Observamos que cuando el estrés tuvo efectos positivos sobre la memoria (Condición +1h, en poblaciones de retención débil) menos elementos fueron omitidos (es decir menos elementos fueron no dibujados) y una mayor cantidad se dibujaron perfecto. Sin embargo, en los casos que el estrés tuvo efectos negativos sobre la memoria (Condiciones entre -1h y +1h, en poblaciones de retención fuerte) los estudiantes dejaron de dibujar más ítems y los que fueron recordados se dibujaron de manera más imperfecta. Incluso las diferencias observadas en la retención entre los CTRd y CTRf mostraron también que los últimos dibujaron más elementos y de manera más precisa, apoyando las ideas previas respecto a estas poblaciones. Los resultados sugieren que tanto la cantidad como calidad de los elementos recordados son parámetros afectados por el estresor, en este caso el examen. Según el trabajo de Diamond y colaboradores (2007), la complejidad de la tarea y las estructuras necesarias para su procesamiento pueden determinar los efectos del estrés sobre la memoria generada. Si bien es muy difícil definir con un criterio objetivo “dificultad de la tarea”, en unos de sus trabajos de referencia Easterbrook (1959) propone que existe un rango óptimo en la utilización de claves para resolver una tarea, y aquellas que demandan un número menor son las más sencillas. Easterbrook propone que con el aumento del “arousal”, saliencia o “emocionalidad” durante una tarea hay una reducción en las claves que un individuo puede procesar, de manera que si la tarea es compleja e involucra la atención a múltiples claves, la performance puede verse deteriorada en contextos de estrés más elevados; para tareas más simples la performance en cambio podrá mejorar. En las

actividades realizadas para esta tesis la tarea gráfica para los estudiantes fue la misma, pero como mencionamos anteriormente, puede ser percibida diferente en las dos poblaciones de estudiantes encontradas, y entonces el estrés repercute de diferente manera. Partiendo de poblaciones con distintas características es razonable pensar que un estresor puede afectar diferente las habilidades cognitivas.

Por otro lado, nos pareció interesante examinar si el sexo de los estudiantes podía generar diferencias en los efectos del estrés sobre la MLT gráfica. Se ha observado en algunos casos que, frente a mismos estímulos estresantes en iguales contextos, individuos de distinto sexo pueden responder en direcciones diferentes e incluso opuestas (Cahill y van Stegeren 2003; Shors 2004; Andreano y Cahill 2006; Cadle y Zoladz 2015; LoPilato 2019). En la revisión realizada por Oyola y Handa (2017) se expone que desde momentos tempranos los esteroides gonadales pueden influenciar el eje HPA y ello conlleva a diferencias en la responsividad de este eje según el sexo; desde el punto de vista adaptativo tiene sentido que las respuestas de los organismos a cambios en el entorno sean apropiadas a sus estados reproductivos. Comparado con los machos, se ha observado que hembras de rata y ratón muestran respuestas más robustas del eje HPA como resultado del estradiol circulante, lo cual aumenta los niveles de las hormonas de estrés tanto durante situaciones que no representan amenaza o desafío alguno, como después de presentarse un estresor. Los resultados llevados a cabo en nuestro estudio, sin embargo, no muestran diferencias entre estudiantes femeninos y masculinos, por lo menos para esta tarea y para el tipo de estresor involucrado.

En este estudio fueron controladas otras variables que creímos podrían representar un sesgo en nuestros resultados, de manera de atribuir los cambios que hubiera en la retención de la figura solamente a la presencia del examen. En principio, consideramos importante que las actividades se desarrollaran dentro de las rutinas normales de cada institución educativa y a la hora de realizar los protocolos se consideró no llevar a cabo las actividades si algún evento especial tenía lugar en la sede educativa. Los exámenes, que utilizamos como factores de estrés en esta tesis, fueron realizados por los estudiantes en presencia del profesor correspondiente a la materia evaluada y el ingreso de los

investigadores, antes o después de los exámenes para realizar la copia de la Figura de Rey o en el día del test, involucró un tiempo muy acotado. Además, los mismos investigadores se presentaron en los pares de cursos que participaron de la investigación (cursos con evaluaciones y cursos control); así mismo vale la pena destacar que en las instituciones educativas elegidas la participación de personas ajenas al establecimiento ha sido caracterizada por sus directivos como frecuente, estando los estudiantes acostumbrados a realizar actividades con otras personas que no sean sus profesores. Creemos también que la edad de los estudiantes puede modular los efectos del estrés sobre la memoria, desde que las señales percibidas como estresores y los mediadores de esa respuesta cambian durante el desarrollo y hasta la adultez (Chen y col 2006; Lupien y col 2009). Sin embargo, en nuestro trabajo el rango de edad evaluado fue pequeño (entre 12 y 17 años); incluso las diferencias de edad estuvieron representadas en todos los grupos experimentales, sugiriendo que los efectos que observamos del estrés son independientes de este parámetro. Es de interés para nuestro laboratorio extender el estudio a instituciones educativas de nivel primario, e incluso en un futuro a otros rangos etarios. El estado socioeconómico de los estudiantes puede también tener una influencia poderosa en el aprendizaje; si bien en este trabajo no evaluamos la condición social de cada estudiante, todas las instituciones educativas que participaron en nuestro estudio están ubicadas dentro de la Ciudad de Buenos Aires y todas fueron privadas, con excepción del Colegio Nacional Buenos Aires (CNBA), que sin embargo cuenta con el mayor prestigio dentro de las escuelas públicas del país y creemos que sus estudiantes atraviesan condiciones económicas similares a las demás. Un estudio más detallado podría hacerse de esta variable, como así también eventualmente de las experiencias particulares de cada estudiante en su contexto social, que repercutan en los efectos del estrés sobre las habilidades cognitivas. De cualquier manera, pensamos que aquellas diferencias individuales que resultaron incontrolables en este trabajo están representadas en todos los grupos por igual.

Así mismo, si bien no hemos realizado en los estudiantes que participaron de este estudio mediciones del cortisol endógeno, que nos permitan evaluar fisiológicamente el nivel de estrés

experimentado a raíz del examen, una entrevista fue completada y los resultados sugieren que los exámenes fueron percibidos como estresores moderados.

Finalmente, el mecanismo propuesto para entender estos efectos asociativos entre estímulos, en este caso entre el evento estresante y el aprendizaje, es provisto por la hipótesis de etiquetado sináptico y captura (Frey y Morris 1997) y su contraparte comportamental, el EC (Moncada y Viola 2007). Como expusimos en la sección anterior, los efectos del estrés sobre la memoria podrían estar relacionados con la convergencia de la activación neuronal inducida por el aprendizaje y la síntesis de PRPs generada por el estresor, procesos fundamentales en la hipótesis del EC. La existencia de un momento crítico en el cual el estrés afecta la memoria apoya nuestra predicción de que los procesos moleculares disparados por ambas tareas interactúan dentro de una ventana de tiempo e intervalos más amplios evitan dicha interacción. En nuestro trabajo, el examen moduló la MLT de la tarea gráfica solo cuando fue presentado en una ventana de tiempo de hasta una hora, sea antes o después del aprendizaje. Observamos efectos positivos sobre poblaciones de estudiantes con aprendizaje débil y un efecto negativo en poblaciones con aprendizaje más robusto. Si realizamos una comparación con los resultados del capítulo anterior en roedores, allí el estrés promocionó las MLTs de tareas que solo podían inducir una MCT, y en protocolos de aprendizaje fuerte, el estrés impidió la formación de las MLTs. En este trabajo observamos que el estrés moduló la memoria que los estudiantes formaron de la Figura de Rey. La visión clásica de modulación de la memoria (que implica la presencia de un estímulo que aumenta o disminuye la expresión de una MLT formada) también puede ser explicada por la distribución de PRPs a los sitios activos transientes marcados por el aprendizaje, o por la competencia por dichos recursos, que refuerza o debilita las conexiones sinápticas en la región que subyace a la tarea. Pensamos que los efectos positivos del estrés sobre poblaciones de aprendizaje débil involucran inducción y utilización de PRPs que refuerzan la traza mnésica y el efecto negativo en poblaciones de aprendizaje más robusto involucra la competencia por dichos recursos.

Un resultado congruente con los nuestros fue obtenido en el reciente trabajo de Quent y colaboradores (2018). Allí se observa que un incremento en los niveles de cortisol, por la presentación post-entrenamiento de un estresor, se relaciona con un aumento en la memoria de

palabras aprendidas incidentalmente y este efecto no se encuentra cuando las palabras estuvieron asociadas con una recompensa al momento del aprendizaje. Los autores destacan que sus resultados pueden interpretarse mediante los modelos de etiquetado y captura, sugiriendo que el aumento de cortisol solo puede afectar el aprendizaje que fue etiquetado pero no ha capturado PRPs, y por lo tanto se beneficiará de las PRPs brindadas por la situación de estrés; sin embargo el aumento de cortisol no tiene efecto sobre los ítems recompensados porque su etiqueta pudo capturar PRPs inducidas por el sistema de recompensa.

El estrés tiene un impacto crítico en la formación, evocación y reactivación de la memoria, núcleo de nuestro sistema de educación. Una visión integradora de los efectos del estrés en el aula, tanto sobre estudiantes como educadores, fue realizada en el trabajo de Vogel y Schwabe (2016). Los autores postulan que episodios de emoción y/o estrés bajo o moderado (como desafíos cognitivos sin demandas excesivas) pueden aumentar la consolidación de memorias para el material de estudio, y que los efectos del estrés pueden entenderse como una función acampanada en relación a las habilidades cognitivas, revirtiéndose los efectos positivos con altos niveles de estrés (fechas límites, exámenes exhaustivos, conflictos interpersonales). También resaltan que mientras el estrés en momentos cercanos al aprendizaje parece mejorar la formación de MLTs, si ocurre cuando evocamos la información aprendida, tiene el efecto opuesto: estresores percibidos previos a la expresión perjudican la memoria. Adicionalmente, Vogel y Schwabe muestran evidencia acerca del cambio que el estrés genera en la forma en que las personas aprendemos; bajo condiciones estresantes parecen aprenderse asociaciones más “rígidas” entre estímulos y respuestas (un comportamiento más similar a los hábitos) en lugar de crearse representaciones “más flexibles” y complejas del entorno (Schwabe y col 2007; Seehagen y col 2015). Los autores describen entonces que el estrés no solo tiene influencia sobre cuanto aprendemos o logramos recordar, sino que puede cambiar la naturaleza de esos recuerdos, al adoptarse estrategias de aprendizaje diferentes. Tomar en consideración estos efectos es de suma importancia para los educadores también, ya que el estrés puede afectar la calidad de la enseñanza si su flexibilidad disminuye, por ejemplo.

Los resultados obtenidos en esta tesis pueden sumarse a los hallazgos realizados hasta el momento y nos permiten en conjunto elaborar estrategias que acompañen un mejor rendimiento escolar. Los resultados aquí presentados alertan acerca de la influencia de los exámenes sobre procesos de memoria extrínsecos que tienen lugar hasta una hora antes o después, y los efectos sobre aprendizajes que se adquieren con distinta fuerza. Si bien las prácticas en donde se evoca el material aprendido tienen resultados positivos sobre dichos contenidos (Karpicke y Roediger 2008), el rol de los exámenes sobre aprendizajes circundantes no relacionados, pero con los cuales están temporalmente asociados, no había sido examinada hasta el momento. Creemos que es conveniente que los educadores estén atentos a la agenda de exámenes de sus estudiantes, dado que estos podrían modular la retención de otros contenidos que se enseñan en el aula.

En conjunto estos resultados permiten que tanto profesores como estudiantes comprendan cuan poderoso puede resultar el contexto de aprendizaje, y en particular, los efectos que pueden tener los exámenes.

CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo hemos visto que existe una vasta evidencia que demuestra que el estrés es un potente modulador de las funciones cerebrales y la cognición, afectando particularmente los procesos de memoria. Mientras los efectos del estrés crónico, asociados a déficits en la MLT, han sido ampliamente estudiados, los efectos del estrés agudo han generado un mayor debate, al encontrarse efectos tanto positivos como negativos, que actualmente entendemos que están sujetos a variados factores, tanto relativos al evento de estrés per se como a las características del aprendizaje. Sin embargo, una de las observaciones más relevante en la bibliografía es el efecto positivo que un episodio de estrés agudo puede tener en la consolidación de las memorias, proceso por el cual éstas pueden ser almacenadas por un tiempo más prolongado. La presencia de un estresor puede proteger del olvido información recientemente guardada obtenida en contextos relevantes.

En el trabajo desarrollado durante esta tesis hemos visto que exponer a los animales a una experiencia de aprendizaje débil solo permite que estos formen una MCT de la tarea experimentada. Sin embargo, si este aprendizaje está asociado temporalmente a un evento estresante se forman trazas de memoria duraderas, sea tanto del espacio donde se encuentran ciertos objetos en una arena (paradigma de REO) como de la asociación de estímulos aversivos con un contexto en particular (paradigma de EI). Bajo el marco de la hipótesis de EC, sugerimos que estas MLT pueden tener características propias de procesamiento, involucrando etiquetas de aprendizaje diferentes y probablemente distintas cascadas de señalización, de manera que el estrés impacta de forma particular en cada uno de estos recuerdos. Para los paradigmas de REO y EI vimos que la MCT puede ser estabilizada en MLT cuando el evento de estrés ocurre a un tiempo específico posterior o previo al entrenamiento débil, respectivamente, y que ello depende de la síntesis de proteínas al momento de presentación del estresor. También observamos que el estrés perjudicó la formación de la MLT en ambas tareas cuando se asoció a entrenamientos fuertes, que per se disparan los procesos de consolidación.

En el capítulo que aborda los efectos del estrés en la formación de MLTs en humanos, se observaron resultados similares. Determinamos que es posible afectar positivamente la MLT de un aprendizaje gráfico si un estresor es presentado en una ventana temporal acotada cercana al aprendizaje así como también el mismo estresor puede tener una influencia negativa cuando el aprendizaje sobre la tarea gráfica es mayor.

Nuestra investigación aporta conocimiento del posible mecanismo subyacente a estos fenómenos. Proponemos que la consolidación de la MLT de un aprendizaje podría verse favorecida a través de la provisión de PRPs por parte del evento estresante, que serán capturadas hacia las sinapsis etiquetadas por el aprendizaje; pero la consolidación de la MTL también podría ser interferida cuando el estrés compite por dichas PRPs o interfiere con el etiquetado dentro del mismo sustrato neural.

La conclusión principal de este trabajo de tesis doctoral es que la consolidación de una traza mnésica puede verse influenciada por un fenómeno de estrés cercano y los efectos dependerán del estado de las redes neuronales en las estructuras encargadas de su procesamiento. La hipótesis del EC no solo ofrece un marco conceptual amplio para la interacción entre estos eventos, siempre que exista convergencia temporal y espacial de las señales, sino que parece ser un mecanismo general en la formación de la memoria, evidenciándose resultados similares tanto en roedores como humanos. Incluso, múltiples estudios realizados con otros aprendizajes débiles asociados a eventos salientes sustentan esta idea (para revisión, ver Viola y col 2014 y Moncada y col 2015). A través del establecimiento de una etiqueta conductual todos los aprendizajes son potencialmente capaces de generar una MLT, y la síntesis de PRPs gatillada por otra experiencia cercana puede permitir ese proceso. La formación y estabilidad de una MLT no solo depende de las características y la fuerza de la experiencia vivida, sino que se encuentra directamente influenciada por la activación previa o futura de los circuitos neurales involucrados en su consolidación celular.

BIBLIOGRAFIA

- Aarse J, Herlitze S y Manahan-Vaughan D (2016). The requirement of BDNF for hippocampal synaptic plasticity is experience-dependent. *Hippocampus* 26:739–751.
- Abercrombie HC, Kalin NH, Thurow ME, Rosenkranz MA y Davidson RJ (2003). Cortisol variation in humans affects memory for emotionally laden and neutral information. *Behav Neurosci.* 117:505-16.
- Abrari K, Rashidy-Pour A, Semnanian S, Fathollahi Y y Jadid M (2009). Post-training administration of corticosterone enhances consolidation of contextual fear memory and hippocampal long-term potentiation in rats. *Neurobiol Learn Mem* 91:260-265
- Abraham W y Bear M (1996). Metaplasticity: Plasticity of synaptic. *Trends Neurosci* 19: 126–130
- Agranoff BW (1965). Molecules and memories. *Perspect Biol Med* 9:13-22
- Alberini CM (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev* 89:121-45.
- Allen TA y Fortin NJ (2013). The evolution of episodic memory. *Proc Natl Acad Sci* 110:10379-86
- Andreano JM y Cahill L (2006). Glucocorticoid release and memory consolidation in men and women. *Psychol Sci* 17:466-70.
- Andrews JS (1996). Possible confounding influence of strain, age and gender on cognitive performance in rats. *Cogn Brain Res* 3:251-267.
- Arthur JS, Fong AL, Dwyer JM, Davare M, Reese E, Obrietan K e Impey S (2004). Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins. *J Neurosci* 24:4324-32.
- Atsak P, Hauer D, Campolongo P, Schelling G, Fornari RV y Roozendaal B (2015). Endocannabinoid signaling within the basolateral amygdala integrates multiple stress hormone effects on memory consolidation. *Neuropsychopharmacology* 40:1485–1494

- Ballarini F, Martínez, MC, Díaz Perez M, Moncada D y Viola H (2013). Memory in elementary school children is improved by an unrelated novel experience. *PLoS One* 8:1–7
- Ballarini F, Moncada D, Martínez MC, Alen N, Viola H (2009) Behavioral tagging is a general mechanism of long-term memory formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106:14599-604
- Barco A, Lopez de Armentia M, Alarcon JM (2008). Synapse-specific stabilization of plasticity processes: the synaptic tagging and capture hypothesis revisited ten years later. *Neurosci Biobehav Rev* 32:831-51
- Barco A, Patterson S, Alarcon JM, Gromova P, Mata-Roig M, Morozov A y Kandel ER (2005). Gene expression profiling of facilitated L-LTP in VP16-CREB mice reveals that BDNF is critical for the maintenance of LTP and its synaptic capture. *Neuron* 48:123-137
- Bayley PJ, Hopkins RO y Squire LR (2003). Successful recollection of remote autobiographical memories by amnesic patients with medial temporal lobe lesions. *Neuron* 38:135-144
- Beato M y Sánchez-Pacheco A (1996). Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* 17:587-609.
- Beckner VE, Tucker DM, Delville Y y Mohr DC (2006). Stress facilitates consolidation of verbal memory for a film but does not affect retrieval. *Behav Neurosci* 120:518-27.
- Bekinschtein P, Cammarota M y Medina JH (2014). BDNF and memory processing. *Neuropharmacology* 76:677-683
- Bekinschtein P, Kent BA, Oomen CA, Clemenson GD, Gage FH, Saksida LM y Bussey TJ (2013). BDNF in the dentate gyrus is required for consolidation of "pattern-separated" memories. *Cell Rep* 5:759-68.
- Bergado JA, Lucas M y Richter-Levin G (2011). Emotional tagging- A simple hypothesis in a complex reality. *Prog Neurobiol* 94:64-76

- Blank T, Nijholt I, Eckart K y Spiess J (2002). Priming of long-term potentiation in mouse hippocampus by corticotropin-releasing factor and acute stress: implications for hippocampus-dependent learning. *J Neurosci* 22:3788–3794
- Bourtchouladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G y Silva AJ (1994). Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79:59-68
- Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B y col (2010). The Arc of synaptic memory. *Exp Brain Res* 200:125-40
- Bramham CR, Worley PF, Moore MJ y Guzowski JF (2008). The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci* 28(46):11760-7
- Buchanan TW y Lovallo WR (2001). Enhanced memory for emotional material following stress-level cortisol treatment in humans. *Psychoneuroendocrinology* 26: 307–317
- Cadle CE y Zoladz PR (2015). Stress time-dependently influences the acquisition and retrieval of unrelated information by producing a memory of its own. *Front Psychol* 6:1–11
- Cahill L, Prins B, Weber M y McGaugh JL (1994). Beta-adrenergic activation and memory for emotional events. *Nature* 371:702-4.
- Cahill L y Alkire MT (2003). Epinephrine enhancement of human memory consolidation: Interaction with arousal at encoding. *Neurobiol Learn Mem* 79:194-198
- Cahill L y McGaugh JL (1996) Modulation of memory storage. *Curr Opin Neurobiol* 6:237-242
- Cahill L y van Stegeren A (2003). Sex-related impairment of memory for emotional events with β -adrenergic blockade. *Neurobiol Learn Mem* 79:81-88
- Cai WH, Blundell J, Han J, Greene RW y Powell CM (2006). Postreactivation glucocorticoids impair recall of established fear memory. *J. Neurosci* 26:9560–9566.

- Calabrese EJ (2008). Stress biology and hormesis: The Yerkes-Dodson law in psychology – A special case of the hormesis dose response. *Crit Rev Toxicol* 38: 453–462.
- Cassini LF, Sierra RO, Haubrich J, Crestani AP, Santana F, Oliveira Alvares L y col (2013). Memory reconsolidation allows the consolidation of a concomitant weak learning through a synaptic tagging and capture mechanism. *Hippocampus* 23:931–941.
- Chen DY, Bambah-Mukku D, Pollonini G y Alberini CM (2012). Glucocorticoid receptors recruit the CaMKII α -BDNF-CREB pathways to mediate memory consolidation. *Nat Neurosci* 15:1707-14
- Chen LY, Rex CS, Casale MS, Gall CM y Lynch G (2007). Changes in synaptic morphology accompany actin signaling during LTP. *J Neurosci* 27:5363-72
- Chen Y, Fenoglio KA, Dubé CM, Grigoriadis DE y Baram TZ (2006). Cellular and molecular mechanisms of hippocampal activation by acute stress are age-dependent. *Mol Psychiatry* 11:992-1002
- Clark RE y Martin SJ (2005). Interrogating rodents regarding their object and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol* 15:593-598
- Clarke JR, Cammarota M, Gruart A, Izquierdo I y Delgado-Garcia JM (2010). Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:2652-7
- Cocoz V, Maldonado H y Delorenzi A (2011). The enhancement of reconsolidation with a naturalistic mild stressor improves the expression of a declarative memory in humans. *Neurosci* 185:61-72
- Cordero MI, Venero C, Kruyt ND y Sandi C (2003). Prior exposure to a single stress session facilitates subsequent contextual fear conditioning in rats. Evidence for a role of corticosterone. *Horm Behav* 44: 338-35
- Costa-Mattioli M y Sonenberg N (2008). Translational control of gene expression: a molecular switch for memory storage. *Prog Brain Res* 169:81-95
- Cymeryng CB, Dada LA y Podestá EJ (1998). Effect of nitric oxide on rat adrenal zona fasciculata steroidogenesis. *J Endocrinol* 158:197–203

- Datson NA, Morsink MC, Meijer OC y de Kloet ER (2008). Central corticosteroid actions: Search for gene targets. *Eur J Pharmacol* 583:272–289.
- Datson NA, van der Perk J, de Kloet ER y Vreugdenhil E (2001). Identification of corticosteroid-responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression. *Eur J Neurosci* 14:675-89.
- Davis CD, Jones FL y Derrick BE (2004). Novel environments enhance the induction and maintenance of long-term potentiation in dentate gyrus. *J Neurosci* 24: 6497-6506
- Davis HP y Squire LR (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 96:518-559
- Degroot A, Wade M, Salhoff C, Davis RJ, Tzavara ET y Nomikos G (2004). Exposure to an elevated platform increases plasma corticosterone and hippocampal acetylcholine in the rat: reversal by chlordiazepoxide. *Eur J Pharmacol* 493: 103–109.
- De Kloet ER (2014). From receptor balance to rational glucocorticoid therapy. *Endocrinology*, 155:2754–2769.
- de Kloet ER, Joëls M y Holsboer F (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463-475
- de Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M (1999). Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* 22:422-6.
- de Oliveira Alvares L, Engelke D, Diehl F, Scheffer-Teixeira R, Haubrich J, de Freitas Cassini L y col (2010). Stress response recruits the hippocampal endocannabinoid system for the modulation of fear memory. *Learn Memo* 17:202–209
- Deppermann S, Storchak H, Fallgatter AJ y Ehlis A (2014). Stress induced neuroplasticity: (mal) adaptation to adverse life events in patients with PTSD- a critical overview. *Neurosci* 283:166–177.

- de Quervain DJ, Roozendaal B, Nitsch RM, McGaugh J L y Hock C. (2000). Acute cortisone administration impairs retrieval of long-term declarative memory in humans. *Nat Neurosci* 3:313–314.
- Dere E, Huston JP, de Souza Silva MA (2005). Integrated memory for objects, places and temporal order: evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiol Learn Mem* 84:214-221
- Dere E, Huston JP, de Souza Silva MA (2007). The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 31:673-704
- de Veld DM, Riksen-Walraven JM y de Weerth C (2014). Acute psychosocial stress and children's memory. *Stress* 17: 305-313
- Diamond DM, Campbell AM, Park CR, Halonen J y Zoladz PR (2007). The temporal dynamics model of emotional memory processing: a synthesis on the neurobiological basis of stress-induced amnesia, flashback and traumatic memories, and the Yerkes-Dodson law. *Neural Plasticity* 2007:60803.
- Diamond DM, Park CR y Woodson JC (2004). Stress generates emotional memories and retrograde amnesia by inducing an endogenous form of hippocampal LTP. *Hippocampus* 14:281–291
- Dojman M (2014). *The principles of learning and behavior*. 7th Ed by Cengage Learning, Inc
- Dong Z, Gong B, Li H, Bai Y, Wu X, Huang, Y y col (2012). Mechanisms of hippocampal long-term depression are required for memory enhancement by novelty exploration. *J Neurosci* 32:11980–11990.
- Dudai Y (2002). *Memory from A to Z: keywords, concepts and beyond*. Oxford University Press New York.
- Dudai Y (2012). The restless engram: consolidations never end. *Annu Rev Neurosci* 35: 227-247
- Dudai Y y Eissenberg M (2004). Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44:93-100

- Dunsmoor JE, Murty VP, Davachi L y Phelps E (2015). Emotional learning selectively and retroactively strengthens memories for related events. *Nature* 520:345–348
- Easterbrook JA (1959). The effect of emotion on the utilization and the organization of behavior. *Psychol Rev* 66:183–201
- Eichenbaum H (2004). Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 44:109-120
- Ekstrom AD, Kahana MJ, Caplan JB, Fields TA, Isham EA, Newman EL y Fried I (2003). Cellular networks underlying human spatial navigation. *Nature* 425:184-188.
- Ennaceur A y Delacour J (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats- 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31:47-59
- Fan K-M, Qiu L-J, Ma N, Du Y-N, Qian Z-Q, Wei C-L y col (2019). Acute stress facilitates LTD induction at glutamatergic synapses in the hippocampal CA1 region by activating opioid receptors on GABAergic neurons. *Front Neurosci* 13(71):1-13
- Fedulov V, Rex CS, Simmons D, Palmer L, Gall CM y Lynch G (2007). Evidence that long-term potentiation occurs within individual hippocampal synapses during learning. *J Neurosci* 27:8031-9
- Finn B y Roediger HL (2011). Enhancing retention through reconsolidation: negative emotional arousal following retrieval enhances later recall. *Psychol Sci* 22(6):781-786.
- Finsterwald C y Alberini CM (2014). Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: From adaptive responses to psychopathologies. *Neurobiol Learn Mem* 112: 17–29
- Fonseca R, Nägerl UV, Morris RG y Bonhoeffer T (2004). Competing for memory: hippocampal LTP under regimes of reduced protein synthesis. *Neuron* 44:1011-20.
- Frey S y Frey J (2008). ‘Synaptic tagging’ and ‘cross-tagging’ and related associative reinforcement processes of functional plasticity as the cellular basis for memory formation. *Prog Brain Res* 169:117-143

- Frey U y Morris RG (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385:533-536
- Frey U y Morris RG (1998). Weak before strong: dissociating synaptic tagging and plasticity-factor accounts of late-LTP. *Neuropharmacology* 37:545-552
- Fuchs E, Flugge G, Czeh B (2006). Remodeling of neuronal networks by stress. *Front Biosci* 11:2746-58.
- Ganon-Elazar E y Akirav I (2009). Cannabinoid receptor activation in the basolateral amygdala blocks the effects of stress on the conditioning and extinction of inhibitory avoidance. *J neurosci* 29:11078-88
- Giovaninni MG, Lana D y Pepeu G (2015). The integrated role of ACh, ERK and mTOR in the mechanisms of hippocampal inhibitory avoidance memory. *Neurobiol Learn Mem* 119: 18–33
- Goh JJ y Manahan-Vaughan D (2013). Spatial object recognition enables endogenous LTD that curtails LTP in the mouse hippocampus. *Cerebral Cortex* 23:1118-25
- Gold PE, McGaugh JL. (1975). A single-trace, two-process view of memory storage processes. In: Deutsch Eds. *Short-term Memory*, Academic Press. New York. 355–78.
- Govindarajan A, Israely I, Huang SY y Tonegawa S (2011). The dendritic branch is the preferred integrative unit for protein synthesis-dependent LTP. *Neuron* 69:132-46.
- Groc L, Choquet D y Chaouloff F (2008). The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation. *Nature Neurosci* 11: 868–870.
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER y Joëls M (2011). Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *J Endocrinol* 209:153–167.
- Guzowski JF y McGaugh JL (1997). Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element-binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2693-8

- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA y Worley PF (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci* 2:1120-24
- Han JH, Kushner S, Yiu AP, Cole CJ, Matynia A, Brown R y col (2007). Neuronal competition and selection during memory formation. *Science* 316:457-460
- Han JH, Kushner S, Yiu AP, Hsiang HL, Buch T, Waisman A y col (2009). Selective erasure of a fear memory. *Science* 323:1492-6
- Harrell JM, Murphy PJ, Morishima Y, Chen H, Mansfield JF, Galigniana MD y Pratt WB (2004). Evidence for glucocorticoid receptor transport on microtubules by dynein. *J Biol Chem* 279:54647-54.
- Herweg NA y Kahana MJ (2018). Spatial Representations in the Human Brain. *Front Hum Neurosci* 12:297.
- Holmes A y Wellman CL (2009). Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 33:773-783
- Howland JG y Wang YT (2008). Synaptic plasticity in learning and memory: stress effects in the hippocampus. *Prog Brain Res.* 169:145-158
- Hsiang HL, Epp Jr, van den Oever MC, Yan C, Rashid Aj, Insel N y col (2014). Manipulating a <<Cocain engram>> in mice. *J Neurosci* 34:14115-27
- Hughes E, Shymansky T, Swinton E, Lukowiak KS, Swinton C, Sunada H y col (2017). Strain-specific differences of the effects of stress on memory in *Lymnaea*. *J Exp Biol* 220: 891-899.
- Hupbach A y Fieman R (2012). Moderate stress enhances immediate and delayed retrieval of educationally relevant material in healthy young men. *Behav Neurosci* 126:819-25.
- Igaz LM, Vianna MR, Medina JH e Izquierdo I (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J Neurosci* 22:6781-9

- Inoue R, Abdou K, Hayashi-Tanaka A, Muramatsu SI, Mino K, Inokuchi K y Mori H (2018). Glucocorticoid receptor-mediated amygdalar metaplasticity underlies adaptive modulation of fear memory by stress. *Elife* 7:e34135
- Izquierdo, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci* 29:496-505
- Izquierdo I y Medina JH (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 68:285-316
- Izquierdo I y Medina JH (1998). Mechanisms for memory type differ. *Nature* 393:635-6
- Izquierdo I, Quillfeldt JA, Zanatta MS, Quevedo J, Schaeffer E, Schmitz PK y Medina JH (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
- Jarrard LE (1993). On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol* 60: 9–26
- Jiang A, Tran TT, Madison FN y Bakker A (2019). Acute stress-induced cortisol elevation during memory consolidation enhances pattern separation. *Learn Mem* 26:121–127
- Joëls M (2006). Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. *Trends Pharmacol Sci* 27:244-250
- Joëls M y Baram TZ (2009). The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* 10:459-466
- Joëls M, Fernandez G y Roozendaal B (2011). Stress and emotional memory: a matter of timing. *Trends Cogn Sci* 15:280-288
- Joëls M, Pu Z, Wiegert O, Oitzl MS y Krugers HJ (2006). Learning under stress: How does it work? *Trends Cogn Sci* 10:152–158.

- Joëls M, Velzing E, Nair S, Verkuyl JM y Karst H (2003). Acute stress increases calcium current amplitude in rat hippocampus: temporal changes in physiology and gene expression. *Eur J Neurosci* 18: 1315-24
- Josselyn SA, Köhler S, Frankland PW (2015). Finding the engram. *Nat Rev Neurosci* 16:521-534
- Josselyn SA, Shi C, Carlezon WA Jr, Neve RL, Nestler EJ y Davis M (2001). Long-term memory is facilitated by cAMP response element-binding protein overexpression in the amygdala. *J Neurosci* 21:2404-12.
- Kandel ER (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294:1030-8
- Kandel ER (2007). *In search of memory: the emergence of a new science of mind*. New York: Norton & Company
- Kandel ER, Dudai Y y Mayford MR (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell* 157:163-186
- Kandel ER, Schwartz JHy Jessell TM (2000). *Principles of neural sciences*. Forth Ed: McGraw-Hill
- Karpicke JD y Roediger HL (2008). The critical importance of retrieval for learning. *Science* 319: 966-968
- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schütz G y Joëls (2005). Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 19204–7
- Kavushansky A y Richter-Levin G (2006). Effects of stress and corticosterone on activity and plasticity in the amygdala. *J Neurosci Res* 84:1580-7
- Kemp A y Manahan-Vaughan D (2004). Hippocampal long-term depression and long-term potentiation encode different aspects of novelty acquisition. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (21):8192-97

- Kim JJ y Fanselow MS (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256:675–677.
- Kim JJ, Koo JW, Lee HJ y Han J (2005). Amygdalar inactivation blocks stress-induced impairments in hippocampal long-term potentiation and spatial memory. *J Neurosci* 25:1532–1539.
- Kim J, Song EY, Kosten TA (2006). Stress effects in the hippocampus: synaptic plasticity and memory. *Stress* 9:1-11.
- Korte S, de Boer SF, de Kloet ER y Bohus B (1995). Anxiolytic-like effects of selective mineralocorticoid and glucocorticoid antagonist on fear enhanced behavior in the elevated plus-maze. *Psychoneuroendocrinology* 20:385–394
- Kuhlmann S, Piel M y Wolf OT (2005). Impaired memory retrieval after psychosocial stress in healthy young men. *J Neurosci* 25:2977–2982
- LaBar KS y Phelps EA (2005). Reinstatement of conditioned fear in humans is context dependent and impaired in amnesia. *Behav Neurosci* 119:677-86.
- Lalumiere RT, Mcgaugh JL y McIntyre CK (2017). Emotional modulation of learning and memory: pharmacological implications. *Pharmacol Rev* 69:236–255.
- Lee I y Solivan F (2008). The roles of the medial prefrontal cortex and hippocampus in a spatial paired-association task. *Learn Mem.* 15(5): 357-67.
- Lee JL, Everitt BJ y Thomas KL (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304:839-843
- Li S, Cullen WK, Anwyl R y Rowan MJ (2003). Dopamine-dependent facilitacion of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty. *Nat Neurosci* 6:526-531
- Li X, Qiu J, Wang J, Zhong Y, Zhu J y Chen Y (2001) Corticosterone-induced rapid phosphorylation of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in PC12 cells. *FEBS Lett* 492:210-214.

- LoPilato AM, Addington J, Bearden CE, Cadenhead KS, Cannon TD, Cornblatt BA y col (2019). Stress perception following childhood adversity: unique associations with adversity type and sex. *Dev Psychopathol* 2019:1-14
- Lu B, Nagappan G y Lu Y (2014). BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. Lewin and Carter (eds.), *Neurotrophic Factors, Handbook of Experimental Pharmacology* 220.
- Lu Y, Ji Y, Ganesan S, Schloesser R, Martinowich K, Sun M y col (2011). TrkB as a potential synaptic and behavioral tag. *J Neurosci* 31: 11762–71.
- Lupien SJ, Maheu F, Tu M, Fiocco A y Schramek TE (2007). The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain Cogn* 65(3):209-37
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR y Heim C (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci* 10:434-445
- Lupien SJ, Wilkinson CW, Brière S, Ng Ying Kin NM, Meaney MJ y Nair NP (2002). Acute modulation of aged human memory by pharmacological manipulation of glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3798-807.
- Maheu FS, Joobar R, Beaulieu S y Lupien SJ (2004). Differential effects of adrenergic and corticosteroid hormonal systems on human short- and long-term declarative memory for emotionally arousing material. *Behav Neurosci* 118:420-428.
- Maier SF y Watkins LR (2005). Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav Rev* 29:829–841
- Maldonado NM, Martijena ID y Molina VA (2011). Facilitating influence of stress on the consolidation of fear memory induced by a weak training: reversal by midazolam pretreatment. *Behav Brain Res* 225:77–84
- Malenka RC y Nicoll RA (1999). Long-term potentiation- a decade of progress? *Science* 285:1870-4

- Marmigère F, Givalois L, Rage F, Arancibia S y Tapia-Arancibia L (2003). Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats. *Hippocampus* 13:646–655.
- Maroun M y Akirav I (2008). Arousal and stress effects on consolidation and reconsolidation of recognition memory. *Neuropsychopharmacology* 33:394-405
- Martin KC, Casadio A, Zhu H, Yaping E, Rose JC, Chen M y col (1997). Synapse-specific, long-term facilitation of Aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* 91:927-938
- Martin KC y Kosik KS (2002). Synaptic tagging—who is it?. *Nat Rev Neurosci* 3:813-820
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23:649-711
- Martin SJ y Morris RG (2002). New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* 12:609-36.
- Martin SJ y Morris RG (2012). New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* 12:609-36.
- Martínez MC, Alen N, Ballarini F, Moncada D y Viola H (2012). Memory traces compete under regimes of limited arc protein synthesis: implications for memory interference. *Neurobiol Learn Mem* 98:165–173.
- Martínez MC, Villar ME, Ballarini F, Viola H (2014). Retrograde interference of object-in-context long-term memory: role of dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. *Hippocampus* 24:1482-92
- McClelland JL, McNaughton BL y O'Reilly RC (1995). Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychol Rev* 102:419-457
- McEwen BS y Sapolsky RM (1995). Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol* 5:205–216.

McGaugh JL (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153:1351–9.

McGaugh JL (2000). Memory-a century of consolidation. *Science* 287:248-251

McGaugh JL (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 27:1-28

McGaugh JL (2013). Making lasting memories: remembering the significant. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(2):10402-7.

McGaugh J y Roozendaal B (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr Opin Neurobiol* 12:205–210

McIntyre CK, McGaugh JL y Williams CL (2012). Interacting brain systems modulate memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev* 36:1750-62

McIntyre CK, Miyashita T, Setlow B, Marjon KD, Steward O, Guzowski JF y McGaugh JL (2005). Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of Arc protein in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* 102:10718-23

McReynolds JR, Anderson KM, Donowho KM, McIntyre CK (2014). Noradrenergic actions in the basolateral complex of the amygdala modulate Arc expression in hippocampal synapses and consolidation of aversive and non-aversive memory. *Neurobiol Learn Mem* 115:49-57

McReynolds JR, Donowho K, Abdi A, McGaugh JL, Roozendaal B y McIntyre CK (2010). Memory-enhancing corticosterone treatment increases amygdala norepinephrine and Arc protein expression in hippocampal synaptic fractions. *Neurobiol Learn Memory* 93:312-21

Medina JH y Viola H (2018). ERK1/2: a key cellular component for the formation, retrieval, reconsolidation and persistence of memory. *Front Mol Neurosci* 11:361.

Milner B, Squire LR y Kandel ER (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20:445-468

- Mineka S y Hendersen RW (1985). Controllability and predictability in acquired motivation. *Annu Rev Psychol* 36:495–529.
- Moncada D, Ballarini F, Martínez MC, Frey JU, Viola H (2011). Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:12931-6
- Moncada D, Ballarini F y Viola H (2015). Behavioral tagging: A translation of the synaptic tagging and capture hypothesis. *Neural Plasticity* 650780:1–21.
- Moncada D y Viola H (2007). Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: evidence for a behavioral tagging. *J. Neurosci* 27:7476- 7481.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN y O'Keefe J (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683
- Moscovitch M, Nadel L, Winocur G, Gilboa A y Rosenbaum RS (2006). The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol* 16:179-190
- Moser MB y Moser EI (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8:608-619
- Muller GE y Pilzecker A (1900). Experimentelle Beitrage zur Lehre von Gedachtniss. *Z Psychol* 1:1-288
- Mumbai DG, Gaskin S, Glenn MJ, Schramek TE, Lehmann H (2002). Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learn Mem* 9(2):49-57.
- Nadel L, Hupbach A, Gomez R y Newman-Smith K (2012). Memory formation, consolidation and transformation. *Neurosci Biobehav Rev* 36:1640-45
- Nadel L y Moscovitch M (1997). Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* 7:217-227
- Nader K, Schafe GE y LeDoux JE (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation and retrieval. *Nature* 406:722-726

- Navakkode S, Sajikumar S, Frey JU (2005). Mitogen-activated protein kinase-mediated reinforcement of hippocampal early long-term depression by the type IV-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram and its effect on synaptic tagging. *J Neurosci* 25:10664-70.
- Ness D y Calabrese P (2016). Stress Effects on Multiple Memory System Interactions. *Neural Plast.* 4932128:1-20
- Nielson KA y Arentsen TJ (2012). Memory modularion in the classroom: selective enhancement of college examination performance by arousal induced after lecture. *Neurobiol Learn Mem* 98:12-16
- Ogrèn SO y Stiedl O (2015). Passive avoidance. *Encyclopedia of Pshycopharmacology*. Price(eds) 1120-8
- O'Keefe J y Dostrovsky J (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34:171-175
- Okuda S, Roozendaal B y McGaugh JL (2004). Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:853-8
- Oyola MG y Handa RJ (2017). Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress* 20:476-494
- Ozawa T, Yamada K e Ichitani Y (2014). Hippocampal BDNF treatment facilitates consolidation of spatial memory in spontaneous place recognition in rats. *Behav Brain Res* 263:210–216.
- Park CR, Zoladz PR, Conrad CD, Fleshner M y Diamond DM (2008) Acute predator stress impairs the consolidation and retrieval of hippocampus-dependent memory in male and female rats. *Learn Mem* 15:271–280
- Pavlov IP (1927). *Conditioned reflexes*. Ed: Oxford University Press.
- Paxinos G y Watson C (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (6th ed.). London: Elsevier Acad Press.

- Payne J, Jackson E, Ryan L, Hoscheidt S, Jacobs J y Nadel L (2006) The impact of stress on neutral and emotional aspects of episodic memory. *Memory* 14:1-16
- Pedraza LK, Sierra RO, Boos FZ, Haubrich J, Quillfeldt JA y de Oliveira Alvares L (2016). The dynamic nature of systems consolidation: stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. *Hippocampus* 26:362-371
- Pedreira ME, Perez Cuesta LM 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* 22:8305-11
- Phillips RG y LeDoux LE (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274–285.
- Pinnock SB y Herbert J (2001). Corticosterone differentially modulates expression of corticotropin releasing factor and arginine vasopressin mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus following either acute or repeated restraint stress. *Eur J Neurosci* 13 (3):576–584
- Prager EM y Johnson LR (2009). Stress at the synapse: signal transduction mechanisms of adrenal steroids at neuronal membranes. *Sci signal* 2(86):re5
- Qiu J, Wang P, Jing Q, Zhang W, Li X, Zhong Y y col (2001). Rapid activation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase by corticosterone in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 287:1017–1024
- Quent JA, McCullough AM, Sazma M, Wolf OT y Yonelinas AP (2018). Reward anticipation modulates the effect of stress-related increases in cortisol on episodic memory. *Neurobiol Learn Mem* 147:65-73
- Quevedo J, Vianna M, Martins MR, Barichello T, Medina JH, Roesler R e Izquierdo I. (2004). Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behavioural Brain Research* 154: 339–343.
- Raio CM y Phelps EA (2015). The influence of acute stress on the regulation of conditioned fear. *Neurobiol Stress* 1:134-146

- Ramachandran B y Frey J (2009). Interfering with the actin network and its effect on long-term potentiation and synaptic tagging in hippocampal CA1 neurons in slices in vitro. *J Neurosci* 29:12167–12173.
- Rau V, DeCola JP y Fanselow MS (2005). Stress-induced enhancement of fear learning: an animal model of posttraumatic stress disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1207-23
- Redondo RL y Morris RG (2011). Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nat Rev Neurosci* 12:17-30
- Redondo RL, Okuno H, Spooner PA, Frenguelli BG, Bito H, Morris RG (2010). Synaptic tagging and capture: differential role of distinct calcium/calmodulin kinases in protein synthesis-dependent long-term potentiation. *J Neurosci* 30:4981-9
- Revest JM, Di Blasi F, Kitchener P, Rougé-Pont F, Desmedt A, Turiault M y col (2005). The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids. *Nat Neurosci* 8:664-672
- Revest JM, Roux AL, Roullot-Lacarrière V, Kaouane N, Vallée M, Kasanetz F y col (2014). BDNF-TrkB signaling through Erk1/2 (MAPK) phosphorylation mediates the enhancement of fear memory induced by glucocorticoids. *Mol Psychiatry* 19:1001–1009.
- Rey A (1959). Test de copie et de reproduction de memoire de figures geometriques complexes [A test of copy and recall of a complex geometric figure]. Ed du Cent Psychologie App I.
- Richter-Levin G y Akirav I (2003). Emotional tagging of memory formation--in the search for neural mechanisms. *Brain Res Rev* 43:247-56.
- Richter-Levin G y Maroun M (2010). Stress and amygdala suppression of metaplasticity in the medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex* 20:2433-41
- Rodrigues SM, LeDoux JE y Sapolsky RM (2009). The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annu Rev Neurosci* 32:289-313

- Rodríguez Manzanares PA, Isoardi NA, Carrer HF y Molina VA (2005). Previous stress facilitates fear memory, attenuates GABAergic inhibition, and increases synaptic plasticity in the rat basolateral amygdala. *J Neurosci* 25: 8725-34
- Rogerson T, Cai DJ, Frank A, Sano Y, Shobe J, Lopez-Aranda MF, Silva AJ (2014). Synaptic tagging during memory allocation. *Nat Rev Neurosci* 15:157-169
- Roozendaal B (2000). Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology* 25:213-238
- Roozendaal B (2002). Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiol Learn Mem* 78: 578-595
- Roozendaal B, Barsegyan A y Lee S (2008) Adrenal stress hormones, amygdala activation, and memory for emotionally arousing experiences. *Prog Brain Res* 167:79-97
- Roozendaal B, de Quervain D, Schelling, G y McGaugh JL (2004). A systemically administered β -adrenoceptor antagonist blocks corticosterone-induced impairment of contextual memory retrieval in rats. *Neurobiol Learn Mem* 81:150–154
- Roozendaal B, Hernandez A, Cabrera SM, Hagewoud R, Malvaez M, Stefanko DP y col (2010). Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *J Neurosci* 30:5037-46.
- Roozendaal B, McEwen BS y Chattarji S (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci.* 10:423-433
- Roozendaal B y McGaugh JL (1997). Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. *Eur J Neurosci* 9:76-83.
- Roozendaal B, Nguyen BT, Power AE y McGaugh JL (1999). Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11642-7

- Roozendaal B, Okuda S, Van der Zee EA y McGaugh JL (2006). Glucocorticoid enhancement of memory requires arousal-induced noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 6741–6
- Rossato JI, Bevilaqua LR, Myskiw JC, Medina JH, Izquierdo I y Cammarota M (2007). On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem* 14:36-46
- Sajikumar S, Navakkode S y Frey JU (2007). Identification of compartment- and process-specific molecules required for “synaptic tagging” during long-term potentiation and long-term depression in hippocampal CA1. *J Neurosci* 27:5068-80
- Sajikumar S, Navakkode S, Sacktor TC y Frey JU (2005). Synaptic tagging and cross-tagging: the role of protein kinase Mzeta in maintaining long-term potentiation but not long-term depression. *J Neurosci* 25:5750-6
- Salvetti B, Morris RG y Wang SH (2014). The role of rewarding and novel events in facilitating memory persistence in a separate spatial memory task. *Lear Mem* 21:61–72
- Sandi C (1998). The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage. *Neural Plasticity* 6 (3):41–52
- Sandi C (2004). Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nat Rev Neurosci* 5:917–930.
- Sandi C y Loscertales M (1999). Opposite effects on NCAM expression in the rat frontal cortex induced by acute vs. chronic corticosterone treatments. *Brain Res* 828 (1-2): 127–134.
- Sandi C, Loscertales M y Guaza C (1997). Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *Eur J Neurosci* 9: 637-642
- Sandi C y Pinelo-Nava MT (2007). Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural Plasticity* 78970:1-20.

- Sano Y, Shobe JL, Zhou M, Huang S, Shuman T, Cai DJ y col (2014). CREB regulates memory allocation in the insular cortex. *Curr Biol* 24: 2833-7
- Sarabdjitsingh RA, Joëls M y de Kloet ER (2012). Glucocorticoid pulsatility and rapid corticosteroid actions in the central stress response. *Physiol Behav* 106:73–80
- Sazma MA, McCullough AM, Shields GS y Yonelinas AP (2019). Using acute stress to improve episodic memory: The critical role of contextual binding. *Neurobiol Learn Mem* 158:1-8.
- Schacter DL (2001). *Forgotten ideas, neglected pioneers: Richard Semon and the story of memory.* Ed: Routledge.
- Schafe GE, Nadel NV, Sullivan GM, Harris A y LeDoux JE (1999). Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA and MAP kinase. *Learn Mem* 6:97-110
- Schmidt MV, Abraham WC, Maroun M, Stork O y Richter-Levin G (2013). Stress-induced metaplasticity: From synapses to behavior. *Neurosci* 250:112–120.
- Schomaker J, van Bronkhorst M y Meeter M (2014). Exploring a novel environment improves motivation and promotes recall of words. *Front.Psychol* 5:918.
- Schwabe L, Oitzl MS, Philippson C, Richter S, Bohringer A, Wippich W y Schachinger H (2007). Stress modulates the use of spatial versus stimulus-response learning strategies in humans. *Learn Mem* 14:109–116
- Scoville WB y Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21
- Seehagen S, Schneider S, Rudolph J, Ernst S y Zmyj N (2015). Stress impairs cognitive flexibility in infants. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:12882-6
- Segal SK, Simon R, Mcfarlin S, Alkire M, Desai A y Cahill L (2014). Glucocorticoids interact with noradrenergic activation at encoding to enhance long-term memory for emotional material in women. *Neurosci* 277:267-272

- Segev A, Ramot A y Akirav I (2012) Stress hormones receptors in the amygdala mediate the effects of stress on the consolidation, but not the retrieval, of a non aversive spatial task. *PLoS ONE* 7: e29988.
- Sekeres MJ, Mercaldo V, Richards B, Sargin D, Mahadevan V, Woodin M y col (2012). Increasing CR1 function in dentate gyrus during memory formation or reactivation increases memory strength without compromising memory quality. *J Neurosci* 32: 17857-68
- Shields GS, Sazma MA, Mccullough AM y Yonelinas AP (2017). The effects of acute stress on episodic memory: a meta-analysis and integrative review. *Psychol Bull* 143:1–40.
- Shin MS, Park SY, Park SR, Seol SH y Kwon JS (2006). Clinical and empirical applications of the Rey-Osterrieth complex figure test. *Nat Protoc* 1: 892–899
- Shires KL, Da Silva BM, Hawthorne JP, Morris RG y Martin SJ (2012). Synaptic tagging and capture in the living rat. *Nat. Commun* 3:1246
- Shors TJ (2004). Learning during stressful times. *Learn Mem* 11:137–144
- Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW y Kida S (1998). CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21:127-148
- Silva AJ, Zhou Y, Rogerson T, Shobe J, Balaji J (2009). Molecular and celular approaches to memory allocation in neural circuits. *Science* 326:391-395
- Skinner BF (1938). *The behavior of organisms: an experimental analysis*. Ed: D. Appleton & Company.
- Slipczuk L, Bekinschtein P, Katche C, Cammarota M, Izquierdo I y Medina JH (2009). BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *PLoS One* 4: 1–13.
- Smeets T, Giesbrecht T, Jelacic M y Merckelbach H (2007). Context-dependent enhancement of declarative memory performance following acute psychosocial stress. *Biol Psychol* 76: 116–123
- Squire LR (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82: 171-177

- Squire LR y Alvarez P (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol* 5:169-177
- Squire LR y Kandel ER (2000). *Memory: from mind to molecules*. Ed: Freedman & Co.
- Squire LR y Zola-Morgan S (1988). Memory: brain systems and behavior. *Trends Neurosci* 11:170-5
- Steckler T, Drinkenburg WH, Sagal A, Aggleton JP (1998). Recognition memory in rats—I: Concepts and Clasiffication. *Prog Neurobiol* 54: 289-311
- Steidl S, Razik F y Anderson AK (2011). Emotion Enhanced Retention of Cognitive Skill Learning. *Emotion* 11:12-19
- Straube, T. Korz V, Balschun D, Frey JU (2003). Requirement of beta-adrenergic receptor activation and protein synthesis for LTP-reinforcement by novelty in rat dentate gyrus. *J Physiol* 552:953-960.
- Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R (2006). Minireview: Rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology* 147:5549–56
- Taubenfeld SM, Wiig KA, Bear MF y Alberini CM (1999). A molecular correlate of memory and amnesia in the hippocampus. *Nat Neurosci* 2:309-310
- ter Horst JP, van der Mark MH, Arp M, Berger S, de Kloet ER y Oitzl MS (2012). Stress or no stress: Mineralocorticoid receptors in the forebrain regulate behavioral adaptation. *Neurobiol Learn Mem* 98:33–40.
- Tubidry S y Davachi L (2011). Medial temporal lobe contributions to episodic sequence encoding. *Cerebral Cortex* 21:272-280
- Tzingounis AV y Nicoll R (2006). *Arc/Arg3.1*: linking gene expression to synaptic plasticity and memory. *Neuron* 52:403-407

- Uysal N, Sisman AR, Dayi A, Ozbal S, Cetin F, Baykara B y col (2012). Acute footshock-stress increases spatial learning-memory and correlates to increased hippocampal BDNF and VEGF and cell numbers in adolescent male and female rats. *Neurosci Lett* 514:141-6
- Uzakov S, Frey JU y Korz V (2005). Reinforcement of rat hippocampal LTP by holeboard training. *Learn Mem* 12: 165-171.
- van Stegeren AH, Roozendaal B, Kindt M, Wolf OT y Joëls M (2010). Interacting noradrenergic and corticosteroid systems shift human brain activation patterns during encoding. *Neurobiol Learn Mem.* 93:56-65.
- Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM, Walz R, Medina JH e Izquierdo I (2000). Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *An Acad Bras Cienc*, 72(3):353-64.
- Villar ME, Martínez MC, Lopes da Cunha P, Ballarini F y Viola H (2016). Memory consolidation and expression of object recognition are susceptible to retroactive interference. *Neurobiol Learn Mem* 138:198–205
- Viola H, Ballarini F, Martínez MC y Moncada D (2014). The tagging and capture hypothesis from synapse to memory. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 122:391–423.
- Vogel S y Schwabe L (2016). Learning and memory under stress: implications for the classroom. *npjSci Learn* 1:16011
- Vorhees CV and Williams CV (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 1: 848–858.
- Wan H, Aggleton JP y Brown MW (1999). Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *J Neurosci* 19:1142-48
- Wang SH, Redondo RL y Morris RG (2010). Relevance of synaptic tagging and capture to the persistence of long-term potentiation and everyday spatial memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 19537-42

- Wang XY, Zhao M, Ghitza U E, Li YQ y Lu L (2008). Stress impairs reconsolidation of drug memory via glucocorticoid receptors in the basolateral amygdala. *J. Neurosci.* 28:5602–5610
- Wibrand K, Pai B, Siripornmongcolchai T, Bittins M, Berentsen B, Ofte ML y col (2012). MicroRNA regulation of the synaptic plasticity-related gene *Arc*. *Plos One* 7 (7): e41688.
- Winograd M y Viola H (2004). Detection of novelty, but not memory of spatial habituation, is associated with an increase in phosphorylated cAMP response element-binding protein levels in the hippocampus. *Hippocampus* 14:117-123
- Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ (2008). Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1055-70
- Whitlock JR, Heynen AJ, SHule MG y Bear MF (2006). Learning induce long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313: 1093-97
- Wotus C, Lilley TR, Neal AS, Suleiman NL, Schmuck SC, Smarr BL y col (2013). Forced desynchrony reveals independent contributions of suprachiasmatic oscillators to the daily plasma corticosterone rhythm in male rats. *Plos One* 8(7):e68793
- Wu Y y Shuterland RJ (2006). Hippocampal evoked potentials in novel environments: a behavioral clamping method. *Behav Brain Res* 172: 63-71
- Xing X, Wang H, Liang J, Bai Y, Liu Z y Zheng X (2014). Mineralocorticoid receptors in the ventral hippocampus are involved in extinction memory in rats. *PsyCh Journal* 3: 201–213.
- Yamadori A, Yoshida T, Mori E y Yamashita H (1996). Neurological basis of skill learning. *Cogn Brain Res.* 5:49-54
- Yerkes RM y Dodson JD (1908). The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation. *J Comp Neurol Psychol* 18: 459–482
- Ying SW, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss T y Bramham CR (2002). Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of *Arc* synthesis. *J Neurosci* 22:1532-40

- Yiu AP, Mercaldo V, Yan C, Richards B, Rashid AJ, Hsiang HL y col (2014). Neurons are recruited to a memory trace based on relative neuronal excitability immediately before training. *Neuron*:722-735
- Young SL, Bohenek DL y Fanselow MS (1994). NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: immunization against amnesia by context exposure. *Behav Neurosci* 108:19-29
- Yu JY, Fang P, Wang C, Wang X, Li K, Gong Q y col (2018). Dorsal CA1 interneurons contribute to acute stress-induced spatial memory deficits. *Neuropharmacology* 135:474-486
- Zalachoras I, Houtman R y Meijer OC (2013). Understanding stress-effects in the brain via transcriptional signal transduction pathways. *Neuroscience* 242:97–109.
- Zhou Y, Won J, Karlsson MG, Zhou M, Rogerson T, Balaji J y col (2009). CREB regulates excitability and the allocation of memory to subsets of neurons in the amygdala. *Nat Neurosci* 12:1438-43
- Zola SM, Squire LR, Teng RE, Stefanacci L, Buffalo EA y Clark RE (2000). Impaired recognition memory in monkeys after damage limited to the hippocampal region. *J Neurosci* 20(1): 451-63.
- Zoladz PR, Clark B, Warnecke A, Smith L, Tabar J y Talbot JN (2011). Pre-learning stress differentially affects long-term memory for emotional words, depending on temporal proximity to the learning experience. *Physiol Behav* 103:467–476