

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Tesis para optar por el título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Bioquímica Gina Granja Galeano

**“Modulación de la actividad del sistema  
glucocorticoide por parte del  
receptor CB1 cannabinoide.”**

Director: Dr. Federico Monczor

Co-Directora: Dra. Ana Franchi

Laboratorio de Farmacología de Receptores

Instituto de Investigaciones Farmacológicas (UBA-CONICET)

Marzo de 2019



## **Agradecimientos**

A **Fede**, mi director. Gracias por guiarme a lo largo de todos estos años, con paciencia, alimentando mi creatividad y haciéndome crecer como profesional.

A **Ana**, mi codirectora. Por darme la oportunidad de trabajar junto a la gente del CEFYBO, por tu apoyo genuino y desinteresado, por estar siempre que necesité un consejo. Gracias!

A **Naty**, gracias por brindarme toda tu experiencia y tus consejos más allá de lo laboral, siempre con buena predisposición.

A **María**, por transmitirme tu energía y tu pasión por la ciencia. Por confiar en nosotros y en este trabajo desde el principio. Por brindarnos toda su experiencia y por enseñarme a trabajar en conducta con animales con mucha alegría.

A **Davio** por todos los asados y las juntadas en tu casa que nos mantienen unidos como grupo y por apoyarme en todos los intentos por continuar con mi carrera profesional.

A **Cari**, por estar siempre que te escribo con cualquier consulta. Por ocuparte de nosotros. Por encargarte de los temas burocráticos y de los subsidios.

A todos los investigadores Fede, Ana, Naty, Davio, Cari y María, que siempre se aseguraron de que contáramos el material y los reactivos necesarios para hacer los experimentos.

A mis compañeros del CEFyBO que hicieron posible todos los ensayos con animales presentes en este trabajo, y siempre me ayudaron de manera incondicional. **Paula**, quien me enseñó a manipular los ratones, a trabajar en el bioterio, a extraer los hipocampos y a hacer el análisis estadístico de los resultados. GRACIAS! A **Juli S, Juli, Maki, Viky, Agus y Raquel y Turi**, quienes me ayudaron siempre que lo necesité, ya sea a trasladar los animales, a inyectarlos o a sacrificarlos. A Manu, gracias por toda la ayuda con las determinaciones de la actividad de la FAAH, por tus conocimientos teóricos y por tu alegría! A todo el grupo por estar siempre dispuestos a ayudar.

A mis compañeras del IByME, **Anto, Angy y Anita** que siempre tienen buena predisposición para cualquier favor que les pidamos y nos reciben con cariño.

A **mis compañeros del ININFA PP**, por hacer que este trabajo y levantarse a la mañana para ir al labo no sea una carga sino una alegría. Llegar y tomar unos mates con **Vale B, Vale T y Agustín**. Discutir con Vale B sobre algún ensayo que no dio, diseñar otro nuevo. Charlar con Dani sobre música o algún viaje. Diseñar con Emi algún disfraz o repasar las figuras de la clase de tela. Mai siempre presente en el chat de las monitas. **Nico** con sus historias alocadas, sus caipiriñas y sus charlas filosóficas. **Natito** con sus consejos sabios y su experiencia siempre me resuelve todo. **Sonia y Ramiro** que recién se sumaron al labo. Los voy a extrañar!!

A mis compañeros del ININFA del 5to. A **Martín, Rodrigo y Sam**, compañeros del cuarto de cultivo con quienes siempre es ameno trabajar y quienes hacen más llevadera la limpieza de la estufa (y me hacen un espacio en la campana cuando estoy apurada). A **Sara**, más que compañera, otra amiga que me brinda el ININFA, te agradezco todo el apoyo de estos años y el camino que se me abre adelante. A **Maxi**, gracias por tus juntadas de Play, por las veces que me largaste RIAs y que me mediste tubos en el contador. Por tu buena onda y tus ganas de unir al grupo. A **Miguel y Beatriz**, que siempre tuvieron buena predisposición cuando tenía que usar el cuarto de revelado. A **Naty Jara**, porque realiza su trabajo con dedicación y nos hace más liviano el día a día. A **Betina**, que nos dijo que Zif268 está implicado en la formación de memorias. A **Fernanda** por las determinaciones de corticosterona que lamentablemente no se pudieron incluir en la tesis. A **María Clara**, por sus conocimientos y su experiencia, y por estar siempre dispuesta a ayudar. Y al resto de los miembros del ININFA, gracias por los saludos cálidos de todos los días y por cualquier ayuda que me hayan brindado a lo largo de este trabajo.

A la **UBA**, por formarme de manera gratuita durante mi carrera de grado y posgrado.

Al **CONICET**, por brindarme una beca y los recursos necesarios para realizar mis estudios de posgrado.

A mi compañero **Dani**. Gracias por cuidarme y por darme un abrazo cuando lo necesitaba. Gracias por transmitirme tu experiencia y tu practicidad a lo largo de estos años.

A mis amigas del labo. Por las salidas, las salas de escape, las compras y las alegrías. Por estar siempre, en las buenas y en las malas. Por leer todos los párrafos que les mandé de la tesis y por ayudarme a mejorarlos. A **Vale B**, por darme tranquilidad y confianza, por enseñarme con tu carácter y personalidad, por tu afecto y caridad. A **Maia**, por tu amistad que traspasó las paredes de este laboratorio. Por estar siempre, y por confiar en mí. Por compartir tus historias de vida y experiencias conmigo, ayudarme a crecer y prestarme u oído cuando lo necesito. A **Emi**, una amistad que comenzó antes que este trabajo y que tiene muchas locuras más por recorrer y muchas muestras más de acrobacia por presentar!! Gracias por aguantar mis cuelgues, las veces que te arruiné ensayos en la cursada y en el labo, por acompañarme siempre, por las juntadas de estudio en tu casa. Por quererme como soy, así, despistada.

A mis amigas **Naty, Taty, Yani y Agos**, que me acompañan desde el colegio y me sacan de este mundo. Por las charlas, las salidas y los buenos momentos.

A mi familia, por todo el afecto de estos años. Por acompañarme día a día, aunque algunos todavía no entiendan bien que es esto de las becas y el doctorado. A **Guille**, por ser tan afectuoso y desinteresado. A **Larita**, por llenarme de alegría. A **Edgardo**, por cuidarme siempre, por la compañía y los sueños compartidos. A **Susana**, por tu afecto, tus consejos, tus charlas y tu apoyo enorme. A mi **hermana Piedad**, gracias por

hacerme crecer como persona, por las cervezas y los sueños, y por querer cuidarme siempre. A mi **tío Julio**, gracias por el entusiasmo y por tener siempre una palabra de aliento. A mi **mamá Piedad**, por tu cariño, por creer siempre en mí. A **Benita** y mi **abuela Gina**, que están en mi corazón y son mis ejemplos de familia y profesión. Los quiero.

A **Ale**, mi compañero de vida. Gracias por acompañarme en este camino, por ser mi apoyo y mi equilibrio. Te amo.

## **Resumen**

Los procesos moleculares que subyacen la formación de memorias a largo plazo involucran la activación de cascadas de señalización que transmiten las señales inducidas por la acción de neurotransmisores en la membrana celular hasta el núcleo, controlando la respuesta genómica en las neuronas. Esto resulta en la alteración de la fuerza de las sinapsis neuronales y en la configuración de una red neuronal asociada a la formación de la memoria. La vía de las MAPKs presenta un rol central integrando las señales producidas por los receptores de membrana y los efectores de esta cascada son factores de transcripción que inducen la expresión de genes de expresión inmediata temprana.

Ante el desafío de ahondar en los mecanismos moleculares que subyacen la consolidación de memorias aversivas, con el objetivo de estudiar la modulación de la actividad del sistema glucocorticoide por parte del receptor CB1 cannabinoide, resulta de utilidad el trabajo con modelos *in vitro* acordes al sistema biológico de estudio. En nuestro caso, el modelo seleccionado fue la línea celular HT22, una línea que expresa de manera endógena los receptores CB1 y GR y deriva de hipocampo murino. En este sistema demostramos que la señalización del receptor CB1 media el efecto inductor de la dexametasona sobre el mRNA de Zif268 a través de un mecanismo que involucra la inhibición de la FAAH (hidrolasa de amidas de ácidos grasos), una enzima encargada de hidrolizar el endocannabinoide anandamida (AEA). A partir de estudios en ratones KO para el receptor CB1 y en concordancia con nuestros resultados *in vitro*, determinamos que la expresión del receptor CB1 es necesaria para el efecto inductor de la dexametasona sobre el mRNA de Zif268 en el hipocampo murino. Al evaluar el comportamiento de estos animales también encontramos que la expresión del receptor CB1 sería necesaria para que la dexametasona aumente la respuesta de evitamiento inhibitorio en experiencias de aversión moderada. Estos resultados sugieren que el sistema endocannabinoide (SEC), señalizando a través del receptor CB1, es necesario para observar los efectos de los glucocorticoides sobre la respuesta de evitamiento inhibitorio. A partir de los mecanismos descritos en la línea celular HT22 postulamos que la dexametasona facilitaría la respuesta de evitamiento inhibitorio actuando a través de una activación indirecta del CB1, que se encontraría mediada por el aumento del contenido de endocannabinoides en la sinapsis neuronal como consecuencia de un efecto inhibitorio de los glucocorticoides sobre la actividad de la FAAH.

Por otro lado, también demostramos en la línea celular HT22 que tanto agonistas (AM356) como antagonistas (AM251) del sistema cannabinoide inducen un aumento en los niveles del mRNA de Zif268 a través de un mecanismo que dependería de la activación de ERK. Hasta el momento, el mecanismo de acción propuesto para el SEC como facilitador de la consolidación de la memoria involucra sus efectos sobre la liberación de neurotransmisores y la modulación de la actividad GABAérgica. En este contexto, el presente trabajo provee evidencia novedosa de que ligandos cannabinoides

sintéticos, actuando a través del receptor CB1, podrían modular la consolidación de la memoria, de manera directa, induciendo la transcripción de Zif268.

Al estudiar el efecto del cotratamiento con AM356 y la dexametasona, encontramos que estos ligandos presentan una interacción positiva tanto a nivel del mRNA de Zif268 como en la respuesta de evitamiento inhibitorio. Si bien ambos ligandos *per se* aumentarían los niveles de mensajero de Zif268 mediante un mecanismo que involucraría la activación de ERK, el punto de interacción entre las vías de señalización disparadas por estos ligandos no se encuentra a nivel de esta kinasa. Por el contrario, el antagonista del CB1 AM251 inhibe el efecto del este glucocorticoide sobre Zif268 a través de un mecanismo que se encontraría mediado por la inhibición de ERK.

Encontrar compuestos que inhiban la consolidación de la memoria resulta de gran interés para el tratamiento farmacológico preventivo de desórdenes de ansiedad, tales como el trastorno de estrés post-traumático (TEPT) y ciertas fobias. Existe evidencia para postular al condicionamiento clásico como un proceso involucrado en la etiología y el mantenimiento de estos desórdenes. Teniendo en cuenta que tanto la activación de ERK como la inducción de Zif268 serían necesarias para la consolidación de memorias aversivas, y que el cotratamiento con AM251 y dexametasona presenta un efecto inhibitorio sobre ERK en la línea celular HT22 y sobre Zif268 tanto *in vitro* como en el hipocampo murino, proponemos que una terapia combinada con altas dosis de dexametasona y un análogo del AM251 podría ser de utilidad para el tratamiento preventivo de trastorno de estrés post-traumático. Este trabajo aporta evidencia molecular novedosa acerca del rol del SEC, y en particular del receptor CB1, como mediador de los efectos de los glucocorticoides sobre la consolidación de memorias aversivas. Los ensayos realizados permitieron alcanzar los objetivos planteados, caracterizando la interacción entre ligandos del receptor CB1 y del GR a nivel conductual sobre la respuesta de evitamiento inhibitorio, y a nivel molecular sobre la actividad de la FAAH, la fosforilación de ERK y la expresión del mensajero de Zif268. Nuestros resultados ponen de manifiesto la complejidad de los sistemas neuronales y la necesidad de estudiar las vías de señalización en su conjunto. Conocer cómo las señales se integran y se transforman en una respuesta conductual determinada resulta fundamental para comprender los mecanismos que subyacen la consolidación de memorias.

## **Abreviaturas:**

### **A**

2-AG: 2-araquidonilglicerol

AA: ácido araquidónico

ABL: amígdala basolateral

AC: adenilil ciclasa

ACTH: hormona adrenocorticotropa

ADN: ácido desoxirribonucleico

AEA: anandamida

AM356: (*R*)-(+)-metanandamida

AMPc: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

ANOVA: Análisis de la Varianza

### **B**

BSA: seroalbúmina bovina

### **C**

CB1: receptor de cannabinoides tipo 1

CB1-siRNA: RNA de interferencia contra el CB1

CB2: receptor de cannabinoides tipo 2

cGR: GR citosólico

CORT: corticosterona

COX-2: ciclooxigenasa 2

CRE: elemento de respuesta al AMPc

CRH: hormona liberadora de corticotropina

### **D**

DAG: diacilglicerol

DAGL- $\alpha$ : DAG lipasa  $\alpha$

DEX: dexametasona

DPM: desintegraciones por minuto

## **E**

EC: endocannabinoide

EC50: concentración efectiva 50

ERK: kinasa regulada por señales extracelulares

## **F**

FAAH: hidrolasa de amidas de ácidos grasos

## **G**

GBS: genome wide GR binding sites

GC: glucocorticoide

GILZ: glucocorticoid-induced leucine zipper

GPCR: receptor acoplado a proteína G

GR: receptor de glucocorticoides

GRE: elemento de respuesta al GR

## **H**

HATs: histonas acetil transferasas

HHA: eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

HPLC-ME: cromatografía líquida de alta eficacia acoplada al método de espectrometría de masa

hs: horas

## **I**

IEG: gen de expresión inmediata temprana

IMBX: metil-isobutilxantina

## **J**

JNK: kinasa c-Jun N-terminal

## **K**

Kd: constante de disociación

## **L**

LTP: potenciación a largo plazo

## **M**

MAGL: monoacilglicerol lipasa

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

Max: máximo

mGR: GR de membrana

Min: mínimo

min: minutos

MR: receptor de mineralocorticoides

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

MWM: laberinto acuático de Morris

## **N**

NAE: N-acetiletanolamina

NAPE: N-acil-fosfatidiletanolamina

NAPE-PLD: fosfolipasa D específica de NAPE

NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

nGREs elementos de respuesta al GR negativos

NLS: señales de localización nuclear

NPV: núcleo paraventricular

## **O**

OEA: oleiletanolamina

## **P**

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEA: palmitoiletanolamina

PI3K: fosfoinositol 3-quinasa

PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc

PKC: proteína quinasa C

## **R**

Rac1: Ras-related C3 *botulinum* toxin sustrato 1

RI: receptor ionotrópico

## **S**

sc-siRNA: RNA de interferencia de secuencia inespecífica

SD: desvío estándar

SEC: sistema endocannabinoide

seg: segundos

SFB: suero fetal bobino

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

SRE: elemento de respuesta al suero

SRF: factor de respuesta al suero

## **T**

TGI: tracto gastrointestinal

THC:  $\Delta$ -9-tetrahidrocannabinol

TRPV1: receptor de potencial transitorio V1

## **V**

VGCC: canales de calcio dependientes de voltaje

## **W**

WB: western blot

## **Tabla de contenido**

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.	FORMACIÓN DE MEMORIAS A LARGO PLAZO .....	2
1.1.1.	Aprendizaje y memoria .....	2
1.1.2.	Memorias a corto y a largo plazo .....	3
1.1.3.	La teoría de la consolidación .....	3
1.1.4.	Creando recuerdos duraderos .....	3
1.1.5.	Modelos experimentales en el estudio de la modulación de la memoria .....	4
1.1.6.	Prueba de evitamiento inhibitorio .....	5
1.2.	MECANISMOS MOLECULARES QUE SUBYACEN LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA	6
1.2.1.	La síntesis de proteínas es necesaria para la formación de memorias a largo plazo	6
1.2.2.	Vías de señalización implicadas en la consolidación de la memoria .....	7
1.2.3.	El rol de Zif268 en la consolidación de la memoria.....	10
1.3.	EL SISTEMA GLUCOCORTICOIDE Y SU ROL EN LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA	11
1.3.1.	Glucocorticoides endógenos y ligandos sintéticos .....	11
1.3.2.	El receptor a glucocorticoides .....	12
1.3.3.	Distribución del GR.....	13
1.3.4.	Señalización genómica del GR.....	13
1.3.5.	Señalización no-genómica del GR .....	15
1.3.6.	Rol del sistema glucocorticoide en la consolidación de la memoria.....	16
1.3.7.	Mecanismos moleculares implicados en los efectos de los GCs sobre la consolidación de la memoria asociativa .....	17
1.4.	EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE.....	19
1.4.1.	Ligandos cannabinoides .....	19
1.4.2.	Metabolismo de los endocannabinoides .....	19
1.4.3.	Los receptores cannabinoides.....	21
1.4.4.	Distribución de los receptores cannabinoides .....	22
1.4.5.	Señalización de los receptores cannabinoides.....	23
1.4.6.	Rol del SEC en la consolidación de la memoria asociativa .....	25
1.4.7.	Participación del sistema endocannabinoide en los efectos rápidos de los glucocorticoides .....	25
1.5.	HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	27
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
2.1.	MODELOS DE ESTUDIO.....	29

2.1.1.	Ratones CD1 .....	29
2.1.2.	Línea celular HT22 .....	29
2.2.	PREPARADO DE DROGAS.....	29
2.3.	GENOTIPIFICACIÓN DE RATONES.....	30
2.4.	EVALUACIÓN CONDUCTUAL DE ANIMALES .....	30
2.4.1.	Prueba de campo abierto.....	31
2.4.2.	Prueba de evitamiento inhibitorio .....	31
2.5.	DETERMINACIÓN DE NIVELES DE mRNA EN TEJIDOS Y CÉLULAS.....	32
2.5.1.	Obtención de extractos de hipocampo murino .....	32
2.5.2.	Obtención de extractos celulares.....	34
2.5.3.	Purificación del ARN .....	34
2.5.4.	Tratamiento con DNAsa .....	35
2.5.5.	Síntesis del ADN copia (ADNc).....	35
2.5.6.	PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	36
2.5.7.	Análisis de los resultados de qPCR.....	37
2.6.	TRANSFECCIONES TRANSIENTES.....	38
2.7.	MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD GENÓMICA DEL GR EN LA LÍNEA CELULAR HT22 MEDIANTE ENSAYO GEN-REPORTERO DE LUCIFERASA .....	38
2.8.	OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LIGANDOS DEL CB1 POR DOSAJE DE AMPc.....	39
2.8.1.	Ensayo de unión de PKA para el dosaje de AMPc.....	39
2.9.	Detección de proteínas por Western Blot.....	40
2.9.1.	Obtención de muestras de hipocampo .....	40
2.9.2.	Obtención de muestras de la línea celular HT22 .....	41
2.9.3.	Electroforesis y transferencia.....	41
2.9.4.	Revelado de las proteínas específicas.....	41
2.10.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA HIDROLASA DE AMIDAS DE ÁCIDOS GRASOS (FAAH) .....	42
2.11.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	43
2.12.	Materiales .....	43
3.	RESULTADOS .....	44
3.1.	RESPUESTA CRUZADA ENTRE EL RECEPTOR CB1 Y EL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES (GR) SOBRE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA ASOCIATIVA.....	45
3.1.1.	Caracterización del comportamiento de los animales CD1 WT en la prueba de evitamiento inhibitorio .....	45
3.1.2.	Caracterización del efecto de la dexametasona sobre la respuesta de evitamiento inhibitorio en ratones CD1 WT .....	46

3.1.3.	Estudio de la interacción entre el agonista del receptor CB1 AM356 y la dexametasona sobre la respuesta de evitamiento inhibitorio en animales CD1 WT .....	47
3.1.4.	Evaluación conductual de los animales CD1 KO para el receptor CB1 con respecto al fenotipo salvaje .....	50
3.1.5.	Estudio del efecto de la dexametasona sobre la respuesta de evitamiento inhibitorio en animales KO para el receptor CB1 .....	53
3.2.	RESPUESTA CRUZADA ENTRE LOS RECEPTORES CB1 Y GR SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN DE ZIF268 EN EL HIPOCAMPO DE RATONES CD1 .....	55
3.2.1.	Efecto del entrenamiento en la prueba de evitamiento inhibitorio sobre los niveles de mRNA de Zif268 en el hipocampo de ratones CD1 .....	56
3.2.2.	Efecto de la dexametasona sobre los niveles de mRNA de Zif268 en el hipocampo de ratones CD1 WT .....	57
3.2.3.	Efecto de la dexametasona sobre los niveles de mRNA de Zif268 en el hipocampo de ratones CD1 KO .....	58
3.2.4.	Expresión basal del GR en ratones CD1 WT y KO para el receptor CB1 .....	59
3.2.5.	Modulación del efecto de la dexametasona sobre los niveles de Zif268 por parte de ligandos del receptor CB1 .....	60
3.3.	RESPUESTA CRUZADA ENTRE LOS RECEPTORES CB1 Y GR SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN DE ZIF268 EN LA LÍNEA CELULAR HT22 .....	62
3.3.1.	Caracterización de los sistemas glucocorticoide y endocannabinoide endógenos de las HT22 .....	62
3.3.2.	Efecto de los glucocorticoides sobre los niveles de mRNA de Zif268 .....	67
3.3.3.	Efecto del agonista del CB1 AM356 y del agonista inverso AM251 sobre los niveles de mRNA de Zif268 .....	67
3.3.4.	Estudio de la interacción entre el agonista del receptor CB1 AM356 y los GCs sobre los niveles de mRNA de Zif268 .....	68
3.3.5.	Estudio de la interacción entre el agonista inverso del receptor CB1 AM251 y dexametasona sobre los niveles de mRNA de Zif268 .....	70
3.3.6.	Estudio de la interacción entre el agonista inverso del receptor CB1 AM251 y corticosterona sobre los niveles de mRNA de Zif268 .....	71
3.4.1.	Rol del SEC como mediador de los efectos de los GC sobre la transcripción de Zif268	72
3.4.2.	Rol de ERK en el mecanismo que subyace la interacción entre el GR y el CB1 sobre la regulación de la transcripción de Zif268 .....	76
3.4.3.	Efecto del AM356 y de la dexametasona sobre la fosforilación de ERK al silenciar el receptor CB1 con RNA de interferencia .....	83
4.	DISCUSIÓN .....	85
4.1.	MECANISMOS MOLECULARES QUE ESTARÍAN IMPLICADOS EN LOS EFECTOS DE LOS CANNABINOIDES SINTÉTICOS SOBRE LA MODULACIÓN DE MEMORIAS AVERSIVAS .....	86
4.2.	ROL DEL SEC, SEÑALIZANDO A TRAVÉS DEL RECEPTOR CB1, EN LA FORMACIÓN DE MEMORIAS EVALUADAS EN LA PRUEBA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO .....	87

4.3.	ROL DEL SEC COMO MEDIADOR DE LOS EFECTOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA FORMACIÓN DE MEMORIAS EN LA PRUEBA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO .....	88
4.3.1.	La dexametasona y el metabolismo de los endocannabinoides.....	89
4.3.2.	El modelo.....	90
4.4.	INTERACCIÓN ENTRE EL CANNABINOIDE AM356 Y LOS GCs SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE ERK, EL mRNA DE ZIF268 Y LA RESPUESTA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO. ....	91
4.5.	INTERACCIÓN ENTRE EL CANNABINOIDE AM251 Y LOS GCs SOBRE LA FORMACIÓN DE MEMORIAS AVERSIVAS, LA FOSFORILACIÓN DE ERK Y EL mRNA DE ZIF268 .....	93
4.6.	RELEVANCIA CLÍNICA.....	96
4.7.	CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	98
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	100

# 1.INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso tiene la capacidad de codificar y guardar los acontecimientos que transcurren a lo largo de la vida de un individuo y de evocarlos (revivirlos) de manera voluntaria o involuntaria. El proceso de formación de un recuerdo permite seleccionar la información que se va a almacenar, de manera tal que no todos los eventos se almacenan con la misma intensidad. Algunas memorias son débiles y desaparecen mientras que otras son favorecidas para guardarse a largo término, como por ejemplo, las experiencias que incluyen un alto contenido emocional. Su almacenaje involucra la activación de circuitos neuronales específicos que permiten recordar con facilidad tanto el hecho acontecido como las sensaciones vividas durante ese momento. En particular, se sabe que tanto el sistema glucocorticoide como el endocannabinoide son reclutados durante la consolidación de este tipo de memorias y que ligandos sintéticos de ambos sistemas son capaces de modular su fuerza.

Los mecanismos moleculares que subyacen la consolidación de la memoria y su modulación no se encuentran completamente dilucidados y son objeto de estudio de la neurobiología molecular. En la actualidad, existen diversas teorías y modelos que intentan explicar este intrincado proceso con el objeto de comprender el funcionamiento de nuestro sistema nervioso y de echar luz sobre algunas patologías cuya etiología se encuentra directamente relacionada con él y que hasta el momento carecen de una terapia farmacológica eficaz.

### **1.1. FORMACIÓN DE MEMORIAS A LARGO PLAZO**

#### **1.1.1. Aprendizaje y memoria**

Los estímulos ambientales continuamente generan cambios en nuestra conducta. Por ejemplo, al experimentar una situación negativa o aversiva en un entorno determinado, la conducta se puede ver modificada para intentar evitar una reexposición a ese entorno. A este proceso se lo define como aprendizaje y el mantenimiento de dicha información en el tiempo es lo que llamamos memoria.

Para la ciencia experimental, el aprendizaje es la adquisición de una respuesta conductual alterada debido a un estímulo ambiental, mientras que la memoria es una representación interna de dicha información adquirida, que se halla codificada espaciotemporalmente en circuitos neuronales mediante cambios en las propiedades reactivas de las neuronas [1].

### **1.1.2. Memorias a corto y a largo plazo**

Casi todas las formas de la memoria pueden ser guardadas a corto y a largo plazo. Con excepción de algunos casos, la duración de la memoria de eventos aprendidos depende del número de veces que un sujeto experimenta un estímulo que modifique su conducta. Es decir, una única repetición (o un único ensayo) puede generar una memoria que dure solamente unos minutos (corto plazo), mientras que repeticiones múltiples del estímulo pueden dar lugar a la formación de una memoria que se mantenga desde horas hasta meses (largo plazo). Como excepción al primer caso, se puede mencionar a la memoria asociativa formada ante situaciones con un alto contenido emocional. Se sabe que, en estas situaciones, la liberación de mediadores tales como los glucocorticoides y la adrenalina, facilitan el almacenaje del recuerdo, permitiendo que una sola repetición del evento de lugar a la formación de una memoria a largo plazo [2].

### **1.1.3. La teoría de la consolidación**

La memoria a largo plazo se caracteriza por presentar un período conocido como consolidación. Esta teoría plantea que la formación y estabilización de la memoria es un proceso tiempo-dependiente, y que con el tiempo se vuelve estable y menos susceptible a la disrupción. Fue propuesta en 1900 por Müller y Pilzecker, quienes, realizando estudios en humanos, observaron que generar una distracción inmediatamente después de la sesión de entrenamiento puede disrumpir la formación de memorias a largo plazo, mientras que este efecto se pierde cuando la distracción se presenta mucho tiempo después del entrenamiento [3]. El tiempo durante el cual la consolidación de la memoria puede ser disrumpida se denomina “ventana de consolidación” y comienza minutos después del evento prolongándose por un período de 5 o 6 horas.

### **1.1.4. Creando recuerdos duraderos**

Como no todas las experiencias o eventos se guardan a largo plazo, deben existir procesos a través de los cuales se selecciona la información que va a ser almacenada. La consolidación de la memoria es un proceso lento, que se puede extender hasta unas 5 o 6 horas y que involucra la inducción de segundos mensajeros, la activación de kinasas y factores de transcripción y cambios en la expresión de mRNA y proteínas [4, 5]. Los procesos fisiológicos activados por una experiencia, como por ejemplo la activación del sistema adrenérgico y glucocorticoide ante una situación de stress, son los que ponen en marcha estos mecanismos lentos que parecen haber otorgado una ventaja evolutiva al modular la fuerza de la memoria [2, 6].

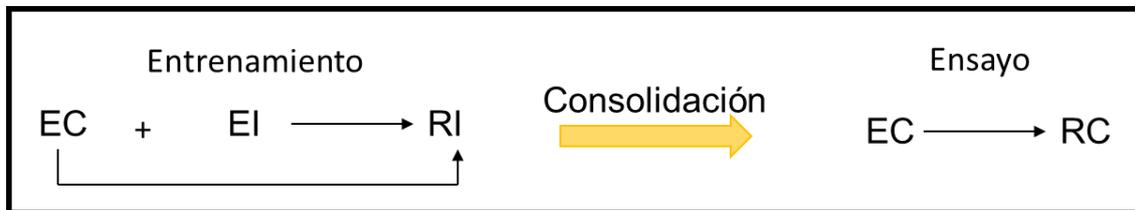
Las emociones están íntimamente vinculadas con la memoria. Numerosas investigaciones señalan que los eventos con contenido emocional, positivos o negativos, se recuerdan en mayor medida que los neutros [7-9] resultando en general innecesaria la repetición del estímulo para la formación de una memoria de largo plazo. Ahora bien, ¿cuáles son los sistemas neurológicos que se ponen en juego durante la experimentación de situaciones con alta carga emocional y que, actuando de manera orquestada, dan lugar a la formación de memorias persistentes y de fácil evocación? Si bien originalmente fueron los estudios en humanos los que dieron lugar a la teoría de la consolidación de la memoria, la mayoría de los descubrimientos que versan sobre las conductas asociadas a la consolidación de la memoria y los mecanismos moleculares que la subyacen surgen a partir del estudio en modelos animales de rata y ratón [10].

### **1.1.5. Modelos experimentales en el estudio de la modulación de la memoria**

El estudio de la modulación de la memoria analiza los sistemas y procesos neurobiológicos que definen la intensidad de nuestros recuerdos. Como la memoria no puede ser directamente observada, debe ser inferida a partir de cambios en la conducta generados por alguna experiencia. Para caracterizar los sistemas que participan en este proceso se realizan pruebas de evaluación conductual en animales. Estas suelen contar con dos etapas, una de entrenamiento en la cual el animal aprende una nueva respuesta debido a cambios en el entorno, y una fase de evaluación en la que se evalúa capacidad del animal de evocar esa respuesta adquirida. Para estudiar el efecto de un fármaco sobre la consolidación de la memoria, este se administra inmediatamente después del entrenamiento para no interferir con la fase de adquisición. Un fármaco que presente un efecto facilitador inducirá una respuesta exacerbada durante la evaluación mientras que un animal tratado con un agente disruptor verá disminuida su respuesta. Se utilizan agonistas, antagonistas o agonistas inversos de los receptores que forman parte de los sistemas de neurotransmisión para caracterizar el rol de cada uno de ellos en este proceso.

Los paradigmas de condicionamiento clásico Pavloviano son ampliamente utilizados para estudiar la modulación de la memoria. En la década de 1890, el filósofo ruso Iván Pavlov desarrolló uno de los experimentos más conocidos del aprendizaje asociativo. Durante sus estudios con perros observó como salivaban (respuesta incondicionada - RI) tras ver comida (estímulo incondicionado - EI). Entonces decidió hacer sonar un estímulo neutro como una campana (estímulo condicionado - EC) cuando presentaba la comida a los animales. El resultado fue que los perros comenzaban a salivar al escuchar

este instrumento (respuesta condicionada - RC) (Fig. 1.1). Este tipo de aprendizaje otorga una gran ventaja evolutiva ya que permite prever recursos y peligros que pueden poner en juego la supervivencia del individuo.



**Figura 1.1:** Esquema del aprendizaje asociativo. En los aprendizajes asociativos clásicos suele asociarse un estímulo neutro (Estímulo condicionado, EC) con un estímulo que genera una respuesta en el animal (Estímulo incondicionado, EI). Luego de varias presentaciones de ambos estímulos (EC-EI) el EC puede pasar a evocar la respuesta antes generada por el EI sin su presencia y se llama ahora a esta respuesta, respuesta condicionada (RC).

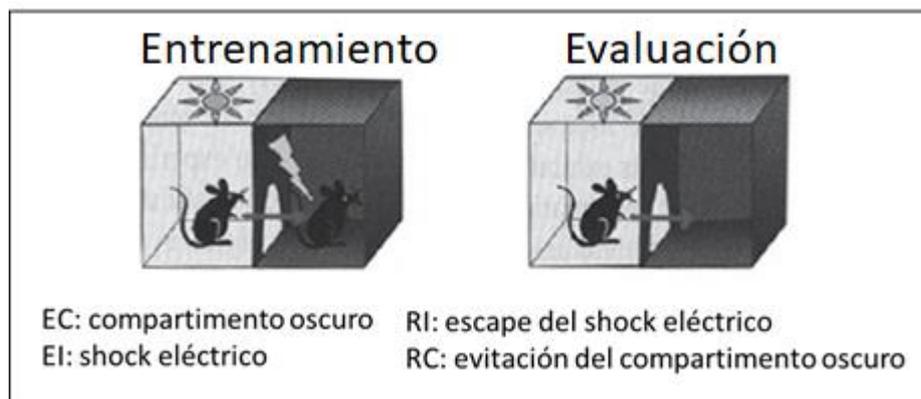
#### 1.1.6. Prueba de evitamiento inhibitorio

Entre las pruebas de evaluación conductual que responden a este paradigma, el de evitamiento inhibitorio es ampliamente utilizado para estudiar el efecto de fármacos sobre la consolidación de memorias asociativas. Su popularidad radica en la formación de memorias robustas y de largo plazo tras la aplicación de un único par EC-EI y en que permite discriminar los efectos de los fármacos sobre las distintas fases de la memoria.

El dispositivo utilizado es una caja separada en dos compartimentos, uno iluminado y otro oscuro, con libre circulación de uno al otro. Durante la fase de entrenamiento, el animal aprende a asociar un contexto particular (compartimento oscuro del aparato) con la ocurrencia de un evento aversivo (aplicación de un shock eléctrico). Al ser colocado en el compartimento iluminado, la conducta innata del ratón es ir hacia el oscuro. Cuando esto ocurre, se cierra dicho compartimento y se le aplica un shock eléctrico. Si logra adquirir, consolidar y evocar esta asociación, el día del testeo inhibirá su comportamiento innato y evitará ir a ese sector (Fig. 1.2). La respuesta medida (tiempo de latencia) es el tiempo que tarda el animal en ingresar al compartimento oscuro.

Para evaluar el efecto de los fármacos sobre la respuesta de evitamiento inhibitorio, estos se administran inmediatamente después de sacar al animal del aparato luego del entrenamiento. Un fármaco que aumenta la respuesta de evitamiento inhibitorio, es decir, que durante la evaluación incrementa la latencia de los animales para ingresar al compartimento oscuro, presentaría un efecto facilitador sobre la consolidación de la memoria asociativa. Por el contrario, se considera que un fármaco es disruptor de la consolidación de la memoria si disminuye la latencia de los animales en la sesión de evaluación. Es necesario discriminar los efectos de los fármacos sobre las etapas de

consolidación y evocación debido a que éstos, dependiendo de su farmacocinética, pueden encontrarse todavía en circulación durante la sesión de evaluación. Para ello, se compara el efecto de la administración de los ligandos 8 hs post-entrenamiento sobre la respuesta de evitamiento inhibitorio con de la administración post-entrenamiento. De esta manera, se han encontrado que diversos sistemas son capaces de modular la formación de memorias. Por ejemplo, la administración de corticosterona, el principal glucocorticoide en la rata, en el cuerpo estriado y en el hipocampo inmediatamente después de la sesión de entrenamiento, aumenta la respuesta de evitamiento inhibitorio de manera dosis-dependiente [11].



**Figura 1.2.** Representación esquemática de la prueba de evitamiento inhibitorio.

La infusión intra-cerebral de agentes amnésicos en determinadas áreas del cerebro durante la “ventana de consolidación”, ha permitido identificar algunas regiones involucradas en la consolidación de la memoria. En la prueba de evitamiento inhibitorio se ha descrito que la región CA1 del hipocampo, la amígdala basolateral (ABL) y la corteza prefrontal medial resultan esenciales para este proceso [12-14]. Si bien las conexiones anatómicas entre estas regiones han sido estudiadas, aún se desconoce el orden de señalización, resultando demasiado especulativa la esquematización de un circuito neuronal [15].

## **1.2. MECANISMOS MOLECULARES QUE SUBYACEN LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA**

### **1.2.1. La síntesis de proteínas es necesaria para la formación de memorias a largo plazo**

Mientras que la memoria a corto plazo está mediada por modificaciones covalentes de proteínas pre-existentes, la consolidación de memorias a largo plazo involucra la síntesis de mRNA y proteínas nuevas que transforman cambios sinápticos temporarios

en modificaciones permanentes [16]. Inhibidores de la síntesis de RNA y de proteínas administrados durante la “ventana de consolidación” bloquean la formación de memorias a largo plazo [5, 17], mientras que su administración una vez que se ha establecido la memoria carece de efecto [18].

Así como el uso de inhibidores de la síntesis de RNA y de proteínas bloquea la consolidación de la memoria, se ha descrito que la delección genética de genes específicos también produce el mismo efecto. Ratones que presentan una delección de los genes que codifican para la quinasa regulada por el complejo  $Ca^{2+}$ /Calmodulina IV o CaMKIV [19], o para los factores de transcripción CREB [20], Zif268 [21] o c-rel [22] presentan déficits en la expresión de memorias a largo plazo.

De manera complementaria, existen numerosos trabajos que demuestran que durante la formación de memorias a largo plazo dependientes del hipocampo incrementan los niveles de mRNA de ciertos genes de expresión inmediata temprana o IEGs (sigla que deriva de su nombre en inglés immediate early genes) *Zif268* [23], *Arc* [24], *fos* y *jun* [25]. *Arc* es una proteína efectora asociada al citoesqueleto y luego de la transcripción su mRNA es rápidamente transportado a las dendritas. La proteína c-fos se utiliza como marcador de actividad neuronal [26] y junto con c-jun forma parte del factor de transcripción heterodimérico AP-1. Como hemos mencionado, Zif268 también es un factor de transcripción y, al igual que los otros IEGs, su expresión puede ser rápidamente inducida. Como se detallará más adelante, hasta el momento no se han identificado los genes blancos de estos factores de transcripción involucrados en la formación de memorias a largo plazo.

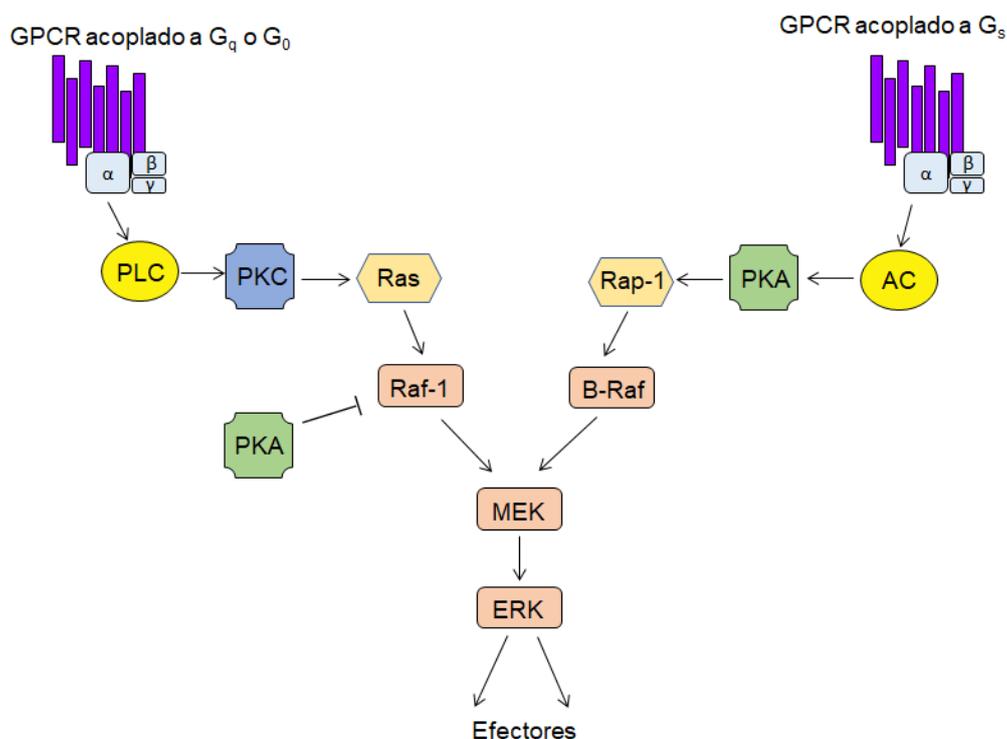
### **1.2.2. Vías de señalización implicadas en la consolidación de la memoria**

El mecanismo molecular que regula la expresión de estos genes es un proceso complejo que consta de múltiples etapas. La memoria de largo plazo se caracteriza por presentar un incremento prolongado en los niveles de segundos mensajeros tras la despolarización de la membrana neuronal y la liberación de neurotransmisores que induce la activación de kinasas. Estas a su vez modulan la actividad de factores de transcripción que regulan la transcripción de IEGs.

El incremento sostenido en los niveles de segundos mensajeros es un paso característico de la formación de memorias a largo plazo. Entre ellos, el AMPc cumple un rol primordial sobre los cambios en la expresión génica, y la vía AMPc/PKA/CREB activada por los receptores NMDA ha sido ampliamente caracterizada en la

consolidación de la memoria [27-29]. El influjo del  $\text{Ca}^{2+}$  tras la activación de los receptores de NMDA incrementa la producción de AMPc mediante la acción de la calmodulina sobre la adenilil ciclasa [30]. El AMPc activa a la PKA y esta a su vez activa al factor de transcripción CREB [31]. La señalización de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) tras la unión a otros neurotransmisores como la dopamina, también puede inducir un aumento sostenido en los niveles de AMPc.

Por otro lado, la vía de las MAP kinasas o vía MAPK (de su nombre en inglés Mitogen-Activated Protein Kinases) también presenta un rol primordial en la formación de memorias a largo plazo al integrar las señales inducidas por la activación de múltiples receptores neuronales. La señalización de receptores metabotrópicos de glutamato [32], receptores de endocannabinoides de tipo 1 [33], receptores muscarínicos de acetilcolina, receptores de dopamina [34], y receptores de serotonina [35] inducen la activación de ERK (kinasa regulada por señales extracelulares) en neuronas y particularmente en el hipocampo. La respuesta cruzada entre estos receptores estaría mediada por la activación de kinasas moduladas por segundos mensajeros como la PKA y la PKC, las cuales a su vez fosforilarían intermediarios de la vía MAPK, tales como Ras, Raf-1, Rap1, y B-Raf [36]. De esta manera, la vía de la MAPK se postula como un integrador en donde convergen las señales desencadenadas por los receptores de neurotransmisores en las neuronas (Fig. 1.3).

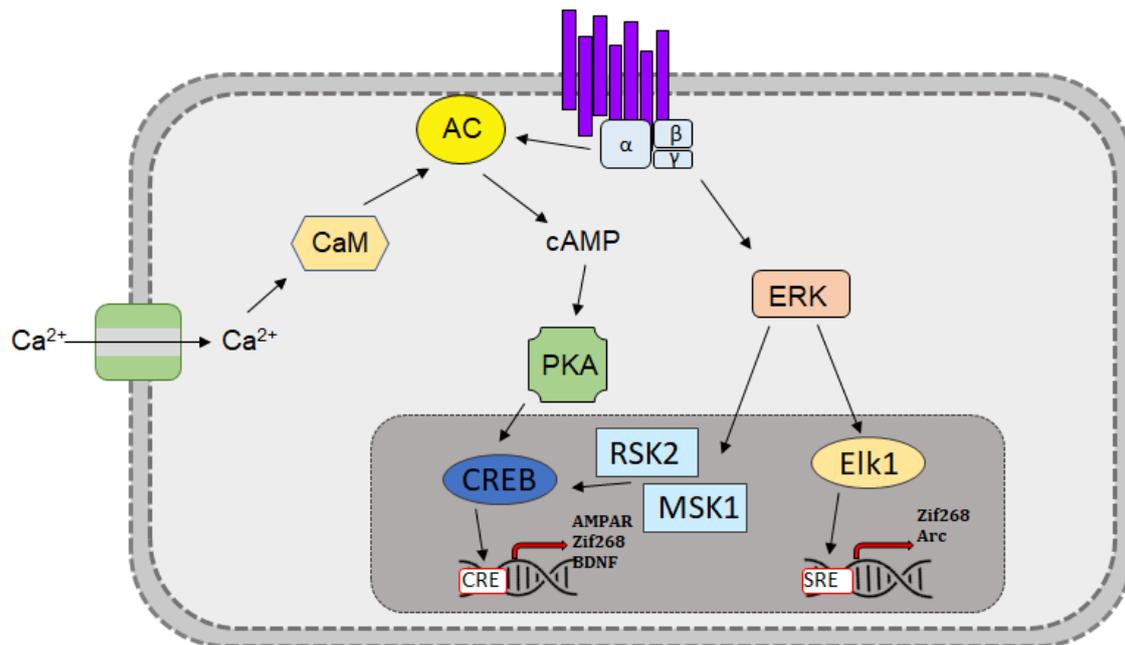


**Figura 1.3:** Vías de transducción de señales que regularían la activación de las MAPKs en las neuronas. Esta cascada de señalización resulta crítica para la formación de memorias dependientes del hipocampo y se postula que este sistema integrador no solo suma las señales

que recibe, sino que también podría originar respuestas sinérgicas. Esquema adaptado de *Mechanisms of Memory* de J. David Sweatt, Segunda Edición [10].

Una vez fosforilado, el producto de la activación de MEK, ERK doblemente fosforilada (ppERK), transloca al núcleo. La presencia de ppERK en el núcleo está acoplada a la fosforilación del factor de transcripción CREB en la serina 133 mediada por la activación de las kinasas RSK2 y MSK1. Esta fosforilación recluta a la proteína de unión a CREB, CBP, al complejo de iniciación promoviendo el inicio de la transcripción [37]. La habilidad de CREB de participar en la consolidación de la memoria es consistente con su rol aparente en la regulación de genes involucrados en la neurotransmisión y en la memoria. Genes tales como los que codifican para el receptor  $\beta$ 1-adrenergico, la tirosina hidroxilasa, la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, Zif268 y el receptor de glucocorticoides presentan elementos de respuesta al AMPc (CRE) en sus regiones promotoras [38].

La activación y translocación al núcleo de ERK también puede dar lugar a la activación de otros factores de transcripción aparte de CREB, tales como Elk1. Durante la consolidación, Elk1 es fosforilado en múltiples sitios por ERK y coopera con el factor de respuesta al suero (SRF por su nombre en inglés) para inducir la transcripción de genes controlados por el elemento de respuesta al suero, SRE. Se sabe que, durante la consolidación de la memoria, la expresión del factor de transcripción Zif268 es inducida a través de la vía de señalización ERK/Elk1/SRE [39]. Las vías de señalización descritas se encuentran esquematizadas en la Fig 1.4. A continuación, describiremos el rol de esta proteína que resulta clave para la formación de memorias de largo plazo dependientes del hipocampo y cuya transcripción se encuentra regulada por el receptor de glucocorticoides.



**Figura 1.4:** La formación de memorias a largo plazo involucra una secuencia de mecanismos celulares que incluyen: activación de GPCRs y receptores ionotrópicos (RI) por neurotransmisores; incremento de los niveles intracelulares de segundos mensajeros como el AMPc y el  $\text{Ca}^{2+}$ ; la activación de kinasas como PKA, ERK, MSK1 y RSK2; la activación de factores de transcripción como CREB y Elk1 y la transcripción de genes de expresión temprana como Zif268, entre otros.

### 1.2.3. El rol de Zif268 en la consolidación de la memoria

Un paso crucial en la respuesta genómica de las neuronas es la expresión de genes de expresión inmediata temprana o IEGs (de su nombre en inglés immediate early genes) que codifican factores de transcripción que regulan la expresión de numerosos efectores. Entre ellos se encuentra Zif268 (también conocido como Egr1, Krox-24, NGF1-A, TIS8 y Zenk), un factor que pertenece a la familia de proteínas de respuesta temprana al crecimiento. En su dominio de unión al ADN presenta tres secuencias de dedos de Zinc que le permiten regular la transcripción de otros genes. Tiene una elevada expresión basal en cerebro, principalmente en áreas de la neocorteza, hipocampo, amígdala, estriado y tálamo [40].

El concepto de que Zif268 pueda tener un rol importante en la plasticidad sináptica se remonta a 1990, cuando se descubrió que tras la inducción de la potenciación a largo plazo o LTP (por su nombre en inglés long term potentiation) se induce una rápida y robusta transcripción de Zif268 en el giro dentado del hipocampo, observándose un aumento significativo en sus niveles de mRNA a partir de los 15 minutos de estimulación

[23, 41]. El LTP se define como un aumento duradero en la comunicación sináptica entre dos neuronas como consecuencia de una estimulación eléctrica de alta frecuencia, y se postula como uno de los mecanismos celulares que subyacen la formación de la memoria.

La expresión de Zif268 no solo es necesaria para el fenómeno de LTP, sino también para la consolidación de distintos tipos de memoria. Se ha demostrado que Zif268 presenta un rol crítico en la consolidación de la memoria evaluada en las pruebas de reconocimiento novedoso de objetos [42], el laberinto acuático de Morris [43], el condicionamiento de miedo [44], y evitamiento inhibitorio [4] a través de la evaluación conductual de ratones knock out de Zif268 o de la infusión intracraneal de secuencias antisentido contra su mRNA.

Hasta el momento, se han identificado algunos genes blanco de Zif268 en asociación con los procesos de plasticidad neuronal o de consolidación de la memoria, tales como los genes que codifican para sinapsina I [45] y para la glutamato dehidrogenasa [46].

### **1.3. EL SISTEMA GLUCOCORTICOIDE Y SU ROL EN LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA**

#### **1.3.1. Glucocorticoides endógenos y ligandos sintéticos**

La síntesis y secreción de los glucocorticoides (GCs) se encuentra regulada por la hormona ACTH, la cual a su vez es regulada por la CRH en lo que se conoce como el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA). Este eje, que involucra al hipotálamo, a la glándula hipófisis y a la corteza adrenal junto con el sistema simpático, conecta el cerebro con la periferia. En el hipotálamo, las neuronas hipofisiotrópicas reciben innervación central y en respuesta liberan CRH a la circulación portal-hipofisaria, la cual al unirse a sus receptores en las células corticotrópicas de la hipófisis anterior, estimula la síntesis y liberación de ACTH por parte de las mismas. El eje se completa con la secreción de glucocorticoides en respuesta a la liberación de ACTH [47].

Los principales glucocorticoides endógenos son el cortisol (hidrocortisona) y la corticosterona. La mayoría de los mamíferos producen ambos esteroides, sin embargo, las proporciones en que se producen varían entre especies. El cortisol es el glucocorticoide predominante en humanos mientras que en roedores se produce principalmente la corticosterona. El cortisol muestra actividad tanto glucocorticoide como mineralocorticoide cuando se administra en altas dosis. Esto se debe a que el

receptor de mineralocorticoides (MR) presenta mayor afinidad por el cortisol y la corticosterona ( $K_d$  entre 0,5 y 2 nM) que el receptor de glucocorticoides (GR) ( $K_d$  entre 10 y 20 nM) [48]. Pequeñas modificaciones en la estructura de estos esteroides modifican la relación entre la actividad glucocorticoide y mineralocorticoide de los compuestos. Esta propiedad se ha utilizado para el diseño de análogos sintéticos que presenten baja afinidad por el MR en pos de disminuir los efectos mineralocorticoides indeseados en las terapias farmacológicas. Tal es el caso del glucocorticoide sintético dexametasona, ampliamente utilizado en la clínica para el tratamiento de desórdenes de origen inflamatorio [49].

### 1.3.2. El receptor a glucocorticoides

El GR pertenece a la superfamilia de receptores nucleares, más específicamente a la familia de receptores de esteroides. Hasta el momento se han descrito dos isoformas principales por splicing alternativo: GR $\alpha$ , de 97kDa y el GR $\beta$ , de 94kDa, siendo GR $\alpha$  la isoforma responsable de la mayoría de los efectos genómicos de los GC [50]. Adicionalmente, para el GR $\alpha$  se han descrito ocho isoformas correspondientes a ocho diferentes sitios de iniciación de la traducción [51].

El GR $\alpha$  estructuralmente posee tres dominios principales: un dominio N-terminal de activación independiente del ligando, un dominio central de unión al ADN y un dominio C-terminal de unión al ligando. Entre estos dos últimos dominios, el GR presenta dos señales de localización nuclear (NLS).

El dominio N-terminal contiene la región de activación de la transcripción (AF-1) necesaria para una máxima actividad transcripcional del receptor. Esta región actúa uniendo cofactores así como también posee aminoácidos susceptibles de ser fosforilados, que intervienen en la modulación postraduccional del receptor.

El dominio de unión al ADN contiene dos grupos de cuatro cisteínas cada una de las cuales coordina un átomo de Zn<sup>2+</sup>. A través de este dominio, el GR se une a secuencias específicas del ADN denominadas elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE). La secuencia consenso GRE consiste en una secuencia palindrómica conformada por dos regiones de 6 nucleótidos conservados, separados por 3 bases no conservadas: TGTTCTnnnAGAACA.

El dominio de unión al ligando contiene tres regiones principales: el bolsillo de unión al ligando, la región AF-2 y la región de dimerización.

### 1.3.3. Distribución del GR

El GR presenta una expresión ubicua, ejerciendo numerosas funciones en todo el organismo. En el cerebro de rata, las regiones con mayor densidad del GR son la corteza cerebral, la corteza olfatoria, la amígdala, el tálamo dorsal, el hipotálamo, el cuerpo trapezoide y el hipocampo, entre otras [52]. En tejidos postmortem de hipocampos humanos también se hallaron niveles abundantes de GR, principalmente en las regiones CA y en el giro dentado [53].

### 1.3.4. Señalización genómica del GR

La unión de los GC al GR dispara tanto efectos genómicos como no-genómicos. Entre los primeros, el receptor actúa como factor de transcripción *per se*, o como regulador de diversos factores de transcripción modificando los niveles de mRNA de determinados genes.

En ausencia de su ligando, el GR presenta una localización citoplasmática, formando un complejo con hsp90, hsp70, p23 y con las inmunofilinas de alto peso molecular FKBP51 y FKBP52, entre otras proteínas [54]. Este complejo bloquea la secuencia de localización nuclear del GR, inhibiendo de esta manera su translocación al núcleo. Tras la unión de los GC al GR, este sufre una serie de cambios conformacionales y modificaciones postraduccionales que determinarán su actividad. Por ejemplo, la fosforilación del GR en la serina 211 por la p38 MAPK es necesaria para una máxima respuesta de transactivación, mientras que la fosforilación de serinas ubicadas en las posiciones 203 y 404 han sido asociadas con una inhibición de la señalización del GR [55]. Las modificaciones postraduccionales inducen un cambio alostérico en el GR, permitiendo la exposición del NLS y su consecuente translocación al núcleo. La disociación del GR con el complejo de chaperonas no sería necesaria para su transporte [56].

El GR puede ejercer sus efectos genómicos ya sea por unión directa al ADN a través de secuencias GRE, por interacción con otros factores de transcripción, o bien por combinación de ambos procesos. Como resultado, la transcripción de genes puede verse aumentada (fenómeno conocido como transactivación) o bien disminuida (fenómeno conocido como transrepresión). Estos mecanismos se encuentran esquematizados en la figura 1.5.

En la actualidad, el modelo más aceptado de transactivación involucra la dimerización del GR tras su unión al sitio GRE. Esta interacción induciría un cambio conformacional en el GR que reclutaría a diversos cofactores, tales como las histonas acetil transferasas (HATs) y C/EBP, encargadas de facilitar la expresión génica modificando el estado de relajación de la cromatina [57]. La secuencia del gen regulado determina el tipo de dímero formado y los cofactores que serán reclutados [58]. Sin embargo, también se ha descrito que el GR en su estado monomérico es capaz de unirse directamente al ADN y modular la transcripción génica [59].

La unión del GR al ADN no solo participa de la transactivación, sino que es capaz de suprimir la expresión génica al interactuar con elementos de respuesta al GR negativos (nGREs). La unión del GR a estos elementos induce la formación de complejos represores a través de la asociación con co-represores y HDACs [60]. De esta manera, la unión directa del GR al ADN también puede mediar un fenómeno de transrepresión.

Otro mecanismo genómico relevante involucra la interacción proteína-proteína entre el GR en su estado monomérico y otros factores de transcripción. El GR es capaz de interactuar con otros factores de transcripción antes de que estos se unan a sus elementos de respuesta en el ADN. Este es el caso del factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), con quien la interacción se puede dar tanto en el citoplasma, inhibiendo su translocación al núcleo, como en el núcleo, inhibiendo su unión al ADN [61]. El GR también puede actuar sobre factores de transcripción que ya se encuentren unidos al ADN, tales como NF- $\kappa$ B, AP-1, STATs, Oct y NF-1 entre otros [62].

La habilidad del GR para asociarse a diferentes cofactores es específica del tipo celular y del contexto del promotor, lo cual probablemente explique la variabilidad de la respuesta a los GC entre tipos celulares y estados metabólicos [63]. La complejidad de estos mecanismos en el SNC parece ser todavía mayor. Estudios realizados en la línea celular PC12 permitieron identificar los sitios de unión del GR al ADN (GBS por su nombre en inglés genome-wide GR-binding sites) en un contexto neuronal. La mayoría de los GBS identificados resultaron novedosos y específicos para esta línea celular, presentando solo el 7% y el 11% de superposición con las líneas celulares A549 y 3T3-L1 respectivamente. Alrededor de la mitad de los GBS hallados carecen de GRE, encontrándose la unión probablemente mediada por la interacción con otros factores de transcripción unidos a sus elementos de respuesta. Mientras que los GBS que contienen GRE se asociaron a genes que regulan las funciones celulares generales, los GBS sin GRE se ubicaron principalmente cerca de genes involucrados en la función neuronal,

tales como la excitabilidad neuronal, la formación de proyecciones axónicas y la liberación de neurotransmisores [64].

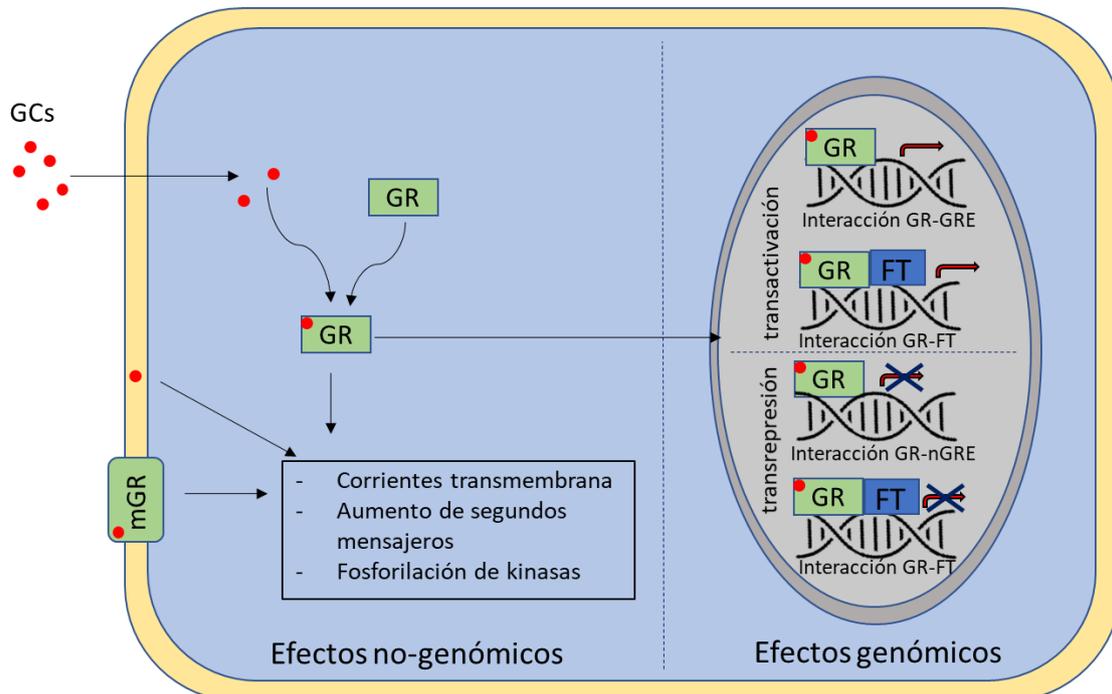
### 1.3.5. Señalización no-genómica del GR

El amplio espectro de acción de los glucocorticoides no puede ser explicado en su totalidad por sus efectos genómicos, postulándose de esta manera que también actúan a través otros mecanismos. Por ejemplo, se ha reportado que la dexametasona es capaz de inhibir la síntesis de ácido araquidónico (AA) mediada por cPLA2 (PLA2 citosólica). Este es un efecto rápido, dependiente del GR (sensible al tratamiento con RU486) e independiente de la transcripción (insensible al tratamiento con actinomicina) [65]. Losel y Wehling definieron los efectos no-genómicos como cualquier acción que induzca efectos rápidos como la activación de vías de transducción de señales sin afectar inicial o directamente la expresión génica [66]. Estas respuestas no se ven alteradas por inhibidores de la transcripción o de la síntesis proteica, y pueden involucrar la unión del ligando a un receptor de membrana. En el caso de los GCs, estos efectos no-genómicos se encontrarían mediados por tres mecanismos:

- Interacciones inespecíficas con la membrana celular. Se postula que los GCs, al disolverse en la membrana plasmática, modifican sus propiedades fisicoquímicas modulando la actividad de proteínas de membrana, resultando en la inhibición de la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula [67].
- Interacciones específicas con el receptor de glucocorticoides citosólico (cGR) [68].
- Interacciones específicas con un receptor de glucocorticoides de membrana (mGR). Este receptor cruza con el anticuerpo diseñado contra  $\text{GR}\alpha$  [69], y sería una forma palmitoilada del receptor citosólico. Esta modificación postraduccional promovería su translocación a membrana [70].

Se ha descrito que la unión de los GCs a sus receptores puede modular numerosas vías de señalización, dependiendo del modelo celular en estudio. En células neuroendócrinas del NPV (núcleo paraventricular), la dexametasona aumenta la concentración de endocannabinoides en la sinapsis neuronal mediante la activación de la vía  $\text{G}\alpha\text{s}$ -AMPc-PKA [71]. También se ha reportado la activación rápida de la vía de las MAPKs tanto en células inmortalizadas como en neuronas hipocampales [72, 73]. En el hipocampo murino y en la línea celular AtT20, el tratamiento con corticosterona aumenta los niveles de fosforilación de ERK1/2 [74] y se postula que la activación de esta kinasa estaría involucrada en los efectos del estrés sobre la consolidación de

memorias con un alto contenido emocional. En la figura 1.5 se resumen los mecanismos genómicos y no-genómicos descritos para el GR.



**Figura 1.5:** Vías de señalización del GR genómicas y no genómicas. Los GC pueden generar respuestas rápidas no-genómicas a través de la interacción directa con la membrana plasmática, por la unión al GR citosólico o por la unión al GR localizado en membrana. Estos efectos involucran cambios en las corrientes transmembrana, el aumento de la producción de segundos mensajeros como el AMPc y el  $\text{Ca}^{2+}$  y la activación de kinasas como ERK, PKA, PKC, JNK y Akt. Los efectos genómicos de los GC están mediados por su unión al GR citosólico y su posterior translocación al núcleo.

### 1.3.6. Rol del sistema glucocorticoide en la consolidación de la memoria

Durante las situaciones de gran contenido emocional se liberan hormonas adrenales, tales como la adrenalina, la noradrenalina y los glucocorticoides, lo cual genera una activación del estado de alerta. La acción de estas hormonas es una de las claves para comprender la relación entre la memoria y las emociones, ya que las últimas modulan selectivamente la memoria de eventos que son emocionalmente significativos [6, 14, 75].

El sistema glucocorticoide media los efectos moduladores del *stress* sobre la consolidación y la recuperación de la memoria [76]. Ante un evento traumático, la activación del eje HHA resulta en la liberación de glucocorticoides de la corteza adrenal. Sus efectos sobre la memoria varían en función del tipo de memoria y de la fase evaluada, y suelen presentar una dosis-dependencia con forma de U invertida [8, 77].

Si bien se ha descrito que niveles elevados de glucocorticoides tienen efectos deletéreos sobre la recuperación de información previamente adquirida [76, 78, 79], numerosos trabajos demuestran que presentan un efecto facilitador dosis y tiempo-dependiente sobre la consolidación de memorias asociativas cuando es administrado inmediatamente después de la sesión de entrenamiento [80, 81]. En la prueba de evitamiento inhibitorio, el tratamiento sistémico con dosis de dexametasona de 0,3 y 2 mg/kg post-entrenamiento facilita la consolidación, mientras que una dosis mayor (3 mg/kg) carece de efecto [6].

Los corticoides son altamente lipofílicos y al ser liberados atraviesan la barrera hematoencefálica y se unen a sus receptores citoplasmáticos, el MR, de alta afinidad, y el GR, de baja afinidad. Sus efectos sobre la memoria parecen estar relacionados con la activación selectiva del GR, ya que el bloqueo farmacológico del GR, pero no del MR, afecta la consolidación de la memoria [82, 83].

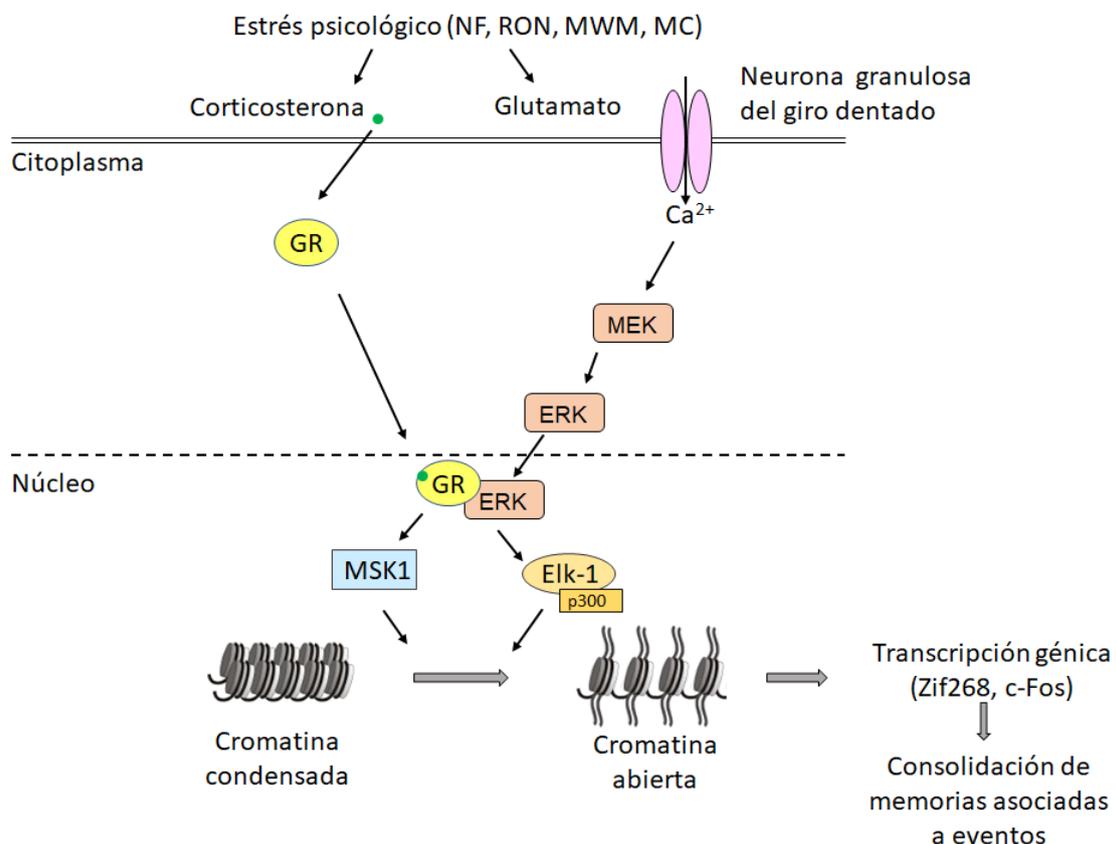
Los mecanismos moleculares que median el efecto facilitador de los glucocorticoides sobre la consolidación de la memoria no se encuentran completamente dilucidados. Se postula que este sistema, actuando a través de mecanismos genómicos y no genómicos, podría modular la señalización de diversos receptores de membrana que participan de la formación de la memoria, tales como el receptor  $\beta$ 2-adrenérgico [8], el receptor de cannabinoides tipo 1, CB1 [84] y el NMDA [85].

### **1.3.7. Mecanismos moleculares implicados en los efectos de los GCs sobre la consolidación de la memoria asociativa**

Ensayos realizados en ratones y en líneas celulares mostraron que la corticosterona, actuando a través del GR, activa la vía de las MAPKs y aumenta la expresión de Zif268. Tras la administración de GC en la línea celular AtT20 se observó un incremento en los niveles de expresión de Ras, Raf-1, pERK1/2 y Zif268. Los mismos resultados se obtuvieron al inducir de forma transitoria la expresión de una forma constitutivamente activa del GR en células CHO. En neuronas de hipocampo murino, la delección genética del GR disminuye la expresión basal de Ras, Raf-1, ERK1/2 y Zif268 y también inhibe el incremento de estas proteínas inducido por estrés. En paralelo, la inhibición farmacológica de la vía de las MAPKs en el hipocampo bloquea el efecto facilitador de los GCs sobre la consolidación evaluada en la prueba de condicionamiento de miedo. Estos resultados proveen un mecanismo molecular para los efectos de los GCs sobre la consolidación de memorias condicionadas con alto contenido emocional, en dónde la

vía de las MAPKs y el gen regulado río abajo, Zif268, serían sus sustratos moleculares [74].

A partir de ensayos de co-inmunoprecipitación, se ha encontrado recientemente que el GR interfiere positivamente con la vía de señalización NMDA-R/ERK1/2/MSK1/2-ELK1, induciendo la fosforilación de los factores de transcripción MSK1/2 y Elk1 a través de una interacción proteína-proteína con pERK1/2. La respuesta cruzada entre ambos sistemas resultaría necesaria para inducir la marca epigenética requerida para la transcripción de Zif268. Esta secuencia de eventos se dispara durante la consolidación de memorias evaluadas en diversos ensayos conductuales tales como el laberinto acuático de Morris o MWM (por sus nombre en inglés Morris Water Maze), condicionamiento de miedo y reconocimiento novedoso de objetos [86] y se encuentra esquematizada en la figura 1.6.



**Figura 1.6:** Vías de señalización activadas en neuronas del giro dentado que inducen la transcripción de genes involucrados en la consolidación de memorias asociativas con alto componente emocional. Los eventos estresantes evocan la activación concomitante del GR y de la vía NMDAR-ERK-MAPK. La activación simultánea del ERK1/2 y del GR y su subsecuente interacción facilita la habilidad de pERK1/2 de fosforilar MSK1/2 y Elk1. La activación de las

quinasas nucleares origina una remodelación de la cromatina permitiendo la transcripción de IEGs como c-fos y Zif268 (también conocido como Egr1). NF: prueba de nado forzado. RON: prueba de reconocimiento de objetos novedosos, MWM: laberinto acuático de Morris. MC: prueba de condicionamiento de miedo. (*Esquema adaptado de Reul 2014*)

## 1.4. EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

### 1.4.1. Ligandos cannabinoides

El sistema endocannabinoide (SEC) es un sistema de señalización que participa en una gran variedad de eventos fisiológicos. Sus principales componentes son los endocannabinoides (EC), las enzimas de síntesis y degradación de los mismos, y sus receptores específicos [87].

Los cannabinoides son compuestos lipídicos pertenecientes al grupo de los terpenofenoles. En 1964 se aisló e identificó al  $\Delta$ -9-tetrahidrocannabinol (THC), principal compuesto psicoactivo de la planta *Cannabis sativa* [88]. Debido a la naturaleza lipofílica de estos compuestos, en un principio se pensaba que ejercían sus efectos inespecíficamente, interactuando con la membrana celular.

El SNC también es capaz de sintetizar cannabinoides a demanda, y a éstos se los denomina endocannabinoides (EC) debido que pueden ser fabricados de manera endógena. La identificación de los receptores cannabinoides permitió descubrir en 1992 la existencia de uno de sus agonistas endógenos, la N-araquidoniletanolamina, también conocida como anandamida (AEA) [89]. El hecho de que la AEA no es capaz de reproducir completamente los efectos inducidos por el THC llevó al descubrimiento de otro endocannabinoide, el ácido 2-araquidonilglicerol (2-AG) [90]. La mayoría de los estudios del SEC se centran en estos ligandos, a pesar de la existencia de derivados del ácido araquidónico que presentan efectos similares [91]. Los EC son mediadores lipídicos que incluyen amidas, ésteres y éteres de ácidos grasos de cadena larga poli-insaturada [92].

Los efectos fisiológicos de estos compuestos son muy diversos. Entre ellos podemos mencionar la hipotermia, la vasodilatación y la anti-inflamación a nivel de SNC [93]. También estarían implicados en procesos patológicos como la obesidad, el cáncer, la esquizofrenia y la esclerosis múltiple [94].

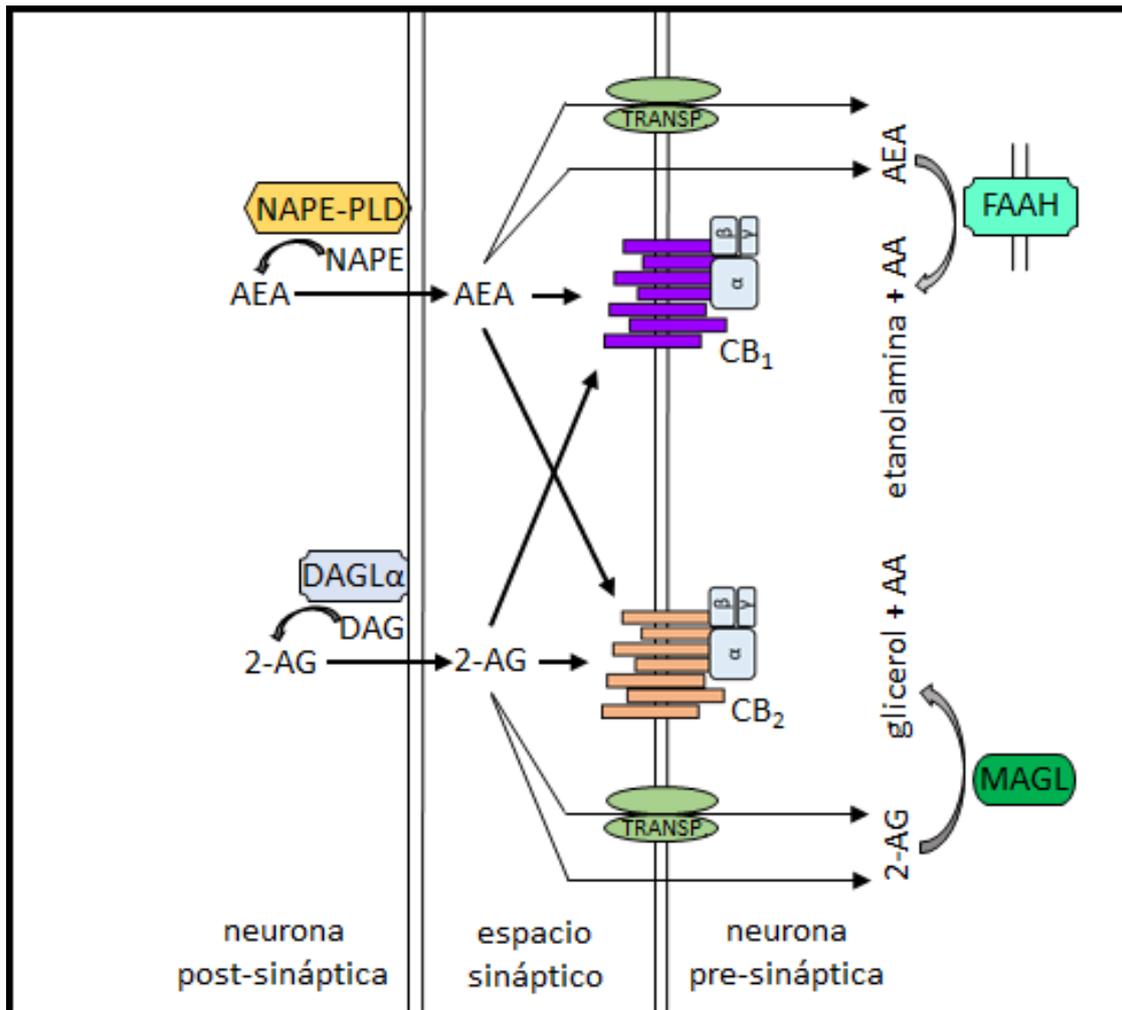
### 1.4.2. Metabolismo de los endocannabinoides

Si bien la AEA y el 2-AG son producidos a demanda en respuesta al incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  [95], no comparten las vías metabólicas de síntesis y degradación.

La AEA se sintetiza a partir de la N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE) mediante una reacción catalizada por la fosfolipasa D específica de NAPE (NAPE-PLD) o a través de rutas que no involucran a esta enzima [94]. Por otro lado, el 2-AG es producido a partir del diacilglicerol (DAG) por acción de la DAG lipasa  $\alpha$  (DAGL- $\alpha$ ) [96].

Una vez liberados al espacio sináptico, la AEA y el 2-AG se unen a los receptores cannabinoides presinápticos y a través de la inhibición de los canales iónicos de  $\text{Ca}^{2+}$  y la apertura de canales de  $\text{K}^+$ , regulan de manera retrógrada la transmisión sináptica inhibiendo la liberación de neurotransmisores tales como el glutamato [97] y el ácido gama-aminobutírico (GABA) [98]. La señalización del SEC es rápidamente finalizada por la recaptación selectiva de la AEA y del 2-AG en neuronas y células de la glía.

Se ha postulado que la AEA puede transportarse por difusión simple debido al gradiente de concentración o a través de proteínas transportadoras como las proteínas de unión a los ácidos grasos [95]. El mecanismo de transporte del 2-AG podría ser similar al de la AEA, pero no ha sido del todo caracterizado [99]. Una vez que los endocannabinoides son recaptados por las células pueden ser degradados por hidrólisis u oxidación. La AEA es degradada por acción de la hidrolasa de amidas de ácidos grasos FAAH (por sus nombre en inglés fatty acid amide hydrolase) en ácido araquidónico y etanolamina, mientras que el 2-AG es principalmente hidrolizado por la lipasa de monoacilglicerol (MAGL) en ácido araquidónico y glicerol [100]. La oxidación de ambos ligandos podría estar mediada por la ciclooxygenasa-2 (COX-2) y por varias lipoxigenasas [101]. En la Fig. 1.7 se muestra un esquema simplificado de la ruta metabólica del SEC y de su señalización retrógrada en la sinapsis neuronal.



**Figura 1.7:** Esquema simplificado de las rutas metabólicas de los endocannabinoides AEA y 2-AG. Ambos neurotransmisores son sintetizados a demanda en las neuronas post-sinápticas. La síntesis de la AEA es catalizada por la NAPE-PLD a partir del fosfolípido NAPE. El 2-AG se sintetiza a partir del DAG, en una reacción catalizada por la DAGL $\alpha$ . La AEA y el 2-AG son liberados al espacio sináptico y se unen a sus receptores CB1 y CB2 pre-sinápticos. Rápidamente, son recaptados ingresando a la neurona pre-sináptica por difusión pasiva o a través de unos transportadores. Allí son hidrolizados por acción de la FAAH y de la MAGL.

### 1.4.3. Los receptores cannabinoides

Tras el descubrimiento del  $\Delta$ -9-tetrahidrocannabinol, el desarrollo de análogos sintéticos y el mapeo de los sitios de unión de dichos ligandos se develó la existencia de un receptor de cannabinoides. Este presentaba propiedades similares a las de un GPCR huérfano, que ahora es conocido como el receptor de cannabinoides tipo 1 (CB1) [102-104].

El CB1 se encuentra codificado por el gen *CNR1* y consiste en una secuencia de 417 aminoácidos en el humano. Su secuencia aminoacídica muestra un 99% de identidad con respecto al ratón. Sumado a la forma canónica del receptor CB1, se ha reportado la existencia de dos isoformas con extremos N-terminal cortos resultantes del splicing alternativo [105, 106]. Las propiedades farmacológicas y fisiológicas de estas isoformas todavía no han sido caracterizadas, ya que los estudios realizados en modelos *in vivo* muestran grandes discrepancias [107].

Poco tiempo después del hallazgo del CB1, se identificó y clonó otro receptor cannabinoide, denominado más tarde receptor de cannabinoides tipo 2 (CB2). El CB2 se encuentra codificado por el gen *CNR2*, y su secuencia en humanos presenta 360 aminoácidos. La secuencia aminoacídica solo comparte un 44% de homología con el CB1, mientras que su homología entre humanos y roedores es del 80% [108].

La AEA es un agonista parcial del receptor de cannabinoides tipo 1 (CB1) que presenta baja afinidad por el receptor de cannabinoides de tipo 2 (CB2), mientras que el 2-AG actúa como agonista sobre ambos receptores con una afinidad media [91, 109]. Ha sido reportado que tanto la AEA como el 2-AG interactúan con otros receptores. Entre ellos podemos mencionar al receptor de potencial transitorio V1 TRPV1 (por sus siglas en inglés transient receptor potential cation channel subfamily V member 1), que participa en la transmisión sináptica de la nocicepción [91], y al receptor huérfano GPR55, un GPCR que se acoplaría a  $G_q$  [110].

En la búsqueda de nuevas terapias farmacológicas, en los últimos años se han desarrollado numerosos análogos sintéticos de los EC que presentan mayor selectividad por determinados receptores cannabinoide. Por ejemplo, la (R)-(+)-metanandamida (AM356) es un análogo estable de la AEA selectivo para el receptor CB1, con valores de  $K_i$  de 20nM para el CB1 y de 800nM para el CB<sub>2</sub>. El AM251 es un potente agonista inverso del CB<sub>1</sub> que presenta una selectividad 300 veces mayor que por sobre el CB2 [94].

#### **1.4.4. Distribución de los receptores cannabinoide**

A partir de técnicas autoradiográficas, hibridación *in-situ* e inmunohistoquímica, se probó que el CB1 es el GPCR más ampliamente expresado en el cerebro [95]. Entre las regiones con mayores niveles de CB1 se encuentran el hipocampo, el bulbo olfatorio, el ganglio basal y el cerebelo. También se halló una expresión moderada en la corteza cerebral, el septum, la amígdala y el hipotálamo, mientras que en el tálamo y el cuerno ventral de la médula espinal los niveles de expresión del CB1 son bajos [111].

Las terminales presinápticas presentan una alta densidad del CB1, en donde media la señalización retrógrada de los endocannabinoides [112]. Esto no excluye la existencia del CB1 a nivel postsináptico, en donde estudios funcionales demostraron una auto-inhibición ejercida por endocannabinoides en neuronas neocorticales [113]. Por otro lado, se detectaron bajos niveles de CB1 en astrocitos, oligodendrocitos y en la microglía, donde presentaría un rol mediando la transmisión sináptica [114, 115].

Aparte del SNC, el CB1 también se expresa en el sistema nervioso periférico (SNP) y en determinadas regiones del tejido periférico. En el SNP se encuentra principalmente en las terminales nerviosas simpáticas [116], mientras que a nivel periférico se encuentra en el tracto gastrointestinal (TGI) [117], tejido adiposo [118], sistema reproductivo, glándula adrenal y médula ósea [119].

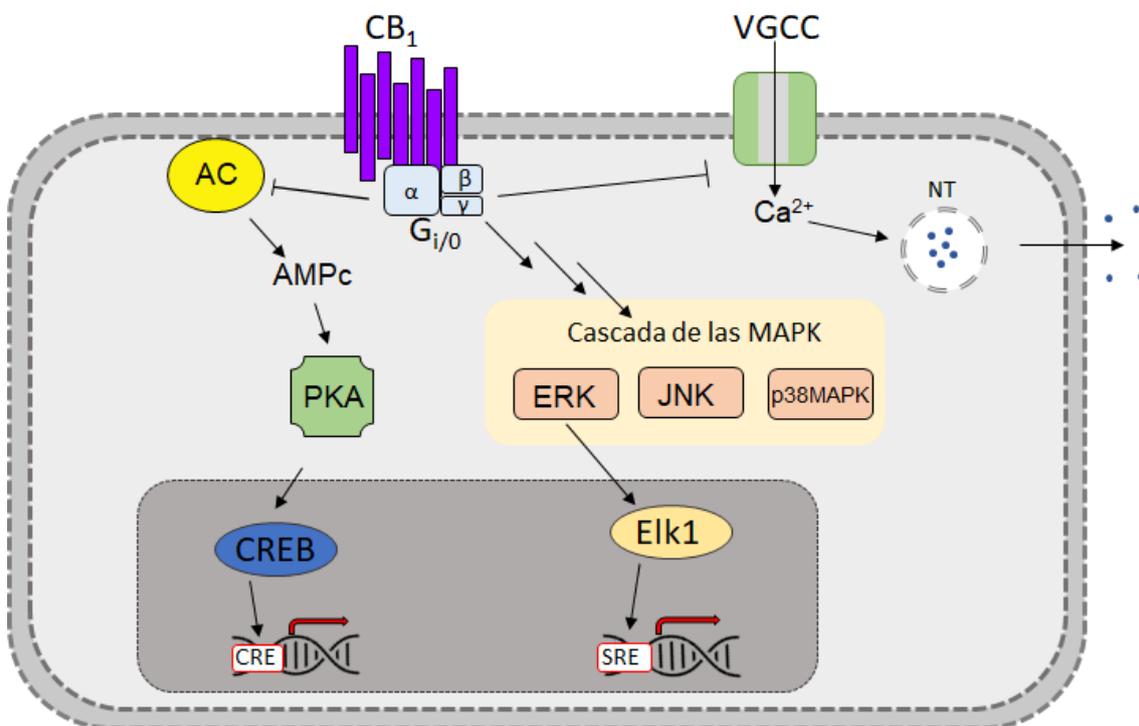
Tres años después del descubrimiento del CB1, el CB2 fue identificado en macrófagos presentes en el bazo [120]. Estudios posteriores revelaron una expresión predominante del CB2 en células del sistema inmune y niveles moderados de expresión en otros tejidos periféricos, incluyendo el TGI [121], sistema cardiovascular, hígado, tejido adiposo, hueso y sistema reproductivo. En contraste con el CB1, en un principio el CB2 no se encontró en SNC y se lo catalogó como un receptor cannabinoide periférico [122]. Sin embargo, este concepto ha sido refutado por trabajos que demostraron su presencia en cerebro [123]. Si bien la expresión del CB2 en SNC y SNP es sumamente inferior al CB1, el CB2 también participa de la actividad neurológica, principalmente en la nocicepción, la adicción a drogas y en la neuroinflamación. Estudios realizados en neuronas piramidales de la corteza prefrontal identificaron que el receptor CB2 modula la excitabilidad neuronal mediante la regulación de canales de  $Cl^-$  activados por  $Ca^{2+}$  [124].

#### **1.4.5. Señalización de los receptores cannabinoide**

Tanto el CB1 como el CB2 son miembros de la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR por su nombre en inglés *G protein coupled receptor*) y se acoplan a la proteína  $G_{i/o}$  sensible a la toxina pertussis, suprimiendo la actividad de la adenilil ciclasa (AC) y la formación del AMPc tras la activación del receptor [122]. Sin embargo, se ha reportado que el CB1 también es capaz de acoplarse a  $G_s$  [125, 126] y  $G_{q/11}$  [127] de manera ligando- y tejido-dependiente. A su vez, se sabe que el CB1 inhibe la actividad de canales de  $Ca^{2+}$  tipo P/Q, R y N [33, 128]. Se postula que sus efectos sobre los canales de  $Ca^{2+}$  estarían implicados en la disminución de la liberación de

neurotransmisores inducida por endocannabinoides [129], implicados en la señalización retrógrada del SEC en la sinapsis neuronal.

Estudios previos han mostrado que el CB1 puede inducir la activación de la vía de las MAPK, incluyendo la activación de ERK1/2, la kinasa c-Jun N-terminal o JNK (por su nombre en inglés c-Jun N-terminal kinase) y p38, las cuales participan en la regulación de la proliferación, muerte y ciclo celular [130, 131]. Esta respuesta depende del tipo celular y del ligando implicado [132]. Las principales vías de señalización moduladas por el CB1 se encuentran esquematizadas en la figura 1.8.



**Figura 1.8:** Principales vías de señalización del CB1. El CB1 es un GPCR que se acopla a la proteína  $G_{i/o}$ . Su activación por unión a sus agonistas clásicos inhibe la vía de señalización AMPc/PKA/CREB, activa la cascada de las MAPKs y bloquea la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC), inhibiendo la liberación de neurotransmisores al espacio sináptico.

#### **1.4.6. Rol del SEC en la consolidación de la memoria asociativa**

El receptor de cannabinoides tipo 1 (CB1) se encuentra altamente expresado en el sistema límbico, incluyendo el hipocampo y la amígdala y su señalización es crucial para la formación de memorias de corto y largo plazo [95].

La infusión intra-ABL de WIN55,212-2, agonista del CB1, administrada inmediatamente después del entrenamiento de evitamiento inhibitorio, facilita la consolidación de la memoria manera dosis-dependiente [84], mientras que el bloqueo farmacológico del CB1 con su agonista inverso AM251 presenta efectos opuestos sobre la consolidación de la memoria que dependerían del grado de aversión del estímulo incondicionado [84, 133, 134].

#### **1.4.7. Participación del sistema endocannabinoide en los efectos rápidos de los glucocorticoides**

El sistema endocannabinoide modula un sinnúmero de procesos fisiológicos y resulta esencial en la respuesta adaptativa al *stress*, estando también relacionado con los procesos de consolidación de la memoria y del aprendizaje principalmente a través del CB1. La síntesis y liberación de los endocannabinoides se encuentra finamente regulada y se ha postulado que los glucocorticoides cumplen un papel fundamental en ella, induciendo su liberación, al punto que se ha sugerido que son los endocannabinoides los mediadores de los efectos atribuidos a los glucocorticoides en los eventos relacionados al *stress* [135, 136].

La primera evidencia se origina a partir de estudios *in vitro* que evaluaron los efectos de los glucocorticoides sobre la actividad del eje HHA. En estos experimentos se demostró que la rápida supresión de la liberación de glutamato inducida por los glucocorticoides en las neuronas del núcleo paraventricular se encuentra mediada por el incremento en los niveles de endocannabinoides [137]. Análisis bioquímicos realizados sobre láminas de hipocampo revelaron un incremento rápido de anandamida y 2-araquidonilglicerol tras el tratamiento con dexametasona [138]. De acuerdo con el modelo planteado, tras la unión de los GC al mGR, se activa una vía de señalización que involucra la activación de la PKA y que culmina en la síntesis de endocannabinoides [71, 139]. La liberación de endocannabinoides desde la membrana post-sináptica suprime la liberación presináptica de neurotransmisores que participan del feed-back negativo del eje HHA. Estudios más recientes *in vivo* arrojaron resultados similares al demostrar que una única inyección de corticosterona aumenta rápidamente los niveles de anandamida en el

hipocampo y en la amígdala [140]. Estos trabajos sentaron las bases para plantear al SEC como mediador de los efectos rápidos de los GC sobre el aprendizaje y la memoria.

Estudios realizados con un sistema gen reportero que presenta el promotor de la hidrolasa de amidas de ácidos grasos o FAAH (por su nombre en inglés fatty acid amide hydrolase) proponen que los GC también pueden aumentar los niveles de AEA disminuyendo su degradación. Como ya se mencionó, la FAAH es una enzima que participa del metabolismo de la AEA, degradándola a ácido araquidónico (AA) y etanolamina. Se ha descrito que el promotor de esta enzima presenta 5 sitios GRE, y que la sobreexpresión del GR disminuye significativamente su transcripción basal [141].

Debido a la interacción descrita entre el SEC y los GC, se evaluó si la señalización del SEC podría mediar los efectos de los GC sobre la consolidación de la memoria. Estudios realizados en modelos murinos mostraron que la administración post-entrenamiento del antagonista del CB1, AM251, bloquea el efecto facilitador de la corticosterona [84] y el de la dexametasona [134]. A partir de estos resultados, el grupo de Campolongo planteó un modelo en donde sugiere que el sistema endocannabinoide, actuando a través de su señalización retrógrada, mediaría los efectos rápidos de los GC sobre la consolidación de la memoria con un alto componente emocional [136].

En base a los antecedentes mencionados, nos propusimos estudiar la regulación de la actividad del sistema glucocorticoide sobre la consolidación de la memoria asociativa por parte de los ligandos cannabinoides señalizando a través del receptor CB1. Para ello, estudiamos la interacción entre ambos sistemas tanto a nivel conductual como a nivel molecular, sobre la vía de señalización GR/ERK/Zif268 implicada en los efectos de los glucocorticoides sobre la consolidación de la memoria. La regulación de memorias con un alto componente emocional ha otorgado una ventaja evolutiva y resulta fundamental para la supervivencia. Los resultados presentados en este trabajo pretenden ahondar en los mecanismos moleculares que subyacen la consolidación de la memoria, permitiendo postular nuevas bases para la comprensión de desórdenes de ansiedad tales como el trastorno de estrés post-traumático (TEPT) o ciertas fobias, cuya etiología se encontraría asociada a fallas en la formación de memorias asociativas [142].

### 1.5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Teniendo en cuenta los antecedentes descriptos puede hipotetizarse que los ligandos del sistema endocannabinoide, actuando a través de su receptor CB1, son capaces de modular la actividad del receptor a glucocorticoides involucrada en la consolidación de memorias asociativas con un alto componente emocional. El estudio de este proceso y de los posibles mecanismos moleculares implicados son el objetivo del presente proyecto.

Objetivos específicos:

Objetivo 1: Estudiar cómo la actividad del receptor a glucocorticoides afecta la respuesta de evitamiento inhibitorio a nivel de la consolidación frente a la modulación del sistema cannabinoide.

Objetivo 2: Estudiar en el hipocampo murino la interacción entre el sistema glucocorticoide y endocannabinoide sobre la regulación de la transcripción de Zif268.

Objetivo 3: Estudiar en la línea celular HT22, derivada de hipocampo murino, la interacción entre el sistema glucocorticoide y endocannabinoide sobre la regulación de la transcripción de Zif268 y el mecanismo molecular que subyace dicho proceso.

## **2.MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1. MODELOS DE ESTUDIO

### 2.1.1. Ratones CD1

Ratones machos CD1 silvestres (WT) y deficientes para el gen CB1 (KO) de entre 8 y 12 semanas de edad (30-35 g de peso) fueron criados y mantenidos en el bioterio del CEFyBO de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron alojados acorde a la guía *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animal*, en un ambiente controlado (20-22°C de temperatura, 45-55% de humedad y ciclos de 12hs luz/oscuridad), con agua y comida para que sean ingeridas ad libitum.

La semana previa a cada ensayo, los ratones recibieron en distintos días 3 inyecciones por vía *i.p.* de 100 µl de solución fisiológica para habituarse a la manipulación por el operador. El día previo al ensayo, se pesaron para calcular la cantidad de droga a administrar y se le asignó a cada uno un tratamiento de manera randomizada.

### 2.1.2. Línea celular HT22

Las células fueron provistas por la Dra. Ana Liberman (IBioBA, MPSP, CONICET, Argentina). Fueron crecidas adheridas en estufa con atmósfera humidificada, conteniendo 5% CO<sub>2</sub>, a 37°C, en medio DMEM (Dulbecco' s modified Eagle' s medium) suplementado con 10% de SFB y 50 µg/ml de gentamicina. Las células fueron subcultivadas mediante el agregado de una solución 0,05% de tripsina y 0,3 mM de EDTA. Durante el cultivo se procuró que nunca sobrepasen el 50% de confluencia para evitar su diferenciación.

## 2.2. PREPARADO DE DROGAS

A continuación, se muestra un listado de las drogas empleadas para realizar los ensayos:

Droga	Solución stock	Laboratorio	Blanco Molecular
<b>Ligandos del sistema glucocorticoide</b>			
Fosfato Sódico de Dexametasona	4 mg/ml	SIDUS	agonista del GR
Dexametasona	100 mM en DMSO	Tocris	agonista del GR
Corticosterona	10 mM en etanol	Tocris	agonista no selectivo para el GR y MR
<b>Ligandos del sistema endocannabinoide</b>			
R-(+)-metanadamida (AM356)	10 mM en etanol	Tocris	agonista del CB <sub>1</sub>
HU-210	10 mM en etanol	Tocris	agonista no selectivo para el CB <sub>1</sub> y CB <sub>2</sub>
O-2050	20 mM en etanol	Tocris	Antagonista-agonista parcial del CB <sub>1</sub>
AM251	4 mM en etanol	Tocris	Agonista inverso del CB <sub>1</sub>
<b>Inhibidores de kinasas</b>			
PD 98059	25 mM en DMSO	Tocris	inhibidor de MEK

Las soluciones de uso final se prepararon en DMEM (ensayos *in vitro*) o en solución fisiológica (ensayos *in vivo*). La concentración de uso final se detalla en la sección de resultados.

### 2.3. GENOTIPIFICACIÓN DE RATONES

Segmentos de 5-6 mm de colas de ratones de 21 días de edad de la cepa CD1 WT y KO fueron utilizados como material para obtener el ADN genómico para la genotipificación. Los segmentos de las colas fueron digeridos con la enzima proteinasa K y el buffer de lisis para extracción de ADN (Tris-HCl 100 mM, EDTA 5 mM, SDS 0,2%, NaCl 200 mM, pH 8,0) durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos, los sobrenadantes se traspasaron a un nuevo tubo donde se les agregó 400 µl de isopropanol y se invirtieron para que precipite el ADN. El ADN se traspasó a un nuevo tubo, se dejó secar al aire durante 5 minutos y luego se resuspendió con buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) durante 8 horas a 37 °C. A partir de este ADN fueron realizadas las PCRs para las secuencias del gen CB1 y/o el casete de neomicina (Neo-casete) (Tabla 1). Este último es la secuencia por la cual se reemplazó el gen en cuestión (CB1) en los animales KO. Las PCRs dieron dos productos, el correspondiente al gen CB1 de 366 pb y el correspondiente al Neo-casete de 200 pb. Para estas PCRs se utilizó el siguiente programa:

- 94°C 2 min (desnaturalización inicial)
- 30 ciclos de 94 °C 30 seg, 56°C 1 min, 72°C 20 seg
- 72°C 7 min (extensión final).

Al finalizar la PCR, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 2% y se observó la presencia de bandas correspondientes a los fragmentos esperados.

Gen	Sentido	Secuencia
Neo-casete	Sentido	GATGCTCTTCGTCAGATCATCC
	Anti-sentido	GCAGGATCTCCTGTCATCTCACC
CB1	Sentido	GAGGTGCCAGGAGGGAAC
	Anti-sentido	CATCATCACAGATTTCTATGTAC

**Tabla 2.1:** Secuencia de los cebadores utilizados para la genotipificación.

### 2.4. EVALUACIÓN CONDUCTUAL DE ANIMALES

Los ensayos conductuales se realizaron por la tarde (13 hs), en una habitación destinada a pruebas de comportamiento, en presencia de ruido blanco y baja intensidad lumínica. 2 horas antes de cada prueba, las jaulas con animales se colocaron en la habitación, permitiendo a los animales habituarse al lugar. Entre las distintas fases de la prueba los ratones se transportaron en sus jaulas al bioterio. El dispositivo utilizado

se limpió entre individuos con etanol 70% para remover rastros de olor. La actividad se registró con una video-cámara Sony.

#### **2.4.1. Prueba de campo abierto**

El dispositivo empleado consiste en una caja de acrílico de 42X35X30 cm con paredes oscuras y piso cuadrulado. La prueba consta de 1 ensayo en el que se coloca al animal en el centro de la caja y se lo deja explorar por 5 minutos. La actividad locomotora horizontal se estimó con el número de líneas cruzadas. Los parámetros que utilizamos para estimar el comportamiento simil-ansioso en la prueba de campo abierto son el tiempo que tarda en ingresar el animal al centro de la arena (latencia al centro), el número de veces que ingresa al centro durante el período de permanencia en el aparato, el número de defecaciones y el número de erguimientos sobre las patas traseras (*rearings*). Cuando los ratones son introducidos en el centro del aparato del campo abierto, tienden a explorar la zona periférica de la arena. Esta tendencia a permanecer cerca de las paredes, conocida como tigmotaxia, disminuye gradualmente durante los primeros minutos de exploración. Los agentes ansiolíticos disminuyen este comportamiento, haciendo que los animales exploren antes el centro de la arena e ingresen más veces a este sector.

#### **2.4.2. Prueba de evitamiento inhibitorio**

Esta prueba es empleada con el fin de evaluar memoria asociativa a largo plazo. El dispositivo utilizado es una caja separada en dos compartimentos, uno iluminado y otro oscuro, con libre circulación de uno a otro. El compartimento oscuro posee un piso de varillas metálicas que conducen corriente eléctrica. La prueba consta de tres fases:

- Pre-entrenamiento: se coloca al animal 30 seg en el compartimento iluminado sin acceso al otro sector, y a continuación 30 seg en el compartimento oscuro.
- Entrenamiento: media hora más tarde, se coloca al animal en el compartimento iluminado y se mide el tiempo de latencia para que pase al compartimento oscuro ( $latencia_{0hs}$ ). La conducta innata del ratón es ir hacia ese compartimento y cuando esto sucede, y el ratón se encuentra con todo su cuerpo dentro de este sector, se le aplica un shock eléctrico de 0,2 o 0,35 mA durante 3 seg. 10 seg después, el ratón es retirado del aparato y antes de ser devuelto a su jaula recibe una inyección i.p. con el ligando (DEX 0,1 mg/kg, DEX 1,5 mg/kg, AM356 0,03mg/kg o combinaciones de estas drogas). Al haber administrado los compuestos post-entrenamiento descartamos que los efectos observados se deban a una modulación a nivel de la adquisición de la memoria.
- Evaluación: A las del 48 hs del entrenamiento, se coloca al animal en el compartimento iluminado y se mide el tiempo de latencia para que pase al compartimento oscuro (tiempo máximo de 300 seg). A esta latencia la denominamos

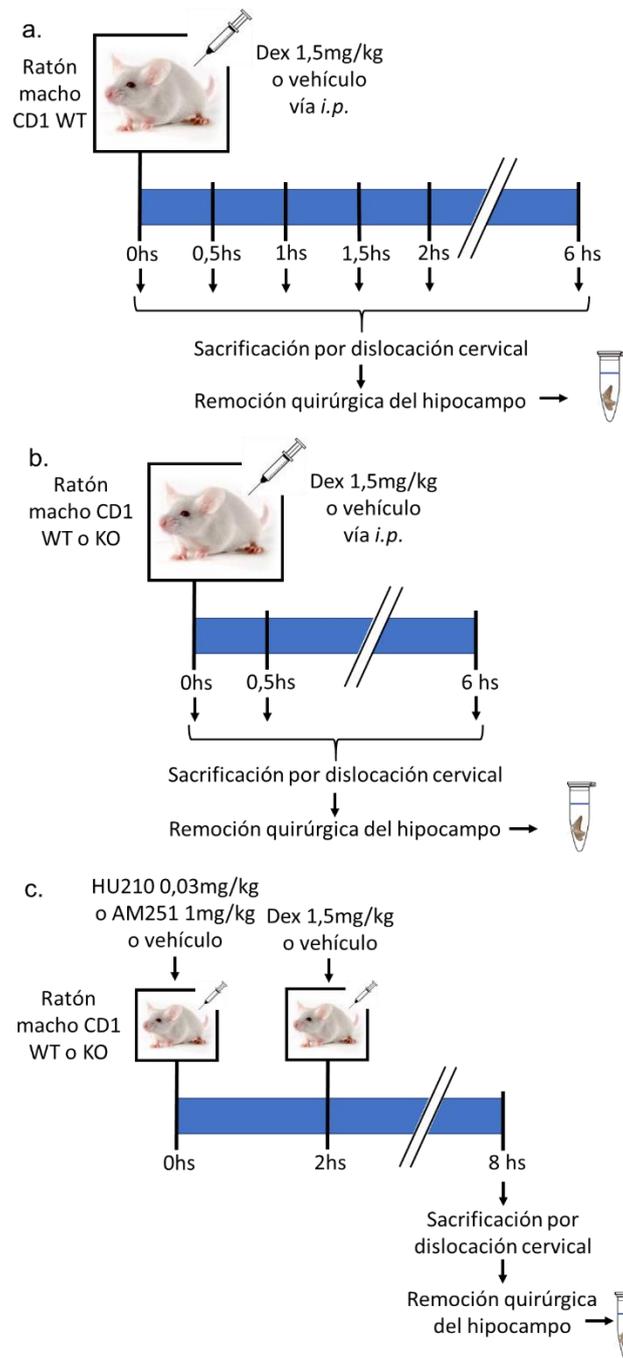
latencia<sub>48hs</sub> o latencia de retención. Si el ratón asocia el compartimento oscuro con el shock eléctrico, inhibirá su comportamiento innato y evitará ir hacia ese sector, mostrando tiempos de latencia mayores.

## 2.5. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE mRNA EN TEJIDOS Y CÉLULAS

### 2.5.1. Obtención de extractos de hipocampo murino

#### 2.5.1.1. Tratamiento de los animales:

- Determinación de efecto de la DEX sobre la transcripción de Zif268 en ratones WT: ratones WT se inyectaron con DEX 1,5 mg/kg o con vehículo por vía *i.p.* y a distintos tiempos se sacrificaron por dislocación cervical (N=3 mínimo por tratamiento). Para medir los niveles basales de los genes se sacrificaron ratones sin recibir tratamiento (Fig. 2.1a). Este protocolo corresponde a los resultados informados en la figura 3.9.
- Determinación del efecto de la DEX sobre la transcripción de Zif268 en ratones WT vs KO: ratones WT y KO se inyectaron con DEX 1,5 mg/kg o con vehículo por vía *i.p.* y se sacrificaron por dislocación cervical a los 30 min o a las 6 horas de tratamiento (N=4 mínimo por tratamiento). Para medir los niveles basales de los genes se sacrificaron ratones sin recibir tratamiento (Fig. 2.1b). Este protocolo corresponde a los resultados informados en la figura 3.10.
- Determinación de la modulación de la respuesta de la DEX ante el tratamiento con ligandos CB1: ratones WT y KO se pre-trataron por 2 hs con HU210 0,1 mg/kg, AM251 1 mg/kg o con vehículo y luego con DEX 1,5 mg/kg o vehículo. Todos los ligandos se administraron por vía *i.p.* A las 6 horas se sacrificaron por dislocación cervical y se les removió quirúrgicamente el hipocampo (N=4 mínimo por tratamiento) (Fig. 2.1c). Este protocolo corresponde a los resultados informados en la figura 3.12.



**Figura 2.1:** Protocolos utilizados para el estudio de los efectos de la dexametasona y los cannabinoides sobre los niveles de mRNA de Zif268 en el hipocampo de ratones CD1 WT y KO para el receptor CB1. El protocolo **a.** corresponde a la figura 3.12, el **b.** a la 3.13 y el **c.** a la 3.15.

2.5.1.2. Remoción y recolección de los hipocampos: una vez sacrificados los animales, se les removió quirúrgicamente ambos hemisferios del hipocampo. Todo el procedimiento se realizó en una placa de Petri colocada sobre hielo para mantener en frío los tejidos. Cada hipocampo se recolectó en un tubo autoclavado conteniendo 0,5 ml de reactivo de Quick-Zol (Kalium Technologies).

2.5.1.3. Homogeneización de los hipocampos: los tejidos en Quick-Zol se trasladaron a un homogeneizador de teflón de 2 ml autoclavado y se disgregaron mecánicamente hasta no observar fragmentos sólidos a nivel macroscópico. Una vez concluido el proceso, las muestras se devolvieron sus tubos originales y se centrifugaron a 12000 xG por 20 min en centrífuga refrigerada a 4°C. El sobrenadante conteniendo el RNA se trasladó a un tubo autoclavado nuevo. Durante la homogeneización las muestras se mantuvieron en hielo para evitar la degradación del RNA.

### **2.5.2. Obtención de extractos celulares**

Células HT22 en etapa exponencial de crecimiento se sembraron en placas de 12 pocillos al 50% de confluencia. Al día siguiente se hambreadon durante la noche reemplazando el medio por DMEM base con antibiótico. Los estímulos se realizaron 48 hs después del plaqueo, y se encuentran detallados en las figuras correspondientes de la sección de resultados. Para finalizar los estímulos se aspiró el sobrenadante y sobre la monocapa de células se agregó 0,5 ml del reactivo Quick-Zol (Kalium Technologies) a fin de realizar una lisis celular activa. Los tubos conteniendo el lisado celular fueron inmediatamente llevados a un freezer de -80 °C donde se conservaron hasta el momento de la purificación del ARN.

### **2.5.3. Purificación del ARN**

Los tubos conteniendo el lisado celular o de hipocampo fueron retirados de los -80 °C e incubados a temperatura ambiente por 5 min. Luego de dicha incubación se agregaron 250 µl de cloroformo a cada tubo, se los agitó vigorosamente de manera manual por 15 seg y se los incubó a temperatura ambiente por 5 min. Inmediatamente después de esta segunda incubación se los centrifugó por 15 min a 12000 xG en centrífuga refrigerada (4 °C). Mediante dicha centrifugación se logra la separación de las fases acuosa y orgánica (superior e inferior, respectivamente). La fase acuosa conteniendo el ARN fue transferida a otro tubo de centrifuga y la fase orgánica descartada. Luego, el ARN fue precipitado por agregado de 0,5 ml de isopropanol a la fase acuosa, incubación a temperatura ambiente durante 10 min e inmediata centrifugación a 12000 xG por 10 min en centrífuga refrigerada. El precipitado fue lavado con 500 µl de etanol 75%, centrifugado a 7000 xG por 5 min en centrífuga refrigerada, secado a temperatura ambiente por 10 min y resuspendido en 20 µl de agua libre de nucleasas. El ARN así resuspendido fue incubado durante 10 min a 55 °C para facilitar su disolución y posteriormente conservado a -80 °C hasta el momento de ser utilizado. En todos los pasos de este procedimiento se utilizaron materiales y reactivos libres de nucleasas.

#### 2.5.4. Tratamiento con DNAsa

Con el fin de eliminar las posibles contaminaciones con ADN de las muestras a cuantificar por PCR se trataron las mismas con DNAsas. Luego de descongelar en hielo cada muestra de ARN se agregaron 2  $\mu$ L de solución BaseLine Zero y 1  $\mu$ L de DNasa a cada tubo. Esta mezcla se incubó 20 minutos a 37 °C. Luego del agregado de 2  $\mu$ L de Stop Solution, las mismas se incubaron nuevamente 10 min a 65 °C y posteriormente se conservaron a -80 °C. La calidad del RNA obtenido fue analizada por electroforesis en geles de agarosa 2% conteniendo bromuro de etidio (BrEtd), 0,1 mg/ml en buffer TAE 1X (50X: 242 g Tris-Base; 47,1 ml ácido; 100 ml EDTA 0,5 mM; agua cantidad suficiente para 1000 ml; pH 8,0). Se sembraron 500 ng de muestra, previamente diluida con xilencianol. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 30 min en buffer TAE. Una vez finalizada la electroforesis el gel fue visualizado por emisión de la fluorescencia del bromuro de etidio intercalado al absorber luz ultravioleta (300 nm).

#### 2.5.5. Síntesis del ADN copia (ADNc)

Cada muestra de ARN fue descongelada en hielo, su contenido de ARN fue cuantificado por absorbancia a 260nm y la ausencia de contaminación proteica fue verificada por cuantificación de la relación de absorbancias a 260 nm/280nm (relaciones inferiores a 1,7 indican contaminación con proteínas). Para la síntesis de ADNc se partió de 2  $\mu$ g de ARN y se le agregó 2  $\mu$ l de cebadores hexaméricos al azar (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) y cantidad suficiente de agua libre de nucleasas para alcanzar un volumen final de 14,5  $\mu$ l. Esta mezcla se incubó 5 min a 65 °C e inmediatamente después se colocó la muestra en hielo y se procedió a la síntesis del ADNc por agregado de 4  $\mu$ l de buffer RT Buffer (5X - Promega); 0,5  $\mu$ l de transcriptasa reversa M-MLV 200 U/ $\mu$ l (Promega); 1  $\mu$ l de DNTPs 10 mM (Invitrogen). La mezcla de reacción así preparada fue homogeneizada y sometida, en termocicladora, a un ciclo de:

1. 10 min a 25 °C
2. 60 min a 37 °C
3. 15 min a 70 °C
4. 10°C  $\infty$

### 2.5.6. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Para la cuantificación relativa del ARNm se utilizaron los siguientes pares de cebadores específicos:

Nombre	Especie	Orientación	Secuencia de oligonucleótidos	TM (°C)
GILZ	ratón	sentido	5'-CCTCACAATGCGGCCACAGAT -3'	56
		antisentido	5'-GGACTTCATGTCTTCAGTGGACA - 3'	55
Zif268	ratón	sentido	5'-AGTTATCCCAGCCAAACGAC -3'	52
		antisentido	5'-G TTCAGGCCACAAAGTGTTG -3'	52
β-ACTINA	ratón	sentido	5'-AGACTTCGAGCAGGAGATGG -3'	54
		antisentido	5'-AGCACTGTGTTGGCATAGAG -3'	52
CB1	ratón	sentido	5'-TAATTGCTGTGTTGCCTCTCC-3'	59
		antisentido	5'-TCCGATCCAGAACATCAGGTA -3'	58

Es importante mencionar que tanto los cebadores como la secuencia blanco pueden afectar la eficiencia de la qPCR. Es por ello que los cebadores utilizados fueron elegidos debido a que reúnen las condiciones que se describen el manual de Biorad (Real-Time PCR Applications Guide) entre las que se destacan:

- La secuencia blanco debe ser de 75-200 pb
- Los cebadores deben tener un contenido de GC de 50-60%
- La temperatura de melting (T<sub>m</sub>) de los cebadores debe ser de 50-65°C

La cuantificación fue realizada utilizando como sistema de detección el equipo Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System. Cada muestra de ADNc fue cuantificada por triplicado, en una mezcla de reacción preparada de la siguiente forma:

- 0,25 µl de cebador sentido 10 µM
- 0,25 µl de cebador antisentido 10 µM
- 3 µl de HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne)
- 13,5 µl de agua libre de nucleasas
- 2 µl de ADNc (previamente diluido 1/10).

Las mezclas de reacción fueron procesadas de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Desnaturalización inicial	5 min a 95 °C	} 40 ciclos
2. Desnaturalización	30 s a 95 °C	
3. Hibridación	30 s a 60 °C	
4. Elongación	30 s a 72 °C	

La especificidad de cada par de cebadores fue chequeada por el análisis de la curva de disociación realizada mediante una rampa de temperatura de 72 a 95 °C aumentando 1 °C cada 5 segundos.

En cada tanda de cuantificación se incluyeron controles de contaminación con ADN genómico (procesando para ello muestras de ARN tratadas como se indica en el punto 6.3 pero reemplazando el volumen de enzima retrotranscriptasa por agua libre de nucleasas) y blancos de reacción (colocando agua libre de nucleasas en lugar del volumen de muestra).

### 2.5.7. Análisis de los resultados de qPCR

La cantidad relativa del mRNA fue calculada utilizando el método de  $\Delta\Delta Ct$  [143] normalizado por  $\beta$ -Actina (gen de referencia). Para ello, en una primera instancia se realizó una curva de calibración para determinar la eficacia de cada par de cebadores. Se realizaron mezclas en partes iguales de las muestras de ADNc que se deseaba comparar (dilución 1). Luego se realizaron 5 diluciones seriadas al tercio (dilución 2, 3, 4, 5 y 6) y siguiendo el mismo protocolo que el indicado para las muestras en el punto anterior, se determinó el valor de Ct tanto para el gen de interés (X) como para el gen de referencia ( $\beta$ -actina). Estos valores se graficaron en función del logaritmo de cada dilución, obteniéndose una función lineal con su correspondiente ecuación ( $y=m.x+b$ ). De esta forma, se obtuvieron dos gráficos: uno para el gen de interés (Zif268, CB1) ( $y_1=m_1.x+b_1$ ) y el otro para  $\beta$ -actina ( $y_2=m_2.x+b_2$ ). Finalmente, la eficiencia (E) fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$E = 10^{(-1/m)}$  donde E debe ser cercana a 2

Una vez conocido el valor de eficiencia para cada cebador, la cuantificación relativa de una muestra incógnita se calcula con la siguiente ecuación:

$$R_{2/1} = \frac{E_X^{\Delta Ct X}}{E_{Actina}^{\Delta Ct Actina}} \quad \text{donde,}$$

$R_{2/1}$  es la expresión de X normalizada a  $\beta$ -actina de la muestra 2 relativa a la muestra 1,

$$\Delta Ct_x = Ct(X \text{ muestra } 2) - Ct(X \text{ muestra } 1)$$

$$\Delta Ct_{ACTINA} = Ct(\text{Actina muestra } 2) - Ct(\text{Actina muestra } 1)$$

Para una revisión más exhaustiva de este análisis de datos se recomienda la lectura de la guía de aplicaciones de Bio-Rad – “Real-Time PCR Applications Guide”.

## 2.6. TRANSFECCIONES TRANSIENTES

Las células HT22 se transfectaron con el reactivo K2 Transfection System (Biontexas) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Brevemente, se plaquearon  $0.5-2.0 \times 10^5$  células por well de p48 en 250  $\mu\text{l}$  de DMEM completo. Se incubaron las mismas por 24 hs hasta lograr una confluencia del 90-100% y se realizaron las transfecciones dependiendo del ensayo.

Para la transfección de ADN plasmídico, se agregaron 5  $\mu\text{l}$  de K2 Multiplier por well de p48 a transfectar. Luego de 2 hs, se agregaron en 15  $\mu\text{l}$  de DMEM libre de suero, los diferentes plásmidos hasta una cantidad total de ADN de 300 ng. En otros 15  $\mu\text{l}$  del mismo medio se agregaron 1,2  $\mu\text{l}$  de K2 Transfection Reagent. Se mezclaron ambas alícuotas de 15  $\mu\text{l}$  y se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 15-20 minutos. Luego se agregó gota a gota dicha mezcla al well conteniendo las células y estas se incubaron por 48 hs.

Para la transfección de siRNA, se agregaron en 15  $\mu\text{l}$  de DMEM libre de suero 400 ng de siRNA. En otros 15  $\mu\text{l}$  del mismo medio se agregaron 1,2  $\mu\text{l}$  de K2 Transfection Reagent. Se mezclaron ambas alícuotas de 15  $\mu\text{l}$  y se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 15-20 minutos. Luego se agregó gota a gota dicha mezcla al well conteniendo las células y estas se incubaron por 48 hs.

## 2.7. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD GENÓMICA DEL GR EN LA LÍNEA CELULAR HT22 MEDIANTE ENSAYO GEN-REPORTERO DE LUCIFERASA

Células HT22 se sembraron en placas de 24 pocillos y se transfectaron con la construcción reportera TAT3-Luc mediante el protocolo descrito anteriormente. El plásmido fue donado por el Dr. Carlos P. Fitzsimons de la Universidad de Amsterdam. Después de 4 h, las células se sembraron en placas de 96 pocillos y, luego de 24 h, fueron hambreadas durante la noche reemplazando el medio por DMEM base con antibiótico. Los estímulos con dexametasona se agregaron 48 hs después de la transfección. La actividad de luciferasa fue medida a las 24 hs con el kit de luciferasa Steady-Glo (Promega Biosciences Inc, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones

del fabricante, utilizando el lector de microplacas FlexStation3 (Molecular Devices, LLC). Los datos se expresaron como un porcentaje de la condición basal.

## **2.8. OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LIGANDOS DEL CB1 POR DOSAJE DE AMPc**

Células HT22 se plaquearon en placas de 24 pocillos al 50% de confluencia. Luego de 24 hs, se hambreadon por 2 hs reemplazando el medio por DMEM base. A continuación, las células fueron incubadas durante 10 min con IBMX y luego se realizó un estímulo con distintas concentraciones de AM356 o AM251 en presencia de IBMX, durante 20 o 10 min respectivamente. Posteriormente las células fueron lisadas y resuspendidas en etanol absoluto. Este fue evaporado y los niveles de AMPc determinados como se indica en el siguiente apartado. Este protocolo corresponde a la figura 3.15.

Para los bloqueos con O-2050, luego de la incubación por 10 min con IBMX, las células se pretrataron por 5 min con O-2050 10 nM en presencia de IBMX. A continuación, se realizó un estímulo con AM356 100 nM por 20 min, con dos concentraciones de AM251 (10 nM y 10  $\mu$ M) por 10 min o con DEX 100 nM por 10 min. Posteriormente las células fueron lisadas y resuspendidas en etanol absoluto. Este fue evaporado y los niveles de AMPc determinados como se indica en el siguiente apartado. Este protocolo corresponde a la figura 3.16.

Para el tratamiento con DEX, las células se pretrataron por 10 min con IBMX y por 5, 10, 20 o 60 min con DEX 100nM o con IBMX solamente. Este fue evaporado y los niveles de AMPc determinados como se indica en el siguiente apartado. Con el fin de discriminar los cambios en el AMPc producidos por la DEX del efecto del IBMX, a cada concentración de AMPc se le restó el promedio de AMPc del tratamiento con IBMX solamente correspondiente a este tiempo de estímulo. Estos son los datos que se encuentran graficados. Este protocolo corresponde a la figura 3.23B. Para los bloqueos con O-2050, luego de la incubación por 10 min con IBMX, las células se pretrataron por 5 min con O-2050 10  $\mu$ M en presencia de IBMX. A continuación, se realizó un estímulo con DEX 100 nM por 10 min. Este protocolo corresponde a la figura 3.24.

### **2.8.1. Ensayo de unión de PKA para el dosaje de AMPc**

2.8.1.1. Obtención de la proteína ligadora: la cuantificación del AMPc en las muestras se realizó mediante una adaptación de la técnica de unión a proteína ligadora [144] según Davio y col., 1995 [145]. La proteína quinasa específica de AMPc (PKA) se obtuvo de tejido muscular bovino según la siguiente técnica: se homogenizó el tejido en buffer fosfato 50 mM, pH 7,4 y EDTA 5 mM, trabajando en frío sobre baño de hielo. Se centrifugó a 27000 xG durante 20 min y el sobrenadante resultante se

precipitó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en una relación de 32,4 g por cada 100 ml de solución y se centrifugó a 16000 xG por 20 min. El precipitado obtenido se resuspendió en 6% del volumen inicial en buffer fosfato 5mM. Posteriormente, se dializó durante dos días a 4 °C en el mismo buffer, se centrifugó a 27000 xG por 20 min y el sobrenadante así obtenido se utilizó como fuente de proteína ligadora para el ensayo. El rendimiento fue de aproximadamente 60 ml de una solución cuya concentración proteica fue de 30 mg/ml. Para determinar la concentración óptima de proteína ligadora se realizaron curvas de unión máxima en función de distintas diluciones de proteína, desde 1/10 hasta 1/500 en presencia de 40000 dpm de  $[^3\text{H}]\text{AMPc}$ . La proteína ligadora así titulada se utilizó en una dilución capaz de unir entre el 35% y 50% del trazador.

2.8.1.2. Protocolo y condiciones del ensayo: como trazador se utilizó  $[^3\text{H}]\text{AMPc}$  en concentración final de 3 nM en el medio de incubación (0,205 ng/tubo), equivalente a 40000 dpm/tubo. El buffer de incubación utilizado fue Tris-HCl 50 mM pH 7,4; 0,1% albúmina bovina; EDTA 4 mM y 0.1% azida sódica. El ensayo se realizó incubando 50  $\mu\text{l}$  de  $[^3\text{H}]\text{AMPc}$ , 100  $\mu\text{l}$  de una dilución de proteína ligadora y 50  $\mu\text{l}$  de los distintos estándares o muestras a analizar en tubos de vidrio por triplicado. Luego de 2 hs a 4 °C se separó el AMPc unido del libre mediante precipitación con carbón-dextrán (carbón 21 mg/ml, dextrán 2,1 mg/ml). Para ello, se agregó 300  $\mu\text{l}$  de una suspensión de carbón-dextrán, seguido de 15 min de incubación a 4 °C y centrifugación a 3000 xG durante 15 min a igual temperatura. Los sobrenadantes fueron transferidos a viales con solución centelladora. La actividad unida se midió en un equipo de centelleo líquido. Para el cálculo de unión inespecífica se trabajó con una concentración 1 mM de AMPc en el medio de incubación.

2.8.1.3. Controles y estándares: en los distintos ensayos realizados se incluyeron los siguientes tubos:

B0: para determinar la máxima unión del trazador a la proteína ligadora.

I: inespecífico, unión en presencia de una concentración 1 mM de AMPc.

Curva Standard: se construyó procesando ocho estándares de AMPc en concentraciones entre 0,39 y 91 pmol/tubo.

Muestras problema: al igual que el resto de los tubos, se procesaron por triplicado. Las distintas muestras se diluyeron de forma tal que la concentración de AMPc de las mismas se encontrara dentro del rango de la curva estándar. Para ello se resuspendió el residuo seco procedente de la evaporación del etanol en el volumen correspondiente de buffer de incubación.

## 2.9. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

### 2.9.1. Obtención de muestras de hipocampo

Ratones WT y KO en condiciones basales se sacrificaron por dislocación cervical e inmediatamente después se les removió quirúrgicamente ambos hemisferios del

hipocampo. Los tejidos se recolectaron en tubos conteniendo 200  $\mu$ l de buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM; Tritón X-100 1%; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Deoxicolato de sodio 0,25% (v/v); pH 7,4). A continuación, se sonicaron por 30 seg y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. Al momento de la siembra, se tomó un volumen de muestra correspondiente a 25  $\mu$ g de proteína, se le agregó 4  $\mu$ l de Laemmli Buffer 5X (composición del buffer 1X: Tris-HCl 50 mM pH 6,8; SDS 2%; 2-mercaptoetanol 100 mM; glicerol 10% y azul de bromofenol 0,05%), y se le agregó H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> csp 20  $\mu$ l.

### **2.9.2. Obtención de muestras de la línea celular HT22**

Células HT22 se plaquearon al 50% de confluencia en placas de 12 pocillos. A las 24 hs se hambreadon durante la noche reemplazando el medio por DMEM base con antibiótico. A las 48 hs del plaqueo se estimularon de acuerdo a los tratamientos que se detallan en la sección de resultados. Para cortar la reacción se aspiró el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con PBS manteniendo la placa en hielo para disminuir la actividad celular. Sobre la monocapa de células se agregó 100  $\mu$ l de Laemmli Buffer 1X. Previo a la siembra se sonicaron por 30 seg y se incubaron en agua a 80 °C por 5 min.

### **2.9.3. Electroforesis y transferencia**

Los extractos proteicos fueron analizados en geles de poliacrilamida al 10%, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El buffer de electroforesis utilizado consistió en Tris 25 mM; glicina 192 mM; 0,1% SDS, pH 8,3. La electroforesis se desarrolló en minigeles a corriente constante de 30 mA (BioRad). Al finalizar el fraccionamiento, el gel fue equilibrado en buffer de transferencia (TrisHCl 25 mM, pH 8,3, glicina 150 mM; 20% metanol) durante 15 min y transferido a membranas de nitrocelulosa a 100 V, durante 1 h a 4 °C. Las proteínas transferidas a las membranas fueron teñidas en una solución 0,2% Ponceau; 0,5% ácido acético, para visualizar las proteínas totales y constatar la eficiencia de la transferencia en todos los carriles. Posteriormente, las membranas fueron lavadas en PBS hasta la desaparición de la tinción.

### **2.9.4. Revelado de las proteínas específicas**

Luego de tratar las membranas con solución de bloqueo (5% leche en PBS-0,05% Tween) durante 1 h, estas fueron incubadas durante 1 h con 1  $\mu$ g/ml del anticuerpo correspondiente: anti-pERK1/2 de conejo y anti-ERK1/2 de conejo o anti- $\beta$ tubulina de conejo (para el estudio de la fosforilación de ERK), o anti-GR de conejo y anti- $\beta$ tubulina de conejo (para los ensayos de hipocampo). Todos los anticuerpos fueron comprados

al proveedor Santa Cruz Biotechnology. La detección se llevó a cabo incubando con 0,2 µg/ml anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa durante 1 h, seguido de una exposición a una solución sustrato de la peroxidasa y amplificadora de la quimioluminiscencia (Amersham Life Science). El resultado se visualizó por autorradiografía.

## **2.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA HIDROLASA DE AMIDAS DE ÁCIDOS GRASOS (FAAH)**

La actividad de la FAAH fue determinada según la técnica descrita por Paria y col. (1996) con modificaciones menores. Para la obtención de los extractos, células HT22 cultivadas por 48 hs en placas de 6 pocillos y en un 100% de confluencia se hambreadon por 2 hs reemplazando el medio por DMEM base. A continuación, se estimularon con DEX 100 nM por distintos tiempos o con AM251 10 µM por 20 min. Para finalizar el estímulo, se aspiró el medio y la placa se conservó a -80 °C hasta el momento de la determinación de la actividad de la FAAH.

El día del ensayo, las células resuspendieron mecánicamente con un scrapper en 100 µl de buffer Tris-HCl 20 mM (pH 7,6) conteniendo EDTA 1 mM y se sonicaron durante 30 segundos. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976). Se incubó 50 µg de proteína por tubo durante 1 hora en un baño termoestabilizado a 37°C. Las proteínas se incubaron en 200 µl de buffer Tris/HCl 50 mM (pH 8,5) que contenía [<sup>3</sup>H]-anandamida 100 µM y 20 nmoles de anandamida fría. La reacción se detuvo mediante la adición de una mezcla cloroformo:metanol (1:1 v/v). Se centrifugó durante 5 min a 7.000 xG y se transfirió la fase orgánica a un nuevo tubo. Sobre la fase acuosa se realizaron dos extracciones de componentes orgánicos adicionando cloroformo puro y centrifugando 5 min a 7.000 xG. La fase acuosa de cada muestra se trasvasó a un vial conteniendo 2 ml de líquido de centelleo. La cuantificación se llevó a cabo en un contador de centelleo líquido. La actividad enzimática se expresó como porcentaje de [<sup>3</sup>H]AEA en fase soluble respecto a la [<sup>3</sup>H]AEA total. En los distintos ensayos realizados se incluyeron los siguientes tubos aparte de las muestras:

- Bco: para determinar la hidrólisis espontánea de la [<sup>3</sup>H]AEA. Este tubo se prepara igual que el tubo muestra, pero sin agregar proteína.
- Total: indica la cantidad de dpm total agregada en cada tubo y corresponde a la masa inicial de [<sup>3</sup>H]AEA. Este tubo se prepara agregando directamente en el líquido de centelleo los 200 µl de buffer Tris/HCl 50 mM (pH 8,5) que contienen [<sup>3</sup>H]-anandamida 100 µM y 20 nmoles de anandamida fría.

### 2.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron aplicando análisis de varianza (ANOVA) de uno o dos factores o de medidas repetidas seguido por el test de comparaciones múltiples de Tukey o Dunnett. Para el caso de dos tratamientos se utilizó la prueba “t” de Student (para muestras no apareadas). Los supuestos de normalidad y homocedasticidad se analizaron por medio del test de Shapiro-Wilks y de Levene respectivamente. En el caso que los datos no hayan cumplido con los supuestos se realizaron transformaciones de los mismos para lograr que los datos se ajusten a una distribución normal o se analizaron con los tests no paramétricos de Mann-Whitney (comparación de dos tratamientos) o con el análisis de la varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por el test a posteriori de Dunn (comparación de tres o más tratamientos). Las variables que cumplieron con los supuestos de normalidad fueron expresadas con los valores medios  $\pm$  SD (desvío estándar), mientras que las variables que no ajustaron a una distribución normal se describieron con la mediana y el rango intercuartil. Las diferencias se consideraron significativas cuando p fue menor a 0,05. Letras iguales señalan que los datos comparados no difieren significativamente entre sí. Para la evaluación estadística de los ensayos *in vivo* se utilizó en programa InfoStat versión 2015 estudiantil, desarrollado por la Universidad de Córdoba. Los datos obtenidos en los ensayos *in vitro* se analizaron con el programa GraphPad Prism versión 6.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

### 2.12. MATERIALES

DMEM, gentamicina, Buffer fosfato salino (PBS), Metil-isobutilxantina (IBMX), inhibidores de proteasas y fosfatasas, seroalbúmina bovina (BSA) fueron obtenidas de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Dexametasona, AM356, AM251, HU251 y O-2050 fueron obtenidos de Tocris Cookson Inc. [<sup>3</sup>H]AMPc y [<sup>3</sup>H]-AEA fueron adquiridos de Perkin Elmer Life Science (Boston, MA). El suero fetal bovino (SFB) fue obtenido de Natocor (Argentina). La tripsina fue adquirida en GIBCO Life Technologies (Gaithersburg, MD). El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

## **3.RESULTADOS**

### **3.1. RESPUESTA CRUZADA ENTRE EL RECEPTOR CB1 Y EL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES (GR) SOBRE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA ASOCIATIVA**

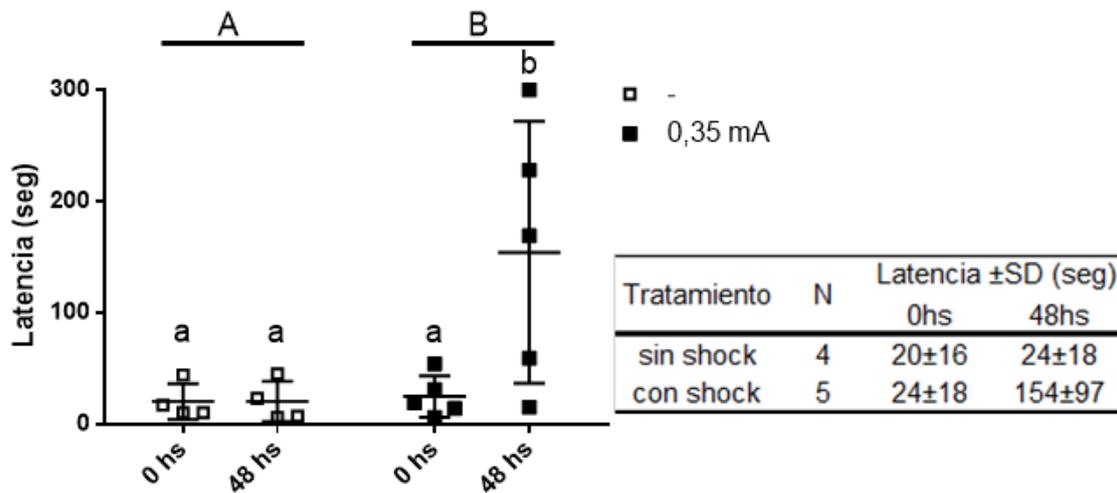
Ha sido descrito que tanto el sistema cannabinoide como el glucocorticoide modulan la consolidación de memorias asociativas con un alto componente emocional. Como se ha mencionado, el tratamiento con GCs a determinadas dosis facilita la consolidación de la memoria. El efecto de los cannabinoides sobre este proceso no ha sido del todo caracterizado y su estudio en la prueba de evitamiento inhibitorio arroja resultados dispares. Por ejemplo, los resultados obtenidos al tratar los animales con el agonista inverso del CB1 AM251 no son concluyentes, ya que puede inducir tanto un efecto facilitador como un efecto disruptivo dependiendo de las condiciones del ensayo [84, 133]. La infusión intrahipocampal de este ligando inhibiría el efecto facilitador de la dexametasona sobre la consolidación evaluada en la prueba de evitamiento inhibitorio [134].

Con el fin de ahondar en la caracterización del CB1 como partícipe de este proceso, utilizando estrategias tanto farmacológicas como moleculares, comparamos el desempeño de ratones CD1 con fenotipo salvaje y KO para el receptor CB1 en la prueba de evitamiento inhibitorio, ante el tratamiento post-entrenamiento con glucocorticoides y/o con ligandos del CB1.

#### **3.1.1. Caracterización del comportamiento de los animales CD1 WT en la prueba de evitamiento inhibitorio**

Como primera instancia para estudiar la interacción entre los sistemas glucocorticoide y endocannabinoide sobre la consolidación de memorias aversivas, decidimos caracterizar el desempeño de la cepa de ratones CD1 de fenotipo salvaje en la prueba de evitamiento inhibitorio. Durante la sesión de entrenamiento, un grupo experimental recibió un shock eléctrico de 0,35 mA al ingresar al compartimento oscuro (grupo shock), mientras que el segundo grupo no recibió shock eléctrico (grupo control). A las 48 hs se evaluó la retención en los animales (Fig.3.1). El protocolo se detalla en la sección de materiales y métodos. El ANOVA de medidas repetidas mostró una interacción significativa entre la administración del shock eléctrico y el comportamiento en las distintas sesiones ( $F_{(1, 6)}=15,13$ ;  $P=0,0081$ ). Las comparaciones a posteriori indican que los ratones pertenecientes al grupo shock mostraron un incremento significativo en la latencia<sub>48hs</sub> en comparación con la latencia<sub>0hs</sub>. Por el contrario, el grupo control no mostró diferencias significativas latencia<sub>48hs</sub> en comparación con la latencia<sub>0hs</sub>. Estos resultados muestran que los animales que reciben shock eléctrico en la sesión de entrenamiento (0 hs) cambian su respuesta conductual en la sesión de evaluación (48 hs), mientras que los animales que no reciben shock eléctrico no modifican de manera significativa su respuesta. Esto sugiere que el entrenamiento en la prueba de evitamiento inhibitorio,

aplicando un shock de 0,35 mA, induciría la formación de una memoria asociativa entre el contexto en donde se administra el shock y el estímulo aversivo en los ratones CD1 de fenotipo salvaje.

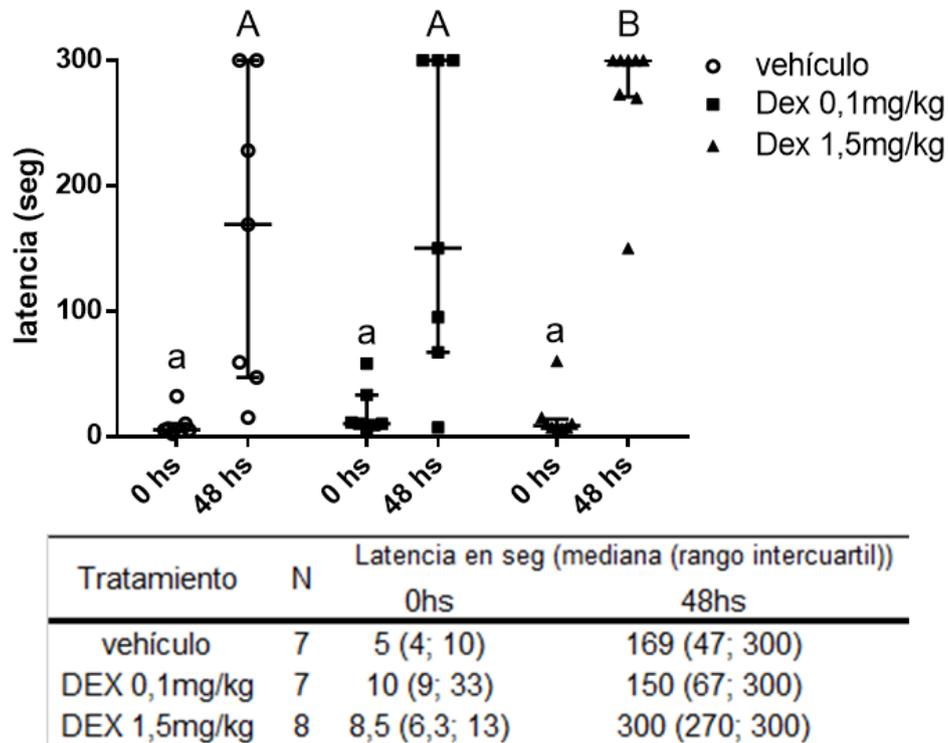


**Figura 3.1:** Evaluación conductual de los ratones CD1 de fenotipo salvaje en la prueba de evitamiento inhibitorio. Un grupo control (-) se sometió al entrenamiento, pero no recibió shock eléctrico al ingresar al compartimento oscuro. El otro grupo recibió un shock eléctrico de 0,35 mA al ingresar con sus cuatro patas al compartimento oscuro. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test de ANOVA con medidas repetidas seguido por el test a posteriori de Tukey (efecto de los tratamientos indicados con letras mayúsculas, efecto de la sesión dentro de cada grupo indicado con letras minúsculas). Cada punto corresponde a la respuesta medida para un animal y se grafica la media +/- SD. En la tabla se detallan los valores de estos parámetros.

### 3.1.2. Caracterización del efecto de la dexametasona sobre la respuesta de evitamiento inhibitorio en ratones CD1 WT

Está reportado que dosis entre 0,3 y 2 mg/kg de DEX aumentan la latencia de evaluación (*retention latencies*) en la prueba de evitamiento inhibitorio, mientras que valores fuera de ese rango carecerían de efecto [6]. Para caracterizar el efecto de este GC en los ratones CD1 WT y seleccionar las dosis de trabajo, evaluamos el comportamiento de los animales en la prueba de evitamiento inhibitorio ante el tratamiento post-entrenamiento con distintas dosis de DEX (0,1 mg/kg y 1,5 mg/kg) o vehículo (grupo control). A las 48 hs se evaluó la retención en los animales (Fig. 3.2). El análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis mostró un efecto general significativo ( $H=8,126$ ;  $P=0,0172$ ) entre los grupos experimentales al comparar las latencias medidas en la sesión de evaluación (48 hs). A partir de las comparaciones a posteriori no se encontraron diferencias significativas entre la respuesta de los ratones tratados con DEX 0,1 mg/kg y los tratados con vehículo ( $P=0,2740$ ). Por el contrario, si se encontró una diferencia significativa entre los animales tratados con altas dosis de DEX y vehículo ( $P=0,0049$ ). De esta manera, definimos en nuestro modelo que una dosis de DEX 1,5

mg/kg presentaría un efecto facilitador sobre la formación y expresión de memorias asociativas evaluadas en la prueba de evitamiento inhibitorio mientras que una dosis de DEX 0,1 mg/kg carecería de efecto y resultaría subóptima. Por otro lado, estos resultados sugieren que una dosis de DEX 1,5 mg/kg podría facilitar la formación de memorias asociativas entre el shock eléctrico y el contexto de entrenamiento.



**Figura 3.2:** Comportamiento de ratones CD1 WT en la prueba de evitamiento inhibitorio tratados con distintas dosis de dexametasona. Se trabajó con tres grupos experimentales. Inmediatamente después del entrenamiento, los animales se trataron vía *i.p.* con DEX (0,1 mg/kg o 1,5 mg/kg) o vehículo. En el gráfico figuran las latencias medidas durante el entrenamiento (0 hs) y la evaluación (48 hs). Los datos se analizaron estadísticamente con el análisis de la varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por el test a posteriori de Dunn. Cada grupo se comparó contra el control con vehículo. Se compararon las latencias entre grupos experimentales dentro de cada sesión (estadística de latencias 0 hs indicada con letras en minúscula, estadística de latencias 48 hs indicada con letras en mayúscula). Cada punto corresponde a la respuesta medida para un animal y se grafica la mediana y el rango intercuartil.

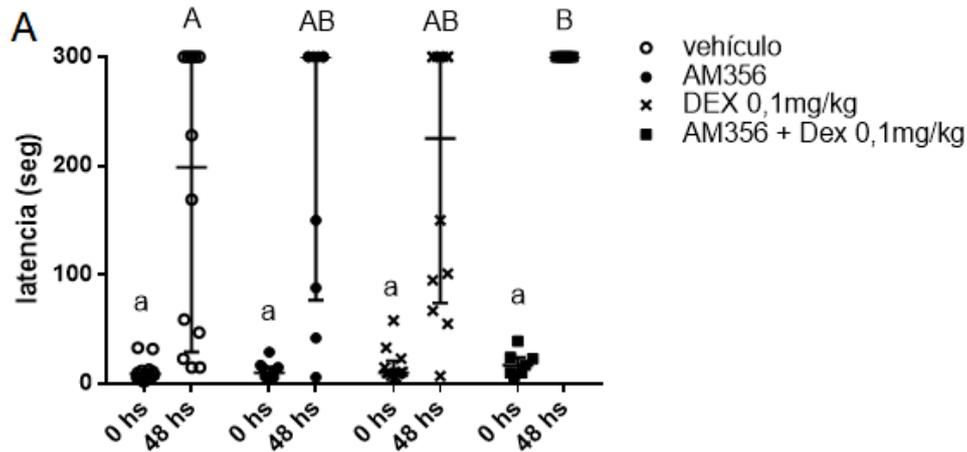
### 3.1.3. Estudio de la interacción entre el agonista del receptor CB1 AM356 y la dexametasona sobre la respuesta de evitamiento inhibitorio en animales CD1 WT

Dado que nuestro objetivo es estudiar la modulación por parte del receptor CB1 sobre la actividad del receptor GR en la formación de memorias asociativas aversivas, decidimos evaluar si el agonista del receptor CB1 AM356 es capaz de modular el efecto de la dexametasona sobre la respuesta de evitamiento inhibitorio. Para ello, animales

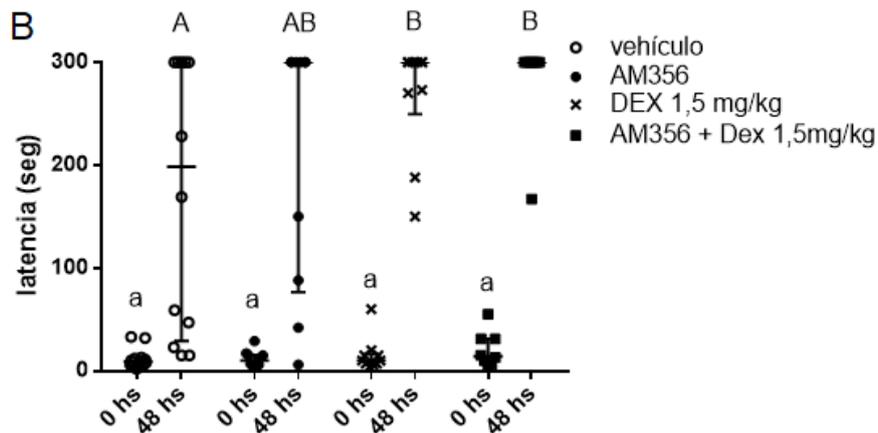
WT fueron tratados por vía *i.p.* con AM356 (0,03 mg/kg), DEX (0,1 mg/kg o 1,5 mg/kg) o combinaciones de estos ligandos inmediatamente después de la sesión de entrenamiento de la prueba de evitamiento inhibitorio. Al comparar las latencias de retención (48 hs), el análisis de la varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis mostró un efecto general significativo entre los grupos experimentales vehículo, DEXsubóptima (0,1 mg/kg), AM356 y DEXsubóptima+AM356 ( $H=8,021$ ;  $P=0,0320$ ). A partir de las comparaciones a posteriori no se encontraron diferencias significativas entre las latencias de retención en los animales tratados con AM356 o con DEX subóptima con respecto a los tratados con vehículo (vehículo vs AM356  $P=0,4357$ ; vehículo vs DEXsubóptima  $P=0,5936$ ), pero sí se observó una diferencia significativa entre las latencias de retención del grupo cotratado con ambos ligandos con respecto a los tratados con vehículo ( $P=0,0173$ ) (Fig 3.3A). Al analizar la modulación del AM356 sobre el efecto de la dosis óptima de DEX, también se encontró un efecto general significativo entre las latencias de retención de los grupos experimentales ( $H=9,513$ ;  $P=0,0232$ ) (Fig. 3.3B). Tanto los animales tratados con DEX 1,5 mg/kg como los cotratados con AM356 y DEX 1,5mg/kg mostraron un aumento significativo en la latencia de retención con respecto a los tratados con vehículo (vehículo vs DEXóptima  $P=0,0232$ ; vehículo vs AM356+DEXóptima  $P=0,0081$ ). No obstante, no se observaron diferencias significativas entre las latencias de retención de estos grupos experimentales (DEXóptima vs AM356+DEXóptima  $P=0,6151$ ). La mayoría de estos animales alcanzó latencias máximas y tuvieron que ser removidos del equipo a los 5 minutos por no haber ingresado al compartimento oscuro durante la sesión de evaluación (70% para el grupo DEX óptima y 87% para el grupo AM356+DEX óptima).

Estos resultados muestran que dosis del agonista CB1 AM356 y de dexametasona que no modifican de manera significativa la respuesta conductual de los animales en la sesión de evaluación con respecto al vehículo, al ser coadministrados aumentan de manera significativa la respuesta de los animales. Esto sugeriría que la administración conjunta del agonista CB1 AM356 y la dexametasona en dosis que carecen de un efecto *per se* podría presentar un efecto facilitador sobre la consolidación de la memoria asociativa.

Con respecto a la modulación del AM356 sobre la DEX a dosis óptima, no se puede descartar una interacción positiva entre los ligandos debido a limitaciones de la configuración experimental. El tratamiento con DEX 1,5 mg/kg induce una respuesta que resulta ser máxima bajo las condiciones en las que se configuró el ensayo, es decir, los tiempos de latencia medidos a las 48 hs no difieren significativamente de los 300 seg. Esto impide evaluar un posible incremento sobre dicha respuesta (Fig. 3.3B).



Tratamiento	N	Latencia en seg (mediana (rango intercuartil))	
		0hs	48hs
vehículo	12	9 (5; 13)	198 (29; 300)
AM356 0,03mg/kg	10	10 (5;15)	300 (76; 300)
DEX 0,1mg/kg	12	10 (8; 21)	225 (74; 300)
DEX+AM356	7	17 (10; 24)	300 (300; 300)



Tratamiento	N	Latencia en seg (mediana (rango intercuartil))	
		0hs	48hs
vehículo	12	9 (5; 13)	198 (29; 300)
AM356 0,03mg/kg	10	10 (5;15)	300 (76; 300)
DEX 1,5mg/kg	10	10 (7;16)	300 (249; 300)
DEX+AM356	8	14 (7; 31)	300 (300; 300)

**Figura 3.3:** Respuesta de evitamiento inhibitorio en ratones WT ante el tratamiento con el agonista CB1 AM356 y dexametasona. Inmediatamente después del entrenamiento, los animales se trataron vía *i.p.* con AM356 (0,03 mg/kg), DEX 0,1 mg/kg (**A**) o 1,5 mg/kg (**B**), combinaciones de estos ligandos o vehículo. En el gráfico figuran las latencias medidas durante las sesiones de entrenamiento (0 hs) y de evaluación (48 hs). Los datos se analizaron estadísticamente con el análisis de la varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por el test a posteriori de Dunn. Se compararon las latencias entre grupos experimentales dentro de cada sesión (estadística de latencias 0 hs indicada con letras en minúscula, estadística de

latencias 48 hs indicada con letras en mayúscula). Cada punto corresponde a la respuesta medida para un animal y se grafica la mediana y el rango intercuartil.

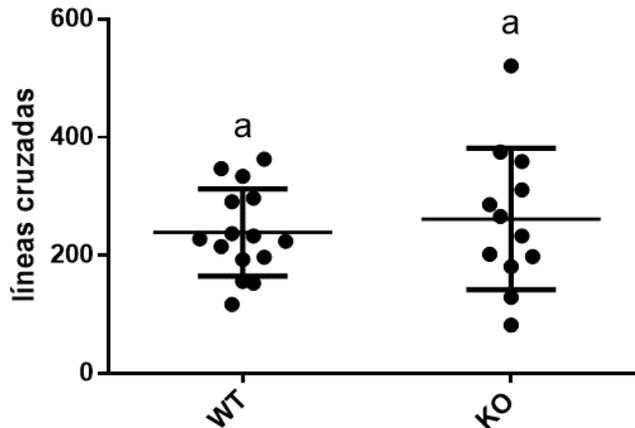
### **3.1.4. Evaluación conductual de los animales CD1 KO para el receptor CB1 con respecto al fenotipo salvaje**

A partir de estudios en dónde se inhibió el efecto facilitador de la dexametasona y de la corticosterona utilizando el agonista inverso del CB1 AM251, se ha propuesto que el sistema endocannabinoide media los efectos de los GC sobre la consolidación de la memoria señalizando a través del CB1 [84, 134]. En este trabajo utilizamos una herramienta distinta para estudiar el rol del SEC y de la señalización del CB1 en este proceso: estudiamos el efecto de la dosis óptima de dexametasona (1,5 mg/kg) sobre la respuesta de evitamiento inhibitorio en animales que presentan una delección genética del receptor CB1 (KO).

En una primera instancia, comparamos la actividad locomotora vertical, conducta similansiosa y la respuesta basal de evitamiento inhibitorio entre los fenotipos con el objetivo de discriminar si las diferencias entre las respuestas de evitamiento medidas ante los tratamientos estudiados se podrían deber a diferencias en estas características.

#### **3.1.4.1. Evaluación de la actividad locomotora horizontal de los animales WT y KO para el receptor CB1 en la prueba de campo abierto**

Comparamos la actividad locomotora horizontal de ambos fenotipos para tener en cuenta si diferencias en las latencias de ingreso al compartimento oscuro del aparato de evitamiento inhibitorio podrían estar asociadas a alteraciones en esta característica. Para este ensayo, trabajamos con dos grupos experimentales, 15 ratones de fenotipo salvaje (WT) y 12 ratones KO para el receptor CB1. Los animales se expusieron por 5 minutos a la arena de la prueba del campo abierto como se detalla el materiales y métodos. La actividad locomotora horizontal se evaluó en función del número de líneas cruzadas durante los 5 minutos de exposición. El test de Student no mostró diferencias significativas entre las líneas cruzadas por los animales KO con respecto a los WT ( $t_{(25)}=0,6121$ ;  $P=0,5460$ ) (Fig 3.4). Estos resultados sugieren que los ratones KO para el receptor CB1 presentarían una actividad locomotora horizontal similar al fenotipo salvaje, al ser evaluada en la prueba de campo abierto.

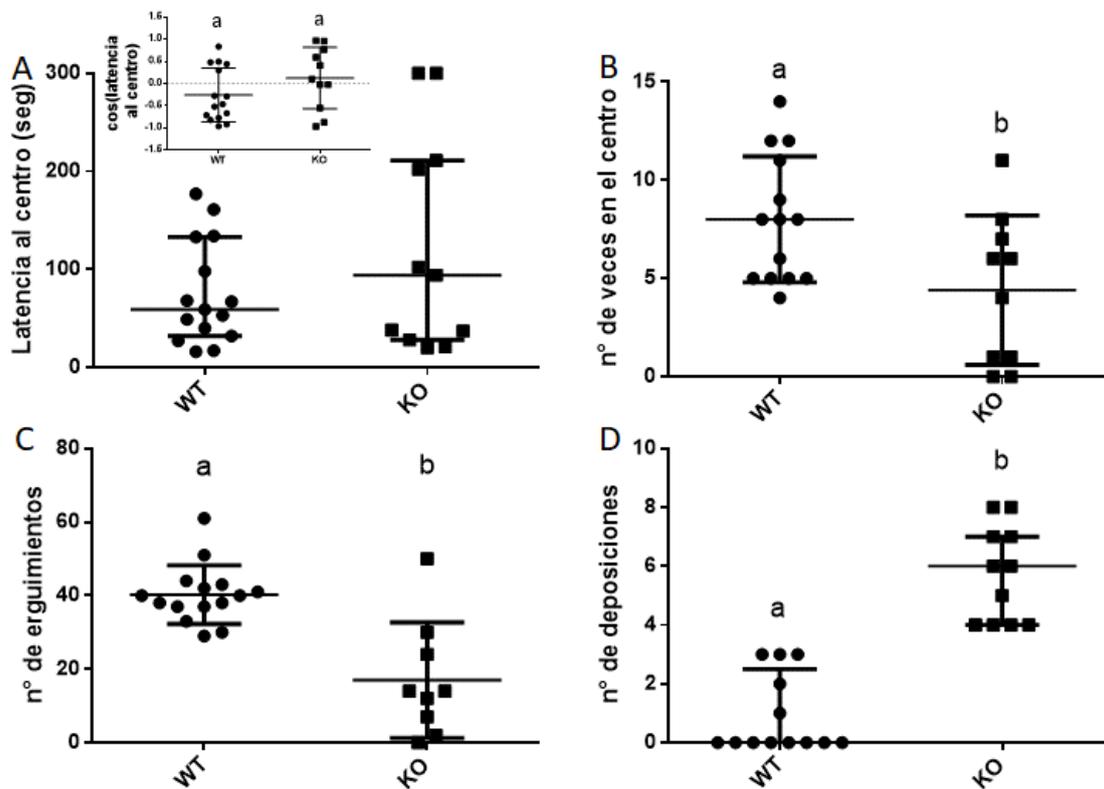


**Figura 3.4:** Actividad locomotora horizontal de los ratones CD1 WT y KO evaluada en el aparato de campo abierto. La actividad locomotora horizontal se estimó a partir del número de líneas cruzadas durante una exposición a la arena de 5 minutos. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test de Student. Cada punto corresponde a la respuesta medida para un animal y se grafica la media +/- SD.

#### 3.1.4.2. Evaluación del comportamiento simil-ansiedad de los animales CD1 WT y KO para el receptor CB1 en la prueba de campo abierto

A partir de estudios en humanos con desórdenes de ansiedad, se postuló que los niveles de ansiedad de un individuo podrían guardar cierta correlación con su grado de condicionamiento al miedo, y que individuos más ansiosos pueden mostrar una adquisición más fuerte o más rápida de la respuesta condicionada que individuos menos ansiosos [142, 146]. Con el fin de comparar la conducta simil-ansiosa de los fenotipos WT y KO para el receptor CB1, evaluamos el comportamiento de los animales al exponerlos por 5 minutos a la arena de la prueba de campo abierto en oscuridad. En este ensayo trabajamos con dos grupos experimentales compuestos por 15 individuos WT y 12 individuos KO y el protocolo se detalla en la sección de materiales y métodos. Cuando los ratones son introducidos en el centro del aparato del campo abierto, tienden a explorar la zona periférica de la arena. Esta tendencia a permanecer cerca de las paredes, conocida como tigmotaxia, disminuye gradualmente durante los primeros minutos de exploración. Los agentes ansiolíticos disminuyen este comportamiento, haciendo que los animales exploren antes el centro de la arena e ingresen más veces a este sector. Los parámetros clásicos utilizados para estimar el comportamiento simil-ansioso son el tiempo que tarda en ingresar el animal al centro de la arena (latencia al centro) y el número de veces que ingresa al centro durante el período de permanencia en el aparato. Otros parámetros cuya validez es más discutida son el número de defecaciones y la actividad locomotora vertical, evaluada en función del número de veces que el animal se para sobre sus patas traseras (erguimientos o *rearings*). Al comparar el desempeño de los ratones KO con respecto a los WT, no se observaron diferencias significativas en la latencia al centro ( $t_{(24)}=1,494$ ;  $P=0,1481$ ), pero si se

observó una disminución significativa en el número de veces en el centro ( $t_{(22)}=2,508$ ;  $P=0,0200$ ) y el número de erguimientos ( $t_{(22)}=4,4847$ ;  $P<0,0001$ ) y un incremento significativo en el número de defecaciones ( $U=0,0$ ;  $P<0,0001$ ) (Fig. 3.5).

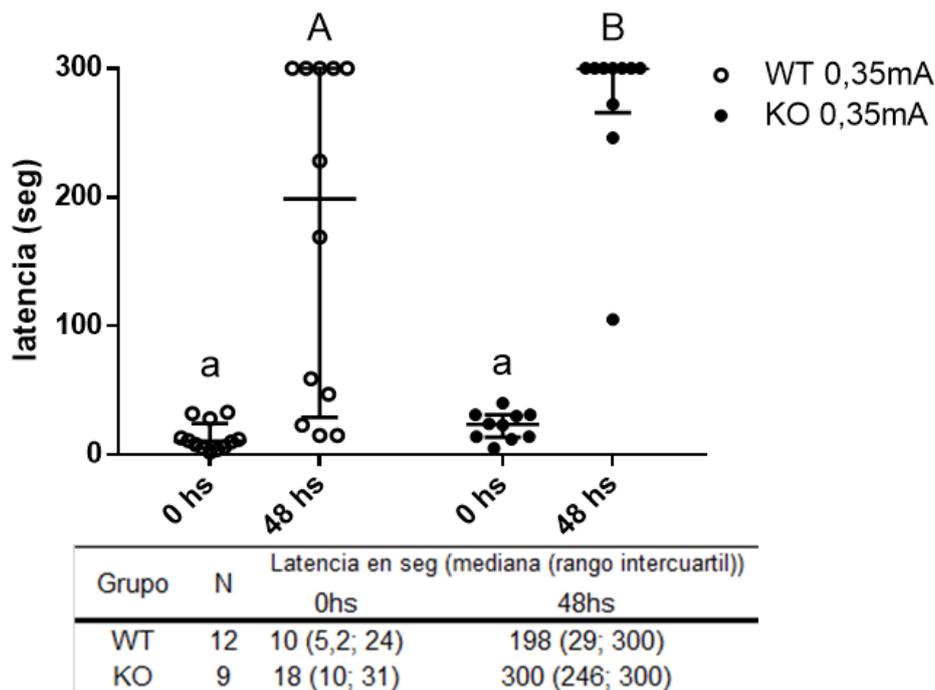


**Figura 3.5:** Evaluación del comportamiento simil-ansiedad en los ratones WT y KO para el CB1 mediante la prueba de campo abierto. Los parámetros utilizados para la evaluación fueron el tiempo que tardó en ingresar el animal al centro de la arena (latencia al centro) **(A)**, el número de veces que el animal ingresó al centro **(B)**, el número de veces que se paró sobre sus patas traseras (número de erguimientos) **(C)** y el número de deposiciones **(D)**. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test de Student A, B y C) o con el test no paramétrico de Mann Whitney (D). Los datos de A se transformaron con la función  $y=\cos(y)$  para que cumplan con los supuestos de homocedasticidad y se grafican en el **inserto A**. Cada punto corresponde a la respuesta medida para un animal y se grafica la media  $\pm$  SD (B, C e inserto A) o la mediana y el rango intercuartil (A y D).

3.1.4.3. Evaluación de la respuesta de los animales CD1 KO para el receptor CB1 en la prueba de evitamiento inhibitorio

Con el objetivo de comparar el desempeño de los ratones WT y KO para el CB1 en la prueba de evitamiento inhibitorio, los animales se entrenaron con un shock eléctrico de 0,35 mA e inmediatamente después se trataron vía *i.p.* con vehículo. Las latencias para ingresar al compartimento oscuro el día del entrenamiento no difirieron significativamente entre grupos ( $U=36,50$ ;  $P=0,1266$ ). Al comparar las respuestas medidas en la sesión de evaluación con el test no paramétrico de Mann Whitney, se

encontró que los ratones KO para el receptor CB1 mostraron mayores latencias a las 48 hs en comparación con los ratones WT ( $U=34,50$ ;  $P=0,0344$ ) (Fig. 3.6). Estos resultados sugieren que el entrenamiento de evitamiento inhibitorio induciría en los ratones KO para el CB1 la formación de una memoria asociativa más fuerte que en los ratones de fenotipo salvaje, al entrenarlos con un shock eléctrico de 0.35 mA. Bajo estas condiciones de la prueba conductual, la respuesta alcanzada por los KO se encuentra muy cerca de los niveles máximos, lo cual dificulta el estudio de una posible interacción entre la dexametasona y la delección genética del CB1. Decidimos modificar las condiciones del entrenamiento con la finalidad de disminuir la respuesta basal de estos animales durante la sesión de evaluación.

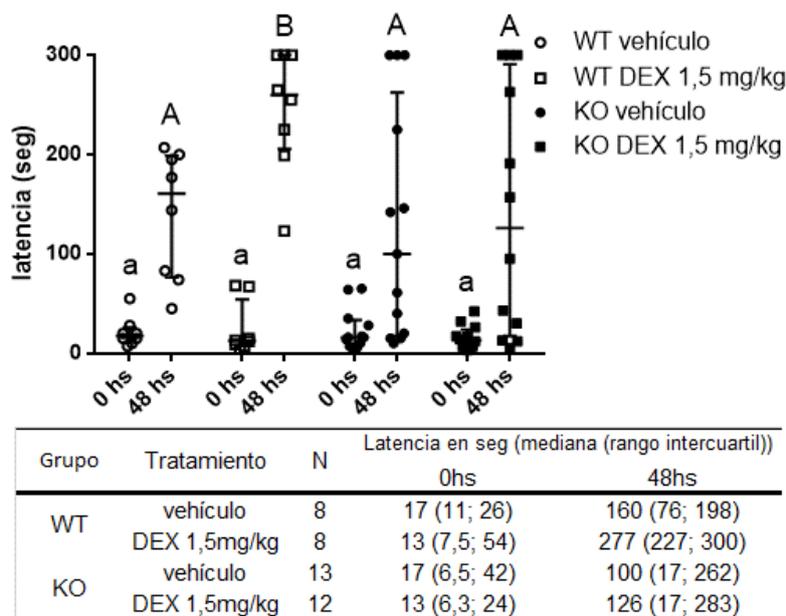


**Figura 3.6:** Respuesta de evitamiento inhibitorio de los ratones CD1 KO para el receptor CB1 al entrenarlos con un shock eléctrico de 0,35 mA. Se trabajó con dos grupos experimentales, un grupo de ratones WT y un grupo de ratones KO. Los animales se entrenaron en la prueba de evitamiento inhibitorio aplicando un shock eléctrico de 0,35 mA y a las 48 hs se evaluó la retención. En el gráfico figuran las latencias medidas durante las sesiones de entrenamiento (0 hs) y de evaluación (48 hs). Los datos se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico de Mann Whitney. Se compararon las latencias entre grupos experimentales dentro de cada sesión (estadística de latencias 0 hs indicada con letras en minúscula, estadística de latencias 48hs indicada con letras en mayúscula). Cada punto corresponde a la respuesta medida para un animal y se grafica la mediana y el rango intercuartil.

### 3.1.5. Estudio del efecto de la dexametasona sobre la respuesta de evitamiento inhibitorio en animales KO para el receptor CB1

La magnitud de la respuesta de evitamiento inhibitorio puede depender del grado de aversión del estímulo incondicionado. Para disminuir las latencias de retención (48 hs)

de los ratones KO, con el propósito de evaluar un incremento en esta variable ante el tratamiento con DEX 1,5 mg/kg, disminuimos el amperaje del shock eléctrico utilizado durante el entrenamiento. En este ensayo trabajamos con cuatro grupos experimentales. Ratones WT y KO recibieron un shock de menor intensidad (0,2 mA) durante el entrenamiento. Inmediatamente después, se trataron vía *i.p.* con una dosis óptima de DEX (1,5 mg/kg) o vehículo. A las 48 hs se evaluó la retención en los animales. De esta manera, investigamos si la expresión del CB1 es necesaria para que la dexametasona aumente la respuesta de evitamiento inhibitorio. Las latencias para ingresar al compartimento oscuro el día del entrenamiento no difirieron significativamente entre grupos ( $H=1,573$ ;  $P=0,6656$ ). Al comparar las latencias medidas en la sesión de evaluación (48 hs), el análisis de la varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis mostró un efecto general significativo entre los grupos experimentales ( $H=8,454$ ;  $P=0,0375$ ). A partir de las comparaciones a posteriori no se encontraron diferencias significativas entre las latencias de retención de los animales WT y KO tratados con vehículo ( $P=0,5611$ ). El grupo de animales WT tratado con dexametasona mostró un incremento significativo en la latencia de retención con respecto a los animales WT tratados con vehículo ( $P=0,0433$ ). Este efecto no se observó en los animales KO, en donde las latencias de retención para los grupos experimentales KO vehículo y KO DEX no mostraron diferencias significativas ( $P=0,6417$ ) (Fig. 3.7) Estos resultados sugieren que el efecto facilitador de la dexametasona sobre la formación y expresión de memorias asociativas evaluadas en la prueba de evitamiento inhibitorio requeriría la expresión del receptor CB1.



**Figura 3.7:** Respuesta de evitamiento inhibitorio de ratones KO para el receptor CB1 tratados con dexametasona. Se trabajó con cuatro grupos experimentales, animales WT y KO para el receptor CB1 se entrenaron en el aparato de evitamiento inhibitorio con un shock eléctrico de 0,2 mA. Luego del entrenamiento se les administró DEX 1,5 mg/kg o vehículo y a las 48 hs se evaluó la retención. En el gráfico figuran las latencias medidas durante las sesiones de entrenamiento

(0 hs) y de evaluación (48 hs). Los datos se analizaron estadísticamente con el análisis de la varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por el test a posteriori de Dunn. Se compararon las latencias entre grupos experimentales dentro de cada sesión (estadística de latencias 0 hs indicada con letras en minúscula, estadística de latencias 48 hs indicada con letras en mayúscula). Cada punto corresponde a la respuesta medida para un animal y se grafica la mediana y el rango intercuartil.

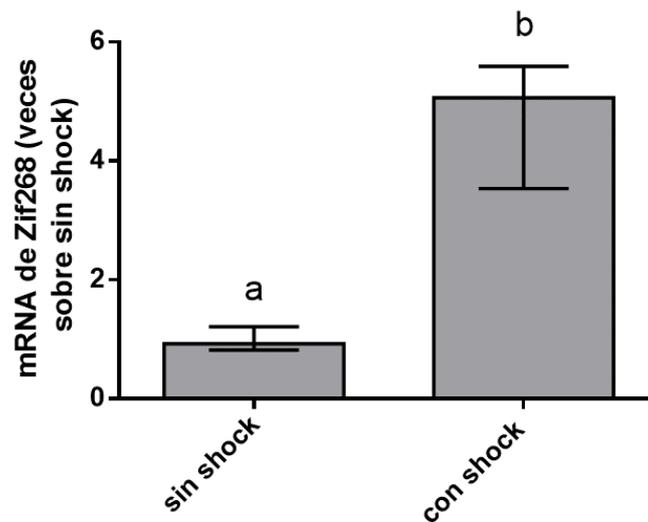
El análisis global de las respuestas de evitamiento inhibitorio reportadas en este trabajo sugiere la existencia de una interacción entre el sistema endocannabinoide y el receptor de glucocorticoides sobre la formación de memorias asociativas entre un contexto y un estímulo aversivo. Conocer con detalle las distintas vías de señalización, los intermediarios moleculares y los puntos de interacción implicados y cómo esto podría traducirse en un cambio conductual resulta esencial para comprender los mecanismos que subyacen el establecimiento de memorias. En consecuencia, decidimos estudiar en el hipocampo de ratones CD1 posibles mecanismos moleculares que podrían encontrarse implicados en estos procesos, analizando la modulación de vías de señalización que han sido previamente descritas para los efectos de los glucocorticoides sobre la consolidación de la memoria. Las determinaciones se llevaron a cabo en el hipocampo porque es un área del SNC implicada tanto en la consolidación como en la recuperación de la memoria en la prueba de evitamiento inhibitorio [15], en la que tanto el receptor CB1 [111] como el GR [147] presentan altos niveles de expresión.

### **3.2. RESPUESTA CRUZADA ENTRE LOS RECEPTORES CB1 Y GR SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN DE ZIF268 EN EL HIPOCAMPO DE RATONES CD1**

Se ha propuesto que los glucocorticoides, actuando a través de mecanismos rápidos no genómicos, alteran la liberación de diversos neurotransmisores responsables de los cambios sinápticos necesarios para la consolidación de la memoria. Estos mecanismos se encontrarían mediados por la producción de endocannabinoides y su señalización retrógrada en las sinapsis neuronales. Por otro lado, también se ha propuesto que los GCs podrían actuar a través de la inducción de IEGs (genes de expresión inmediata temprana), tales como Zif268, un factor de transcripción necesario para la consolidación de la memoria [21, 42, 43]. Hasta el momento no ha sido caracterizado el rol del sistema endocannabinoide sobre dicho mecanismo. Es por ello que decidimos estudiar el rol de la señalización del SEC a través de su receptor CB1 sobre la inducción de Zif268 dependiente del GR en el hipocampo murino.

### 3.2.1. Efecto del entrenamiento en la prueba de evitamiento inhibitorio sobre los niveles de mRNA de Zif268 en el hipocampo de ratones CD1

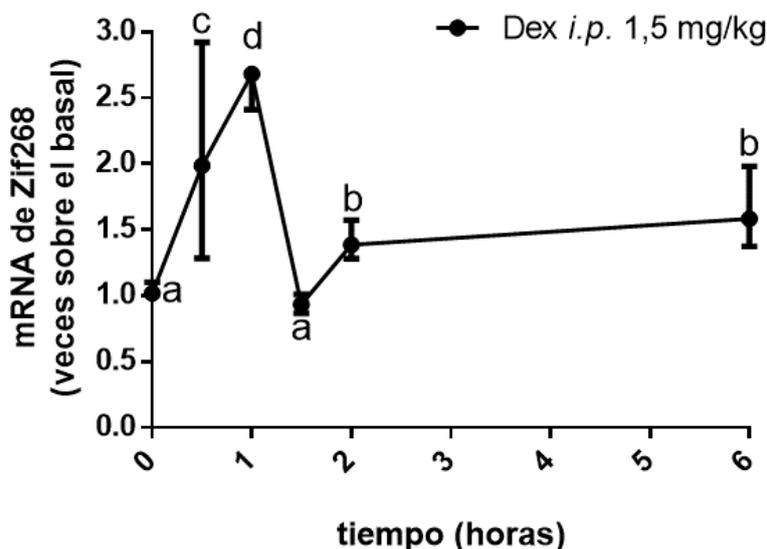
Si bien se ha demostrado que Zif268 presenta un rol crítico en la formación de memorias a largo plazo en la prueba de evitamiento inhibitorio [4], decidimos confirmar el aumento de sus niveles de mRNA en el hipocampo luego de la sesión de entrenamiento en nuestro modelo animal. Para este ensayo trabajamos con dos grupos experimentales. Durante la sesión de entrenamiento, un grupo experimental recibió un shock eléctrico de 0,2 mA al ingresar al compartimento oscuro (con shock), mientras que el segundo grupo no recibió shock eléctrico (sin shock). Luego del entrenamiento, los animales se devolvieron a sus jaulas, a los 30 min se sacrificaron por dislocación cervical y se les removió quirúrgicamente el hipocampo. Se cuantificó por PCR en tiempo real los niveles de mRNA. El protocolo detallado se encuentra en la sección de materiales y métodos. El grupo de animales que recibió shock eléctrico luego del entrenamiento presentó niveles de mRNA de Zif268 significativamente mayores que el grupo sin tratar ( $U=0,0$ ;  $P=0,0286$ ) (Fig. 3.8). Estos resultados sugieren que el entrenamiento de evitamiento inhibitorio aumentaría la transcripción de Zif268 en nuestro modelo animal.



**Figura 3.8:** Niveles de Zif268 en el hipocampo de ratones CD1 WT entrenados en la prueba de evitamiento inhibitorio con o sin shock eléctrico. En la sesión de entrenamiento, al ingresar al compartimento oscuro, un grupo recibió un shock eléctrico de 0,35 mA (con shock; N=4) y otro grupo no fue tratado (sin shock; N=4). Luego todos los animales fueron devueltos a sus jaulas y a los 30 minutos se sacrificaron por dislocación cervical y se les removió quirúrgicamente el hipocampo. Los datos se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico de Mann Whitney. Se grafica la mediana y el rango intercuartil. Cada animal se midió por triplicado y el promedio de esos valores se utilizó para el análisis estadístico.

### 3.2.2. Efecto de la dexametasona sobre los niveles de mRNA de Zif268 en el hipocampo de ratones CD1 WT

Habiendo confirmado la inducción del mRNA de Zif268 en el hipocampo de ratones CD1 WT ante el entrenamiento en la prueba de evitamiento inhibitorio, decidimos estudiar en este tejido la interacción entre el sistema glucocorticoide y endocannabinoide sobre la regulación de la transcripción de Zif268. En primera instancia, caracterizamos el efecto de la dexametasona sobre este proceso. Ratones macho WT de 2 meses de edad recibieron una inyección *i.p.* de 100  $\mu$ l de DEX (1,5 mg/kg) o de vehículo (SF). A distintos tiempos, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se les removió quirúrgicamente el hipocampo. Al comparar los niveles de mRNA de Zif268 cuantificados por PCR en tiempo real, en análisis de la varianza no paramétrico de Kruskal Wallis mostró un efecto general significativo entre los grupos experimentales ( $H=31,39$ ,  $P<0,0001$ ). El tratamiento con DEX aumentó los niveles de mRNA de Zif268 de manera significativa a partir de los 30 minutos de la inyección ( $P=0,042$ ), alcanzando un valor máximo a la hora ( $P<0,0001$ ) y bajando a los niveles basales a los 90 minutos ( $P=0,6214$ ). Una segunda inducción se observó a las 6 horas de tratamiento ( $P=0,0385$ ) (Fig. 3.9). Estos resultados sugieren que la dexametasona aumenta la transcripción del gen que codifica para Zif268 en el hipocampo murino.

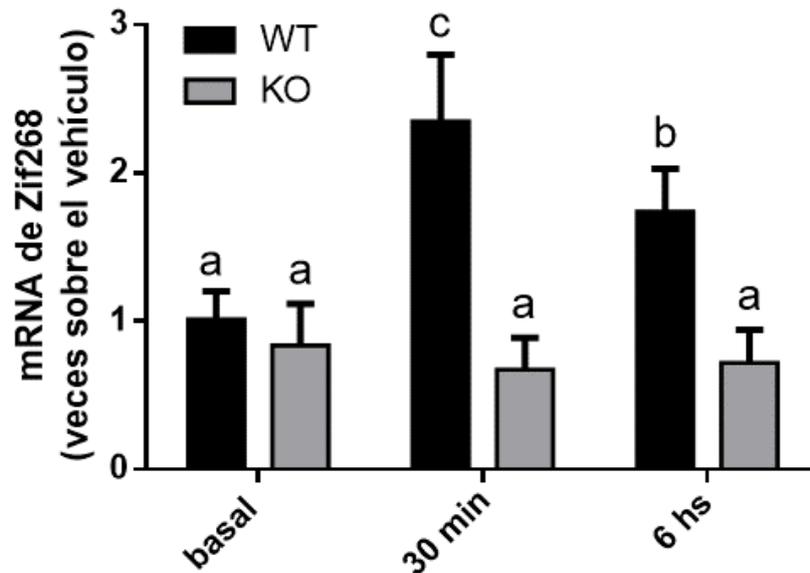


**Figura 3.9:** Niveles del mRNA de Zif268 en el hipocampo de ratones CD1 WT ante el tratamiento con dexametasona. Los animales se trataron vía *i.p.* con DEX 1,5 mg/kg o vehículo y se sacrificaron por dislocación cervical a distintos tiempos. Se muestran los niveles de mRNA de Zif268 en el hipocampo cuantificados por PCR en tiempo real. Los resultados se analizaron estadísticamente con el análisis de la varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por el test a posteriori de Dunn. Los datos se compararon con respecto al basal (0 hs) Se grafica la mediana y el rango intercuartil y cada punto refiere a por lo menos 3 animales medidos cada uno por triplicado.

Frente a este resultado resulta interesante mencionar que una cinética similar se ha observado para la expresión de Zif268 ante el entrenamiento de ratas en la prueba de evitamiento inhibitorio. La primera ola de inducción (detectada a las 3 hs post-entrenamiento) participaría en la formación de la memoria a largo plazo, mientras que la segunda (detectada entre las 12 y las 24 hs post-entrenamiento) se encontraría involucrada específicamente en el mantenimiento de la memoria [4].

### **3.2.3. Efecto de la dexametasona sobre los niveles de mRNA de Zif268 en el hipocampo de ratones CD1 KO**

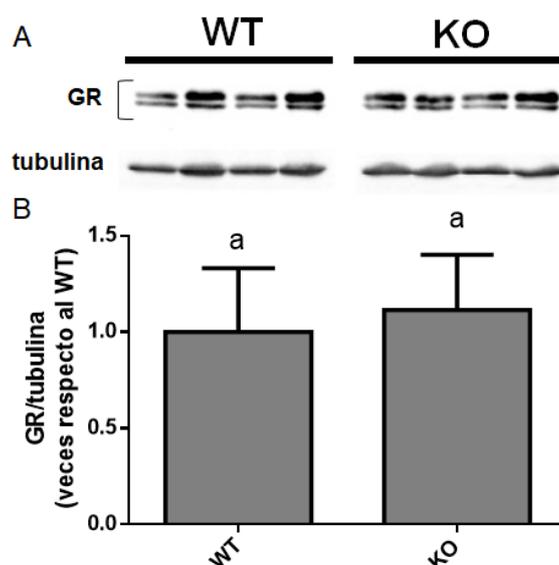
Habiendo descrito que la expresión del receptor CB1 sería necesaria para que la dexametasona aumente la respuesta de evitamiento inhibitorio y teniendo en cuenta que se postula al sistema endocannabinoide como mediador de los efectos rápidos del GR [84, 134, 136], decimos evaluar si la expresión del CB1 también es requerida para que la dexametasona induzca la transcripción de Zif268 en el hipocampo murino. Con dicha finalidad comparamos el efecto de la dexametasona sobre los niveles de mRNA de Zif268 en ratones KO para el receptor CB1 con respecto al fenotipo salvaje (WT). En este experimento ratones WT y KO se trataron por vía *i.p.* con DEX 1,5 mg/kg o vehículo y se sacrificaron por dislocación cervical a la media hora o a las 6 horas. Un grupo de individuos se sacrificó sin recibir tratamiento para cuantificar los niveles basales del mensajero (0 hs). Al comparar los niveles de mRNA de Zif268 entre todos los grupos experimentales realizando un ANOVA de dos factores se observó una interacción significativa entre la administración de dexametasona y el genotipo ( $F_{(2, 31)}=17,29$ ;  $P<0,0001$ ). Tras 30 minutos y 6 horas de tratamiento con DEX 1,5 mg/kg *i.p.* no se observó ningún incremento significativo en los niveles de mRNA de Zif268 en estos animales (Fig.3.10). La falta de efecto de la dexametasona en los ratones KO sugiere que el receptor CB1 participa de la modulación del GR sobre la transcripción de Zif268 en el hipocampo murino.



**Figura 3.10:** Niveles de mRNA de Zif268 en el hipocampo de ratones WT y KO para el receptor CB1 tratados con DEX. Los animales se trataron por vía i.p. con DEX 1,5 mg/kg o vehículo y se sacrificaron por dislocación cervical a distintos tiempos. Se midieron los niveles de mRNA de Zif268 en el hipocampo por PCR en tiempo real. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de dos factores (efecto de Dex-expresión del CB1) y con el test a posteriori de Tukey. Se grafica la media  $\pm$  SD, que corresponde al valor promedio de por lo menos 4 animales medidos cada uno por triplicado.

#### 3.2.4. Expresión basal del GR en ratones CD1 WT y KO para el receptor CB1

Dado que la pérdida de la capacidad de la dexametasona para aumentar los niveles de mRNA de Zif268 y la respuesta de evitamiento inhibitorio en los ratones KO para el receptor CB1 podría deberse a una modificación en la expresión del GR, decidimos comparar los niveles de expresión de este receptor en el hipocampo murino de ambos genotipos. Para este experimento, animales WT y KO para el CB1 en condiciones basales se sacrificaron por dislocación cervical y se les removió quirúrgicamente el hipocampo. Los tejidos se procesaron para medir expresión proteica por WB. En condiciones basales, no se observaron diferencias significativas en la expresión del GR entre los ratones WT y KO ( $t_{(6)}=0,6193$ ), sugiriendo que la disrupción del efecto de la dexametasona ocurre a través de un mecanismo que no involucra cambios en la expresión basal del GR (Fig. 3.11).



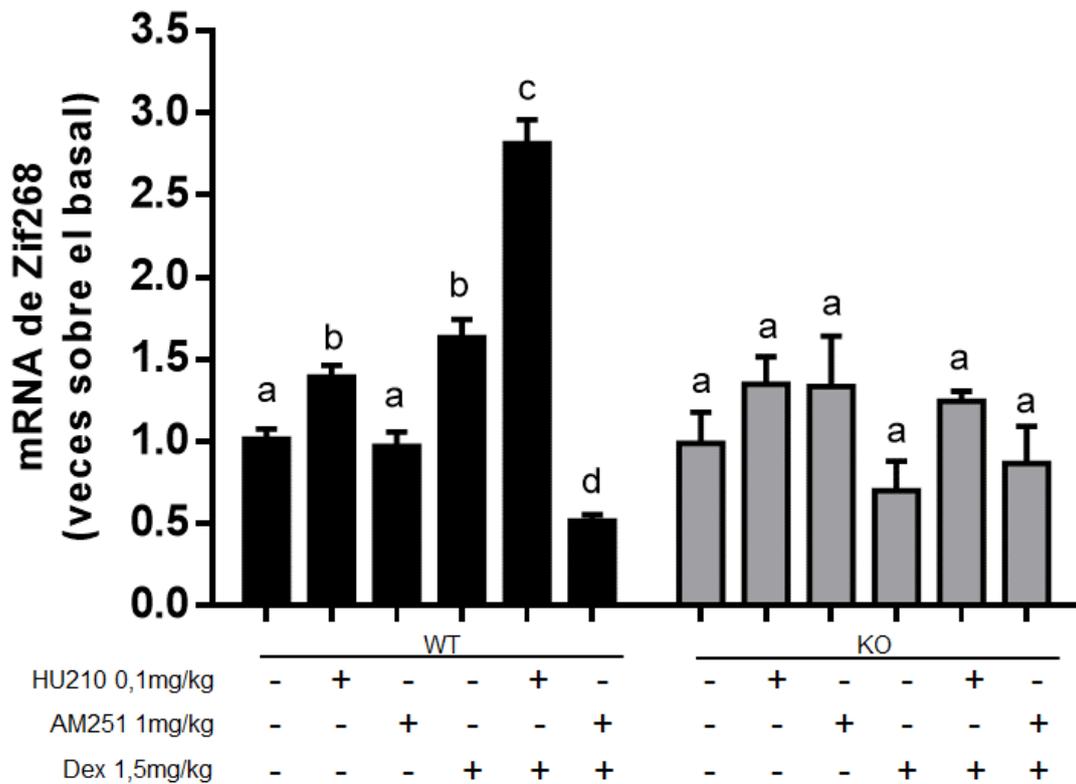
**Figura 3.11:** Niveles de expresión del GR en el hipocampo de ratones CD1 WT y KO para el receptor CB1. Ratones WT y KO en condiciones basales se sacrificaron por dislocación cervical y se les removió quirúrgicamente el hipocampo. **A)** Western Blot para el GR y tubulina. Cada calle corresponde a un animal distinto. **B)** Densitometría del Western Blot del GR relativizado a tubulina. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test de Student. Se grafica la media  $\pm$  SD, que corresponde al valor promedio de 4 animales corridos cada uno por duplicado.

### 3.2.5. Modulación del efecto de la dexametasona sobre los niveles de Zif268 por parte de ligandos del receptor CB1

Como se mencionó anteriormente, Zif268 es un gen de expresión inmediata temprana o IEG, cuya transcripción es rápidamente activada, y se encuentra asociada al proceso de consolidación de la memoria [42-44]. Sin embargo, también se ha demostrado que una inducción más tardía de su expresión sería la responsable sus efectos sobre el mantenimiento de la memoria a largo término [4]. Las dos olas de inducción también se observan en nuestros ensayos a nivel del mensajero de Zif268 en el hipocampo de los ratones CD1 WT tratados por distintos tiempos con DEX 1,5 mg/kg.

En este experimento, animales WT o KO se pretrataron por 2 hs con un agonista del CB1, HU210 (0,1 mg/kg), con el agonista inverso AM251 (1 mg/kg) o con vehículo. Luego, se les inyectó DEX 1,5 mg/kg *i.p.* o vehículo y 6 hs después se los sacrificó por dislocación cervical. Inmediatamente después se les removió quirúrgicamente el hipocampo. Al comparar los niveles de mRNA de Zif268 entre todos los grupos experimentales realizando un ANOVA de dos factores se observó una interacción significativa entre los tratamientos y el genotipo ( $F_{(5, 80)}=30,90$ ;  $P<0,0001$ ) (Fig 3.12). A partir de las comparaciones a posteriori en los animales WT se observó que el tratamiento con HU210 *per se* no aumenta de manera significativa los niveles de Zif268 con respecto al vehículo, pero al ser cotratado con la dexametasona incrementa el efecto de este glucocorticoide. El tratamiento con el agonista inverso AM251 tampoco

modificó de manera significativa los niveles del mensajero con respecto al vehículo, pero al ser cotratado con dexametasona revirtió el efecto del glucocorticoide, generando valores menores a los del vehículo (Fig 3.12). Estos resultados sugieren que si bien los ligandos cannabinoides no presentarían un efecto *per se* sobre la transcripción de Zif268 en el hipocampo a las 8 horas de tratamiento, el HU210 potenciaría el efecto de la dexametasona sobre la segunda ola de inducción del mensajero mientras que el agonista inverso del CB1 AM251 bloquearía por completo el efecto de este glucocorticoide. Estos procesos se encontrarían mediados por la señalización de los ligandos cannabinoides sobre el CB1 exclusivamente, ya que la modulación se pierde en los animales KO para el CB1.



**Figura 3.12:** Niveles de mRNA de Zif268 en el hipocampo de ratones CD1 WT y KO para el receptor CB1 tratados con ligandos cannabinoides del CB1 y dexametasona. Ratones WT o KO para el CB1 se pretrataron vía *i.p.* con HU210 0,1 mg/kg, AM251 1 mg/kg o vehículo. A las 2 horas, se les administró vía *i.p.* DEX 1,5 mg/kg o vehículo y 6 horas después se sacrificaron por dislocación cervical. Se midieron los niveles de mRNA de Zif268 en el hipocampo por PCR en tiempo real. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de dos factores (tratamientos-expresión del CB1) y con el test a posteriori de Tukey, comparando los datos para cada fenotipo. Se grafica la media +/- SD, que corresponde al valor promedio de por lo menos 4 animales medidos cada uno por triplicado.

En conclusión, nuestros resultados muestran que el tratamiento con dexametasona 1,5 mg/kg *i.p.* aumenta los niveles de mRNA de Zif268 en el hipocampo de ratones CD1 WT. Esta inducción presentaría por lo menos dos olas, una rápida con un pico a la hora de tratamiento y otra más lenta detectada a las 6 horas post-inyección. La expresión del

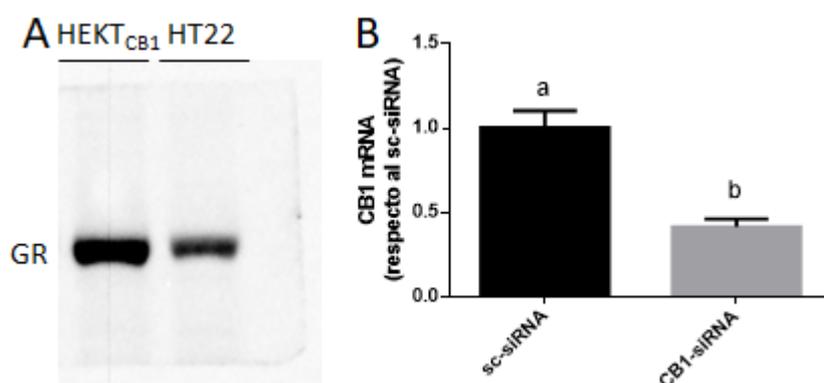
CB1 sería necesaria para la inducción de ambas olas y la interrupción del efecto de la dexametasona ocurriría a través de un mecanismo que no involucra cambios en la expresión basal del GR. El agonista del CB1 HU210, actuando a través del CB1, incrementa el efecto de la dexametasona sobre la segunda ola de inducción, mientras que el agonista inverso del CB1 AM251 revierte el efecto de este glucocorticoide. Habiendo descrito una interacción entre el sistema endocannabinoide y glucocorticoide tanto a nivel de la formación de memorias asociativas como a nivel molecular, sobre los niveles de mRNA de Zif268 en el hipocampo murino, decidimos continuar con el estudio de la respuesta cruzada entre ambos sistemas en la línea celular HT22, con la finalidad de ahondar en los mecanismos moleculares que podrían participar en este proceso.

### **3.3. RESPUESTA CRUZADA ENTRE LOS RECEPTORES CB1 Y GR SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN DE ZIF268 EN LA LÍNEA CELULAR HT22**

#### **3.3.1. Caracterización de los sistemas glucocorticoide y endocannabinoide endógenos de las HT22**

El uso de líneas celulares ofrece ciertas ventajas a la hora de estudiar mecanismos moleculares con respecto a los modelos *in vivo* y a los cultivos primarios [148]. El hecho de poder controlar más fácilmente el ambiente en el que se encuentran inmersas las células y de contar con un único tipo celular suele aumentar la reproducibilidad de los resultados. Por su parte, las líneas celulares son fáciles de manipular y de crecer si se cuenta con las instalaciones necesarias [149]. Sin embargo, es importante conocer las limitaciones de trabajar con un modelo celular, ya que las respuestas y los mecanismos descritos no pueden ser directamente extrapolados al modelo animal, sino que previamente deben ser confirmados en esos sistemas. Debido a esto, es fundamental seleccionar un modelo *in vitro* que muestre cierto grado de similitud con el modelo *in vivo*. En particular, la línea celular HT22 derivada de hipocampo murino es fácil de cultivar y de amplificar ya que las células cumplen un ciclo de duplicación cada 24 hs. Ha sido descrito que esta línea celular expresa tanto el receptor CB1 como el GR [150, 151] y que la estimulación de estas células con un pulso electromagnético aumenta el contenido de los endocannabinoides anandamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG) [152] en el cultivo celular. Esta característica resulta sumamente interesante ya que se postula que los GC aumentan el contenido de endocannabinoides en la sinapsis neuronal y que, a través de este mecanismo, el SEC mediaría los efectos de los GC sobre la consolidación de la memoria [140]. En base a las características que presenta este modelo celular lo seleccionamos para continuar con el estudio de la respuesta cruzada entre los receptores CB1 y GR sobre la transcripción de Zif268 y ahondar en los mecanismos moleculares que subyacen este proceso.

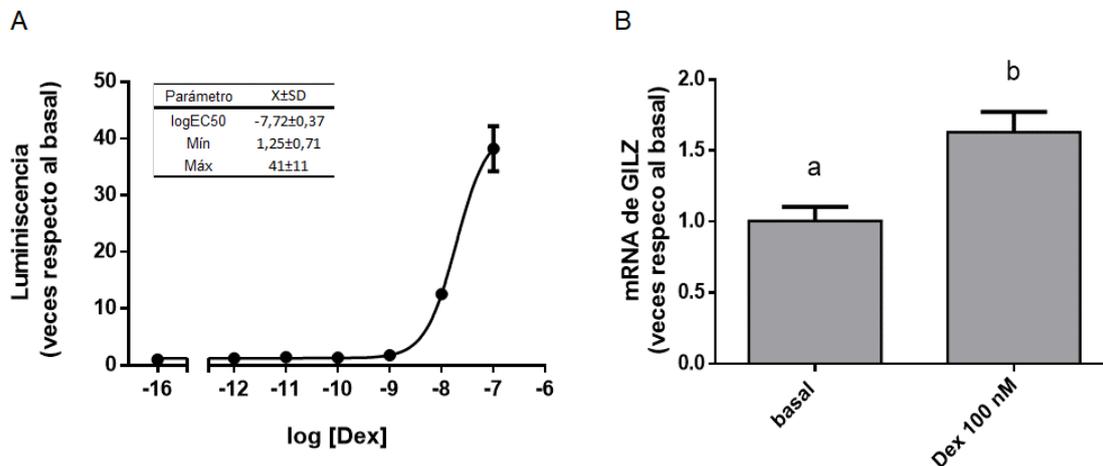
La primera actividad consistió en la confirmación de la expresión de los receptores CB1 y GR en esta línea celular. La expresión del GR se confirmó mediante WB, utilizando como control positivo células HEK293T transfectadas con un plásmido que codifica para el GR (Fig. 3.13A). La presencia del receptor CB1 se corroboró por PCR en tiempo real, evaluando el efecto de la transfección con un RNA de interferencia específico contra el receptor CB1 sobre el  $C_t$  del amplicón correspondiente al cDNA de este receptor. Para ello, células HT22 cultivadas por 24 hs en placas de 12 pocillos se transfectaron con una secuencia inespecífica (sc-siRNA) o con un RNA de interferencia contra el mensajero del CB1 (CB1-siRNA) y se cuantificaron por PCR en tiempo real los niveles de mRNA del CB1 como se describe en materiales y métodos. El RNA de interferencia específico contra el CB1 disminuyó un 50% los niveles del mensajero de este receptor (Fig 3.13B), confirmando que el mRNA detectado con esta técnica corresponde al receptor CB1.



**Figura 3.13:** Determinación de la expresión del GR y de la presencia del mRNA del receptor CB1 en la línea celular HT22. **A)** Células HEK293T cultivadas en placas de 12 pocillos se transfectaron con un plásmido que codifica para el GR. A las 48 hs se les aspiró el medio de cultivo y se obtuvieron extractos proteicos. En paralelo, células HT22 se cultivaron por 48hs en placas de 12 pocillos pero sin transfectar y se obtuvieron sus extractos proteicos. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 12% y se determinaron los niveles de expresión del GR mediante la técnica de western blot como se describe en materiales y métodos. **B)** Células HT22 cultivadas en placas de 12 pocillos se transfectaron con sc-siRNA o CB1-siRNA. A las 48 hs se les aspiró el medio y se resuspendieron en Quick-Zol. Los niveles de mRNA correspondientes al CB1 se cuantificaron mediante PCR en tiempo real. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test de Student y representan la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes realizados por triplicado (PCR).

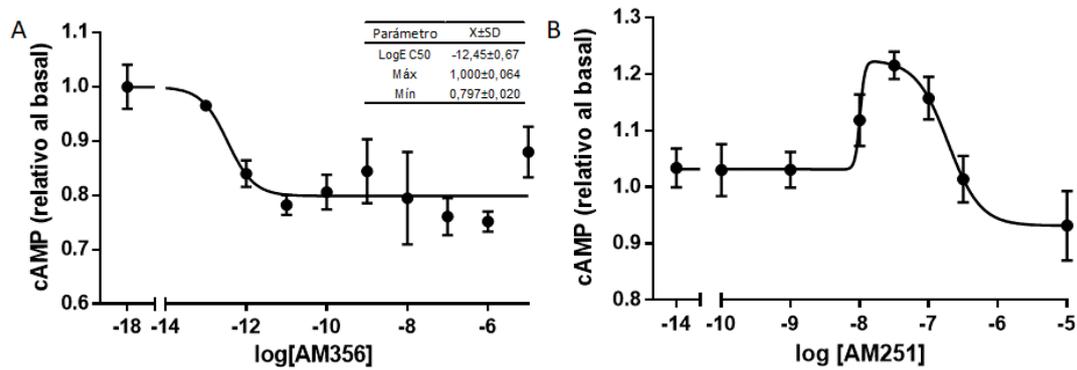
Con el fin de evaluar la funcionalidad del GR endógeno, células HT22 se transfectaron con un sistema gen-reportero TAT3-Luc que codifica para la enzima luciferasa bajo el control de un promotor regulado por el GR. Tras 24 hs de tratamiento con dexametasona, se observó un incremento en la actividad de la luciferasa dependiente de la concentración de la droga (Fig 3.14A). La actividad genómica del GR endógeno

fue confirmada estudiando su capacidad para inducir la transcripción del gen que codifica para GILZ (glucocorticoid induced leucine zipper gen), clásicamente transactivado por el GR [53]. A través de ensayos de PCR en tiempo real, medimos los niveles de mRNA de GILZ tras el tratamiento con dexametasona, observándose un incremento significativo de sus niveles a las 6 hs de tratamiento (Fig 3.14B).



**Figura 3.14:** Actividad transcripcional del GR endógeno de la línea celular HT22 evaluada sobre el sistema gen-reportero TAT3-Luc **(A)** o sobre los niveles de mRNA de GILZ, un gen clásicamente regulado por el GR **(B)**. Los resultados de B se analizaron estadísticamente con el test de Student. Los resultados representan la media +/- SD de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

Como se expuso anteriormente, el CB1 es un GPCR que al activarse se acopla a la subunidad  $G\alpha_{i/o}$  e induce una disminución en los niveles de AMPc intracelulares. Para evaluar la señalización del CB1 en nuestro sistema, estudiamos el efecto del tratamiento con su agonista AM356 o con su agonista inverso AM251 sobre la producción de AMPc. Como era de esperar, al incubar por 20 minutos células HT22 con concentraciones crecientes de AM356, se observó una disminución en los niveles de AMPc dependiente de la concentración (Fig 3.15A). Por su parte, el agonista inverso AM251 muestra un comportamiento atípico. Bajas concentraciones de este ligando aumentan los niveles de AMPc, como es de esperar, pero concentraciones entre 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M bajan los niveles de AMPc a valores basales generando una respuesta con forma de campana (Fig 3.15B).



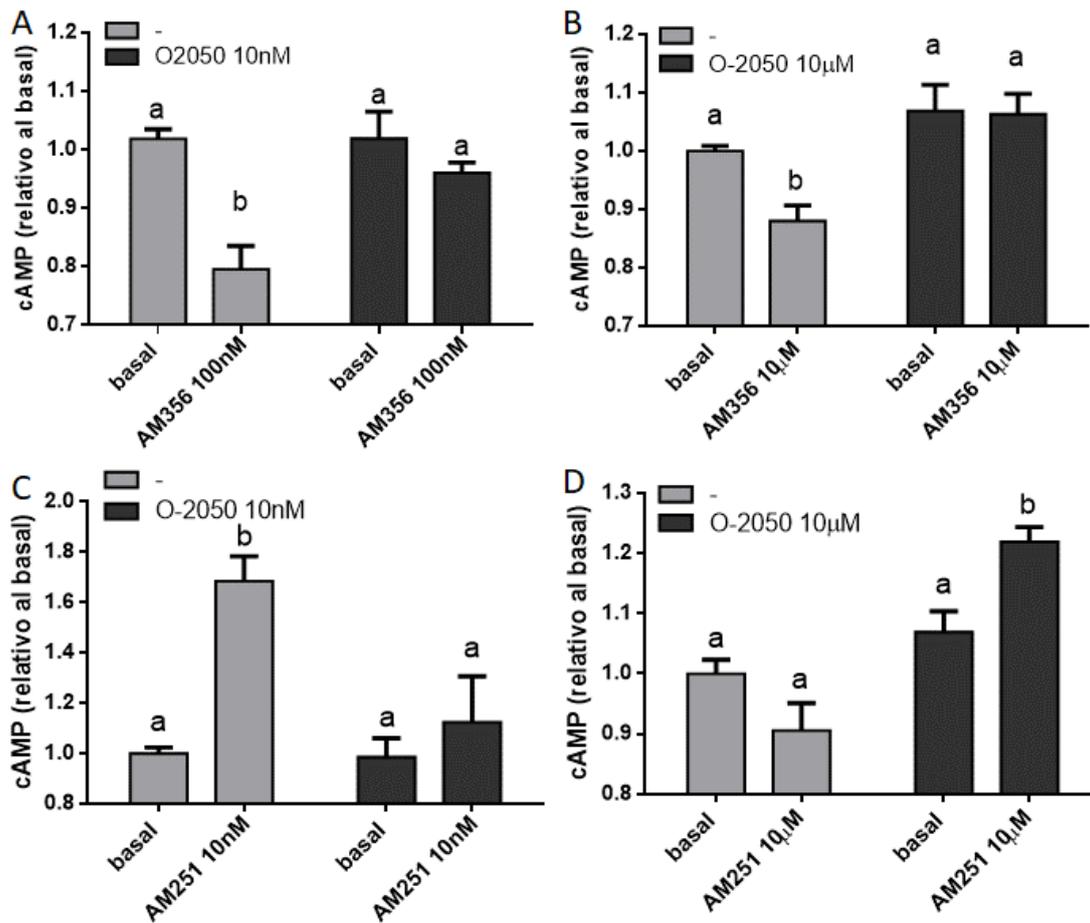
**Figura 3.15:** Modulación de los niveles de AMPc frente al tratamiento con ligandos del CB1 en HT22. Células HT22 se trataron con concentraciones crecientes del agonista CB1 AM356 por 20 minutos (**A**) o del agonista inverso del CB1 AM251 por 10 minutos (**B**). Los niveles de AMPc se graficaron relativizados con respecto al basal y se ajustaron mediante regresiones no lineales. Los resultados representan la media  $\pm$ SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Este comportamiento atípico puede ser explicado de distintas maneras. Una posibilidad es que a bajas concentraciones (10-100 nM) prime el efecto del AM251 como agonista inverso del CB1 disminuyendo la actividad basal de dicho receptor y que, a concentraciones mayores, la disminución en los niveles de AMPc se deba a la unión de este ligando a otro receptor capaz de modular el AMPc. Otra explicación posible para el comportamiento encontrado sería que, a altas concentraciones, el AM251 aumente el contenido algún endocannabinoide a través de la modulación del metabolismo de estos compuestos. De esta manera la respuesta cuantificada resultaría de la competencia entre este endocannabinoide, agonista del CB1, y el AM251, agonista inverso, por la unión al receptor CB1.

Con el fin de evaluar si la respuesta originada por ambos ligandos sobre el AMPc se encuentra mediada por la señalización sobre el CB1, realizamos cotratamientos con su antagonista selectivo O-2050. En nuestro sistema, el O-2050 no modula los niveles de AMPc pero es capaz de bloquear el efecto del AM356 100 nM y 10  $\mu$ M, confirmando que a ambas concentraciones, el AM356 señala a través del CB1 (Fig 3.168A y B). El cotratamiento del O-2050 con el AM251 10 nM bloquea completamente el incremento de AMPc, indicando que la señalización a dicha concentración también ocurriría a través de la acción sobre el CB1 (Fig 3.16C). Más difícil de interpretar resulta la figura 3.16D, en la que se muestran los resultados obtenidos al evaluar el rol del CB1 sobre la respuesta del AM251 10  $\mu$ M. Esta concentración de AM251 no modula de manera significativa los niveles de AMPc, pero al cotratar con O-2050 la respuesta del AM251 aumenta de manera significativa.

Si la disminución en los niveles de AMPc frente al tratamiento con AM251 10  $\mu$ M con respecto a las concentraciones 10-100 nM fuera consecuencia de la señalización de este ligando sobre otro receptor, sería de esperar que esta disminución se exacerbara

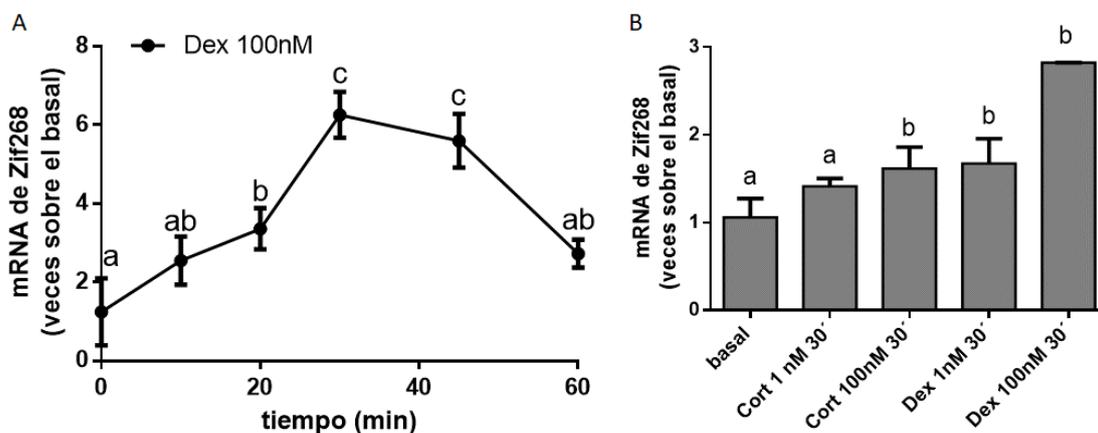
al bloquear el efecto del AM251 sobre el CB1. Por el contrario, al cotratarse con O-2050 la respuesta medida aumentó, generando valores similares a los obtenidos con concentraciones bajas de AM251. Este resultado sugiere que el ajuste con forma de campana de la curva concentración-respuesta de los niveles de AMPc ante el tratamiento con AM251 no involucraría la señalización del AM251 sobre otro receptor y podría deberse al aumento del contenido de algún endocannabinoide en el cultivo celular y que el O-2050 estaría compitiendo con estos ligandos por la unión al CB1. En esta sección informaremos otros resultados complementarios que brindan más evidencia para respaldar esta hipótesis.



**Figura 3.16:** Implicancia del CB1 en la modulación del AM356 y del AM251 sobre los niveles de AMPc. Células HT22 se pre-trataron por 5 min con O-2050 y luego por 20 min con AM356 100 nM (A) o 10 μM (B), o por 10 min con AM251 10 nM (C) o 10 μM (D). Los datos se analizaron estadísticamente con un ANOVA de dos factores (ligando CB1-O2050) seguidos por el test a posteriori de Tukey. Los resultados representan la media +/-SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

### 3.3.2. Efecto de los glucocorticoides sobre los niveles de mRNA de Zif268

Con el objetivo de evaluar el efecto de la activación del GR sobre la transcripción de Zif268 en la línea celular HT22, se cuantificaron los niveles de mRNA de dicho gen ante el tratamiento con dexametasona y con el agonista fisiológico del GR corticosterona (CORT). A partir de los 20 min de tratamiento con DEX 100 nM se observó un aumento significativo en los niveles de mRNA de Zif268. Esta inducción resultó máxima a los 30 min y volvió a sus niveles basales tras 60 min de estímulo (Fig 3.17A). El tratamiento con CORT 100 nM por 30 min también es capaz de aumentar los niveles de mRNA de Zif268, pero en menor medida que la DEX (Fig 3.17B). Estos resultados indican que tanto el agonista natural del GR corticosterona como el agonista sintético dexametasona son capaces de inducir un rápido incremento en los niveles de mRNA de Zif268.

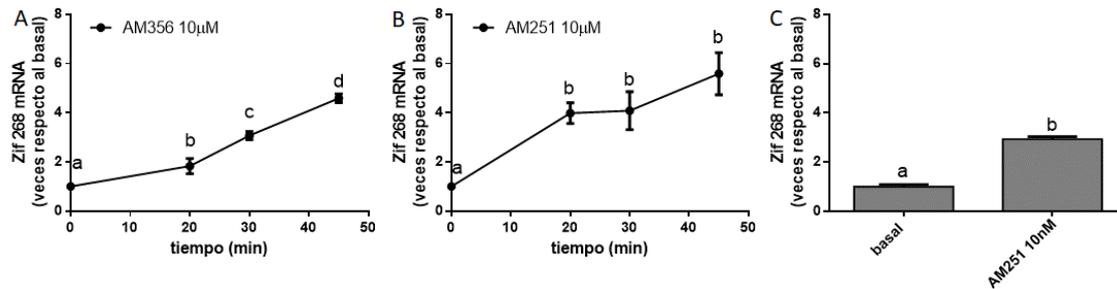


**Figura 3.17:** Efecto de los glucocorticoides sobre la transcripción de Zif268. Células HT22 cultivadas en placas de 12 pocillos se trataron por distintos tiempos con DEX 100nM (A) o con distintas concentraciones de DEX y CORT por 30 min (B). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test de ANOVA de un factor y con el test de Tukey comparando todos los tratamientos entre sí (A) o con el test de Dunnett, comparando cada tratamiento contra el basal (B). Los resultados representan la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

### 3.3.3. Efecto del agonista del CB1 AM356 y del agonista inverso AM251 sobre los niveles de mRNA de Zif268

Como se expuso anteriormente, la activación del SEC facilita la consolidación de la memoria, y la expresión de Zif268 se encontraría implicada y resultaría necesaria para este proceso. Por lo tanto, decidimos estudiar si la señalización del CB1 también es capaz de modular la transcripción de Zif268 incubando células HT22 a distintos tiempos con AM356 (Fig 3.18A) o con AM251 (Fig 3.18B y C). Para ambos ligandos se observó un incremento significativo en los niveles de Zif268 a partir de los 20 min de tratamiento.

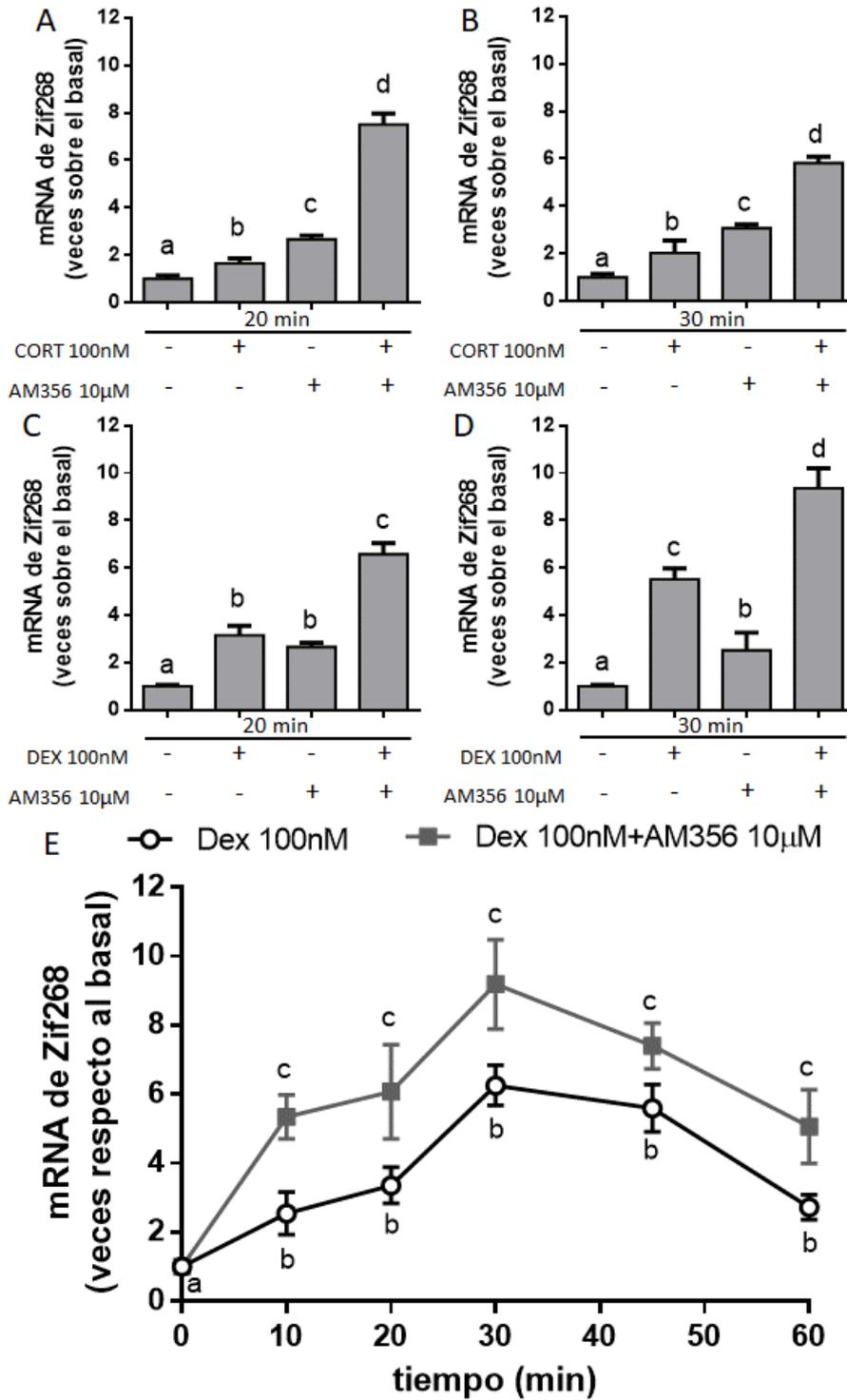
El AM251 es capaz de aumentar la transcripción tanto a una concentración 10 nM como a 10  $\mu$ M.



**Figura 3.18:** Efecto del AM356 y del AM251 sobre los niveles de mRNA de Zif268. Células HT22 cultivadas por 48 hs en wells de p12 se trataron por distintos tiempos con AM356 10  $\mu$ M (A), AM251 10  $\mu$ M (B) o por 20 min con AM251 10 nM (C). Los resultados se analizaron estadísticamente con un ANOVA de un factor y con el test a posteriori de Tukey comparando todos los tratamientos entre sí (A y B), o con el test de Student (C). Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

### 3.3.4. Estudio de la interacción entre el agonista del receptor CB1 AM356 y los GCs sobre los niveles de mRNA de Zif268

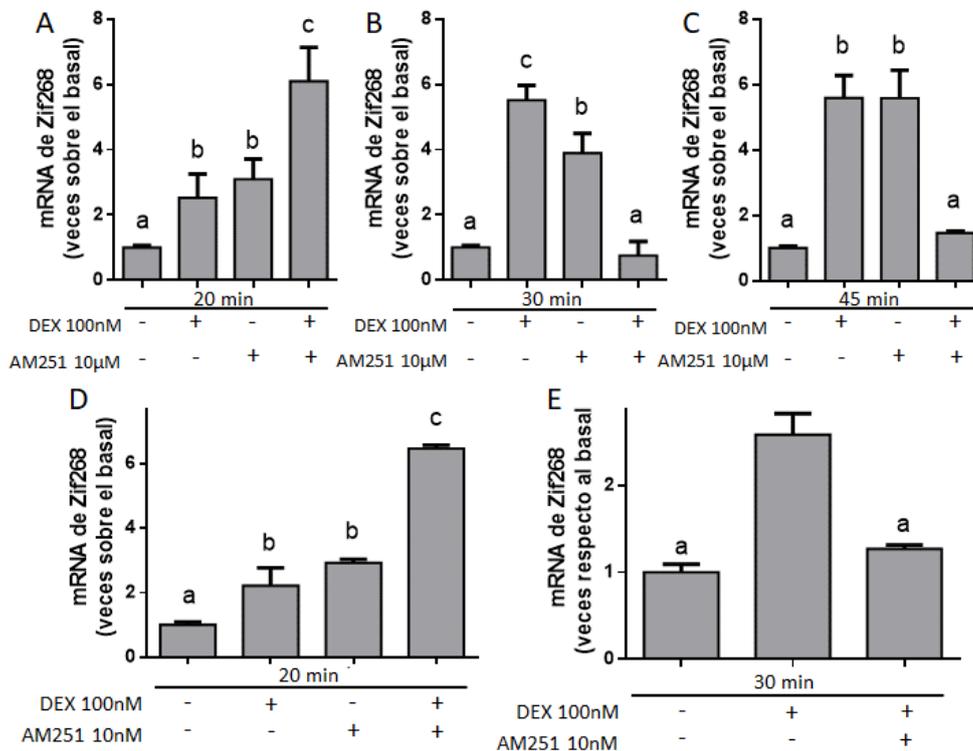
Habiendo caracterizado el efecto que presentan el sistema endocannabinoide y glucocorticoide sobre la modulación de los niveles de mRNA de Zif268, evaluamos la existencia de una interacción entre las señalizaciones de ambos sistemas sobre este proceso, al activarlos con sus agonistas clásicos. Para ello, medimos los niveles del mensajero de dicho gen frente a la activación del CB1 y del GR cotratando las células con AM356 10  $\mu$ M y CORT 100 nM o con AM356 10  $\mu$ M y DEX 100 nM. A los 20 y 30 min de tratamiento, cada ligando por separado indujo la transcripción de Zif268 y el cotratamiento potenció significativamente la respuesta. Este efecto se observó para los dos GCs utilizados (Fig 3.19A, B, C y D). El AM356 aumenta el efecto de la DEX por lo menos hasta la hora de tratamiento (Fig 3.19E).



**Figura 3.19:** Niveles de mRNA de Zif268 ante el cotratamiento con AM356 y GCs. Células HT22 cultivadas por 48 hs en placas de 12 pocillos se trataron con AM356 10 µM, CORT 100 nM (**A y B**), DEX 100 nM (**C, D y E**) o con combinaciones de estos ligandos por distintos tiempos. Los resultados se analizaron estadísticamente con un ANOVA de dos factores (Respuesta GC-AM356) y con el test a posteriori de Tukey comparando las respuestas entre tratamientos para cada tiempo por separado (A y B) y contra el basal. Los resultados representan la media +/- SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

**3.3.5. Estudio de la interacción entre el agonista inverso del receptor CB1 AM251 y dexametasona sobre los niveles de mRNA de Zif268**

Como mostramos en resultados de la sección anterior, el AM251 inhibiría el efecto de la dexametasona sobre la transcripción Zif268 en el hipocampo de ratones CD1 WT. En nuestro sistema *in vitro*, este ligando *per se* induciría la transcripción de dicho gen tanto a bajas como a altas concentraciones. Con el fin de evaluar su efecto sobre la respuesta de los GCs en las HT22, cotratamos las células con DEX 100 nM y AM251 (10  $\mu$ M o 10 nM) por distintos tiempos. A todos los tiempos evaluados, el tratamiento con los ligandos por separado aumentó los niveles de mRNA de Zif268, al igual que habíamos observado en ensayos anteriores. A los 20 minutos, el cotratamiento de DEX y AM251 10  $\mu$ M potenció la respuesta medida ( $F_{(1, 18)} = 5,261$ ;  $p = 0,0341$ ) (Fig. 3.20 A), pero a partir de los 30 minutos, se revirtió por completo el efecto, alcanzando el mensajero sus valores basales (Fig. 3.20 B y C). Los resultados obtenidos al cotratar las células con una concentración de AM251 10 nM mostraron el mismo patrón de respuesta, potenciando la transcripción a los 20 minutos ( $F_{(1, 9)} = 27,66$ ;  $p=0,0005$ ) (Fig. 3.20 D) e inhibiendo la respuesta a los 45 minutos de tratamiento (Fig. 3.20 E). El efecto del cotratamiento con AM251 y DEX sobre la transcripción de *Zif268* presentaría dos etapas: una primera etapa potenciadora a los 20 min de tratamiento, seguida por una segunda etapa inhibitoria en la que se alcanzarían niveles de mRNA similares los basales.

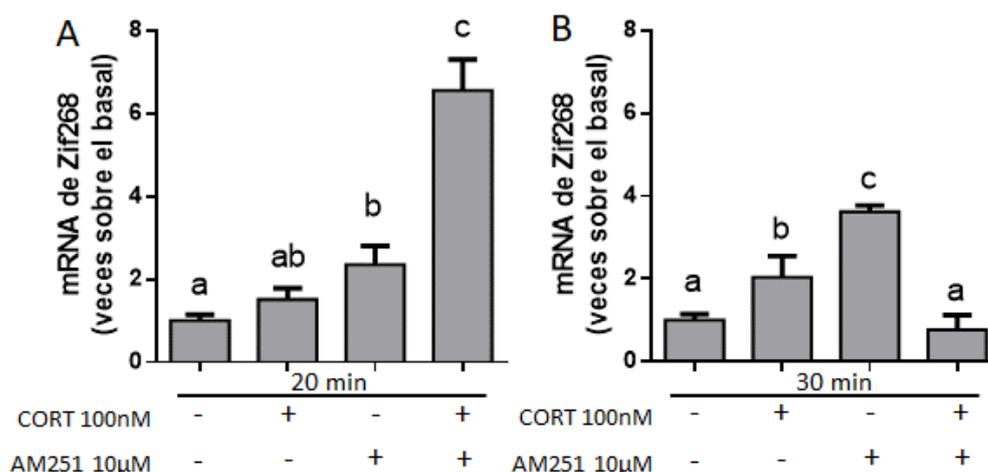


**Figura 3.20:** Niveles de mRNA de Zif268 ante el cotratamiento con AM251 y dexametasona. Células HT22 cultivadas por 48 hs en wells de p12 se trataron con AM251 10  $\mu$ M (**A, B y C**), AM251 10 nM (**D y E**), DEX 100 nM o con combinaciones de estos ligandos por distintos tiempos. Los resultados se analizaron estadísticamente con un ANOVA de dos factores (Rta GC-AM251) y con el test a posteriori de Tukey comparando las respuestas entre tratamientos para cada

tiempo por separado. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

### 3.3.6. Estudio de la interacción entre el agonista inverso del receptor CB1 AM251 y corticosterona sobre los niveles de mRNA de Zif268

Con el fin de evaluar si la interacción descrita entre el AM251 y la dexametasona también se observa a nivel el glucocorticoide fisiológico corticosterona, cotratamos las células con AM251 10  $\mu$ M y CORT 100 nM. Los resultados obtenidos mostraron el mismo perfil que al utilizar dexametasona. A los 20 min de tratamiento, la CORT 100 nM no aumentó de manera significativa los niveles de mRNA de Zif268 pero a este tiempo, el cotratamiento con ambos ligandos potenció significativamente la respuesta (Fig 3.21A), mientras que a los 30 min inhibió por completo el aumento en los niveles del mensajero (Fig 3.21B).



**Figura 3.21:** Niveles de mRNA de Zif268 ante el cotratamiento con AM251 y corticosterona. Células HT22 cultivadas por 48 hs en placas de 12 pocillos se trataron con AM251 10  $\mu$ M, CORT 100 nM o con combinaciones de estos ligandos por 20 (A) o 30 minutos (B). Los resultados se analizaron estadísticamente con un ANOVA de dos factores (Rta CORT-AM251) y con el test a posteriori de Tukey. Para cada gráfico se compararon todos los tratamientos entre sí. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Los resultados que obtuvimos tanto en los modelos *in vitro* como *in vivo* sugieren que la dexametasona induciría la transcripción de *Zif268* y que la activación del CB1 a través de su ligando sintético AM356 potenciarían el efecto de los GCs sobre la transcripción de *Zif268*. En ambos modelos también pudimos observar que el agonista inverso del CB1 AM251, actuando a través de dicho receptor, inhibiría el efecto de los GCs sobre la transcripción de *Zif268* (a partir de los 30 min de tratamiento en las HT22). A pesar de que existen ciertas discrepancias entre ambos sistemas, que analizaremos con más detalle en la discusión, consideramos que la línea celular HT22 resulta un modelo adecuado para continuar con el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen

la interacción entre ambos sistemas ya que los efectos inducidos por los ligandos y sus cotratamientos resultan, en cierta medida, similares a los observados en el modelo *in vivo*.

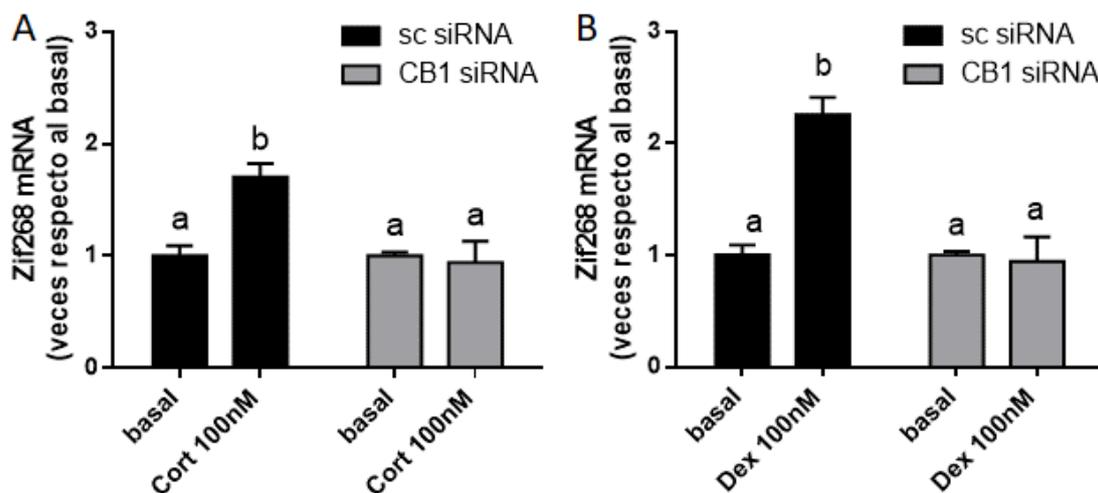
### **3.4. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES QUE SUBYACEN LA RESPUESTA CRUZADA ENTRE LOS RECEPTORES CB1 Y GR SOBRE EL CONTROL DE LA TRANSCRIPCIÓN DE ZIF268 EN LA LÍNEA CELLAR HT22**

#### **3.4.1. Rol del SEC como mediador de los efectos de los GC sobre la transcripción de Zif268**

##### **3.4.1.1. Efecto de los GCs sobre los niveles de mRNA de Zif268 al silenciar el receptor CB1 con RNA de interferencia**

A partir de estudios realizados en modelos animales, se ha postulado que los efectos rápidos de los GCs en los procesos de memoria se encontrarían mediados por el SEC, en donde la unión de los GCs al GR regularía el metabolismo de la AEA y el 2-AG aumentando la concentración de estos en la sinapsis neuronal [136]. Nuestros resultados *in vivo* con los ratones KO sugieren que los efectos que evaluamos para la DEX también se encontrarían mediados por el SEC, debido a que, en los animales KO para el CB1, la dexametasona no sería capaz de aumentar la respuesta de evitamiento inhibitorio ni de inducir la transcripción de Zif268. Como una primera aproximación al mecanismo celular que subyace a la interacción entre ambos sistemas sobre el control de la transcripción de este gen, decidimos evaluar si la expresión del CB1 también sería necesaria para que los GC induzcan la transcripción de *Zif268* en la línea celular HT22.

Células HT22 se transfectaron de manera transitoria con el CB1-siRNA o sc-siRNA. A las 24 hs se replaquearon a placas de 12 pocillos y a las 48hs se trataron con DEX 100 nM o con CORT 100 nM por 30 min. El ANOVA de dos factores (respuesta del ligando vs expresión del CB1) arrojó una interacción significativa tanto para la DEX ( $F_{(1,8)}=13,55$ ;  $p=0,0062$ ) como para el glucocorticoide fisiológico corticosterona ( $F_{(1,8)}=12,86$ ;  $p=0,0071$ ), indicando que sus efectos dependerían de la expresión del CB1. A partir de las comparaciones a posteriori se observó que en las células transfectadas con la secuencia inespecífica (sc-siRNA), ambos GCs aumentaron los niveles de mRNA de Zif268. La transfección con el CB1-siRNA bloqueó por completo sus respuestas. (Fig 3.22A y B).



**Figura 3.22:** Niveles de mRNA de Zif268 ante el tratamiento con GCs en células HT22 transfectadas con un RNA de interferencia específico contra el CB1. Células HT22 se transfectaron con sc-siRNA o CB1-siRNA y a las 24 hs se replaquearon a placas de 12 pocillos. A las 24 hs se hambreadaron ON y cada transfección se trató por 30 min con CORT 100 nM **(A)** o DEX 100 nM **(B)**. Se midieron los niveles de mRNA de Zif268 por PCR en tiempo real. Los resultados se analizaron estadísticamente con un ANOVA de dos factores (respuesta del ligando vs expresión del CB1) seguido del test a posteriori de Tukey. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

#### 3.4.1.2. Determinación de la actividad de la FAAH y del contenido de AMPc ante el tratamiento con dexametasona

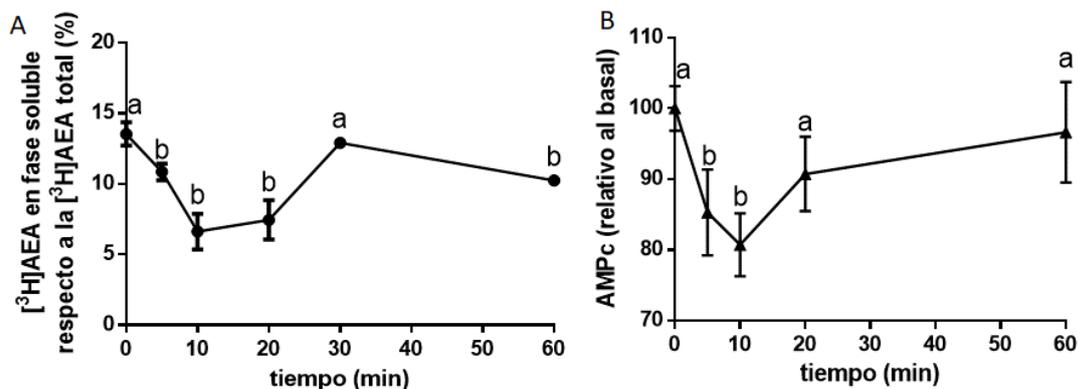
En nuestros modelos *in vitro* en *in vivo*, los GCs ejercerían sus efectos mediante la activación del receptor CB1. Un posible mecanismo que ya ha sido descrito en hipocampo es el aumento de los niveles de anandamida (AEA) y/o 2-araquidonilglicerol (2-AG) en el espacio extracelular [71, 137-139]. Como se expuso anteriormente, se ha observado que la línea celular HT22 es capaz de sintetizar AEA y 2-AG ante un estímulo electromagnético [152].

Debido a la baja concentración alcanzada por la AEA y el 2-AG, el método utilizado para su cuantificación es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplada al método de espectrometría de masa (ME). Como esta técnica no está puesta a punto en el país para cuantificar estos compuestos, decidimos como primera aproximación evaluar el efecto de los glucocorticoides sobre la actividad de una enzima encargada de metabolizar la AEA. La hidrolasa de amidas de ácidos grasos o FAAH (por sus siglas en inglés fatty acid amide hydrolase) es una enzima que participa del metabolismo de la AEA, degradándola a ácido araquidónico (AA) y etanolamina. Utilizando [ $^3$ H]AEA es posible determinar la actividad de esta enzima midiendo la producción de [ $^3$ H]etanolamina. El sustrato de la reacción es soluble en fase orgánica mientras que el

producto que queda con la marca radiactiva (etanolamina) es soluble en fase acuosa, lo cual facilita su separación.

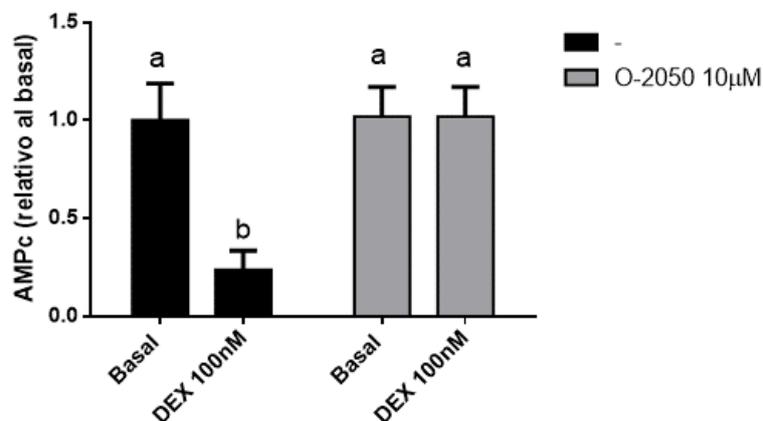
Para estudiar el efecto de la dexametasona sobre la actividad de la FAAH, células HT22 cultivadas en placas de 6 pocillos por 48 hs se trataron por distintos tiempos con DEX 100 nM. La actividad de la FAAH se determinó como se indica en materiales y métodos. La hidrólisis basal del sustrato marcado debido a la actividad de la FAAH resultó ser del 15% aproximadamente. El tratamiento con DEX 100 nM disminuyó significativamente la actividad de la enzima a partir de los 5 min de tratamiento. Se observó una primera baja en la actividad de la enzima que va desde los 5 hasta los 20 min presentando un pico de actividad mínima a los 10 min de tratamiento. A los 30 min vuelve a su actividad basal pero a la hora de tratamiento se detectó otra baja significativa (Fig 3.23A).

Como la disminución de la actividad de FAAH puede estar asociada a un aumento en la concentración de AEA presente en el medio de cultivo celular debido a una disminución en su degradación, como paso siguiente decidimos evaluar el efecto de la DEX sobre cascadas de señalización clásicamente moduladas por este endocannabinoide. Como hemos mencionado, la AEA es un agonista del CB1, al unirse a este receptor induce su acople a la proteína  $G_{i/o}$  y disminuye los niveles de AMPc intracelulares. En la línea celular HT22, la DEX 100 nM disminuyó los niveles de AMPc a los 5 y 10 min de tratamiento (Fig. 3.23B). El perfil este gráfico es similar al que se obtuvo al medir la actividad de la FAAH, sugiriendo que este efecto puede estar asociado a la disminución de la degradación de la AEA y, por consiguiente, al aumento de su concentración en el cultivo celular.



**Figura 3.23:** Actividad de la FAAH y niveles de AMPc ante el tratamiento con dexametasona en la línea celular HT22. **A)** Células HT22 cultivadas por 48 hs en placas de 6 pocillos se hambreadaron por 2 horas y se trataron por distintos tiempos con DEX 100 nM. Se determinó la actividad de la FAAH como se detalla en la sección de materiales y métodos. **B)** Células HT22 cultivadas por 48 hs en placas de 24 pocillos se hambreadaron por 2 horas y se pretrataron por 10 min con IBMX y luego por distintos tiempos con DEX 100 nM. Los datos se analizaron con un ANOVA de un factor seguido por el test a posteriori de Dunnett comparando cada tiempo contra el basal. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados por duplicado (FAAH) o triplicado (AMPc).

Con el objetivo de confirmar que la respuesta inducida por la DEX sobre los niveles de AMPc se encuentra mediada por la señalización de la AEA sobre el receptor CB1, medimos la respuesta de la DEX en presencia del antagonista selectivo del CB1 O2050. Para ello, células HT22 cultivadas por 48 hs en placas de 24 pocillos se hambreadaron por 2 hs y se estimularon con DEX 100 nM, con O-2050 10  $\mu$ M o con combinaciones de estos ligandos (Fig. 3.23B). El ANOVA de dos factores arrojó una interacción significativa entre la DEX y el antagonista del CB1 O-2050. El cotratamiento con el O-2050 revierte el efecto de la dexametasona sobre los niveles de AMPc. En su conjunto, estos resultados sugieren que sugiere que, tras la unión del glucocorticoide a su receptor, este disminuye la actividad de la FAAH, aumentando de este modo la concentración de AEA en el cultivo celular, la cual señalizando a través del receptor CB1, disminuye los niveles del segundo mensajero AMPc.

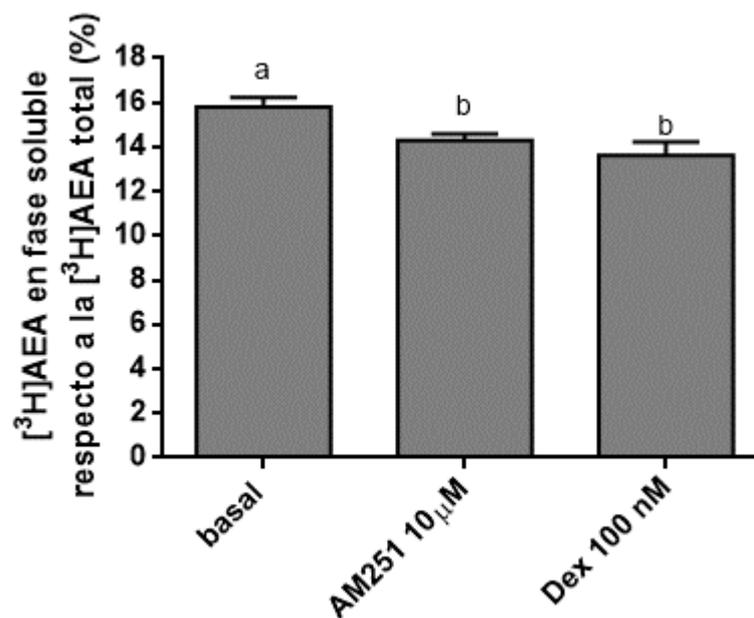


**Figura 3.24:** Niveles de AMPc ante el tratamiento con DEX y O-2050 en la línea celular HT22. Células HT22 cultivadas por 48 hs en placas de 24 pocillos se hambreadaron por 2 horas y se pretrataron por 10 min con IBMX, luego por 5 min con O-2050 10  $\mu$ M y luego por 10 min con DEX 100 nM. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos factores seguido por el test a posteriori de Tukey comparando todos los tratamientos entre sí. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

#### 3.4.1.3. Determinación de la actividad de la FAAH ante el tratamiento con AM251 en la línea celular HT22

Como hemos mencionado, el agonista inverso AM251 presenta un comportamiento atípico sobre la modulación de los niveles de AMPc que puede ser explicado de distintas maneras. A partir de los resultados obtenidos ante el cotratamiento con el antagonista selectivo del CB1 O-2050, hipotetizamos que a altas concentraciones de AM251, este ligando podría estar aumentando el contenido de algún endocannabinoide en el cultivo celular, y que la respuesta medida es consecuencia de la competencia entre ambos cannabinoides sobre el receptor CB1. Con el objetivo de evaluar si el comportamiento del AM251 sobre la modulación de los niveles de AMPc involucra el aumento del contenido de algún endocannabinoide en el cultivo celular, determinamos la actividad

de la FAAH ante el tratamiento por 20 min con AM251 10  $\mu$ M. Para ello, células HT22 cultivadas en placas de 6 pocillos por 48 hs se trataron por 20 minutos con AM251 10  $\mu$ M y con DEX 100 nM como control positivo. La actividad de la FAAH se determinó como se indica en materiales y métodos. La hidrólisis basal del sustrato marcado debido a la actividad de la FAAH resultó ser del 15% aproximadamente. El tratamiento tanto con AM251 ( $P=0,0317$ ) como con DEX 100nM ( $P=0,0126$ ) disminuyó significativamente la actividad de la enzima (Fig. 3.25). Si bien más estudios son necesarios para confirmar que altas concentraciones de AM251 aumentan el contenido de anandamida a través de la inhibición de la FAAH, los resultados que presentamos hasta el momento sugieren que el efecto que este ligando ejerce sobre los niveles de AMPc se encontraría mediado por un mecanismo relacionado.



**Figura 3.25:** Actividad de la FAAH ante el tratamiento AM251 en la línea celular HT22. Células HT22 cultivadas por 48 hs en placas de 6 pocillos se hambreadon por 2 horas y se trataron por 20 minutos con AM251 10 $\mu$ M. Se determinó la actividad de la FAAH como se detalla en la sección de materiales y métodos. Los datos se analizaron con un ANOVA de un factor seguido por el test a posteriori de Dunett comparando cada tratamiento contra el basal. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

#### 3.4.2. Rol de ERK en el mecanismo que subyace la interacción entre el GR y el CB1 sobre la regulación de la transcripción de Zif268

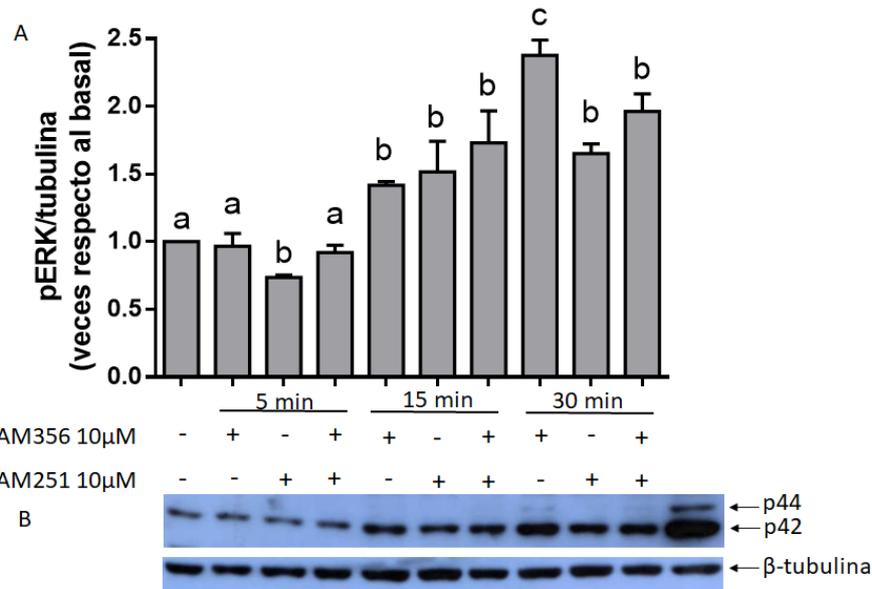
Como se detalló en la introducción, la vía de las MAPKs presenta un rol primordial en la formación de memorias a largo plazo al integrar las señales inducidas por la activación de múltiples receptores neuronales. En el hipocampo de ratas se observó una activación rápida y transitoria de ERK ante la experimentación de situaciones aversivas [153] y la activación de esta vía es requerida para la consolidación de la memoria en mamíferos [154]. El tratamiento con el inhibidor de MEK PD 98059, interfiere negativamente de manera dosis-dependiente sobre la consolidación de la memoria evaluada en la prueba

de evitación inhibitoria en un modelo de rata [155]. La activación de esta cascada da lugar a la fosforilación de factores de transcripción y a la inducción de genes blanco tales como *Zif268* [39].

Por otro lado, ha sido descrito que el SEC actuando a través del CB1 es capaz de modular la actividad de la vía de las MAPKs [130]. En base a estos antecedentes decidimos estudiar el efecto de los cannabinoides sintéticos AM356 y AM251 sobre la activación de ERK y el rol de la activación de esta kinasa en la interacción entre el CB1 y GR sobre el control de la transcripción de *Zif268*.

#### 3.4.2.1. Efecto de los cannabinoides AM356 y AM251 sobre la fosforilación de ERK1/2

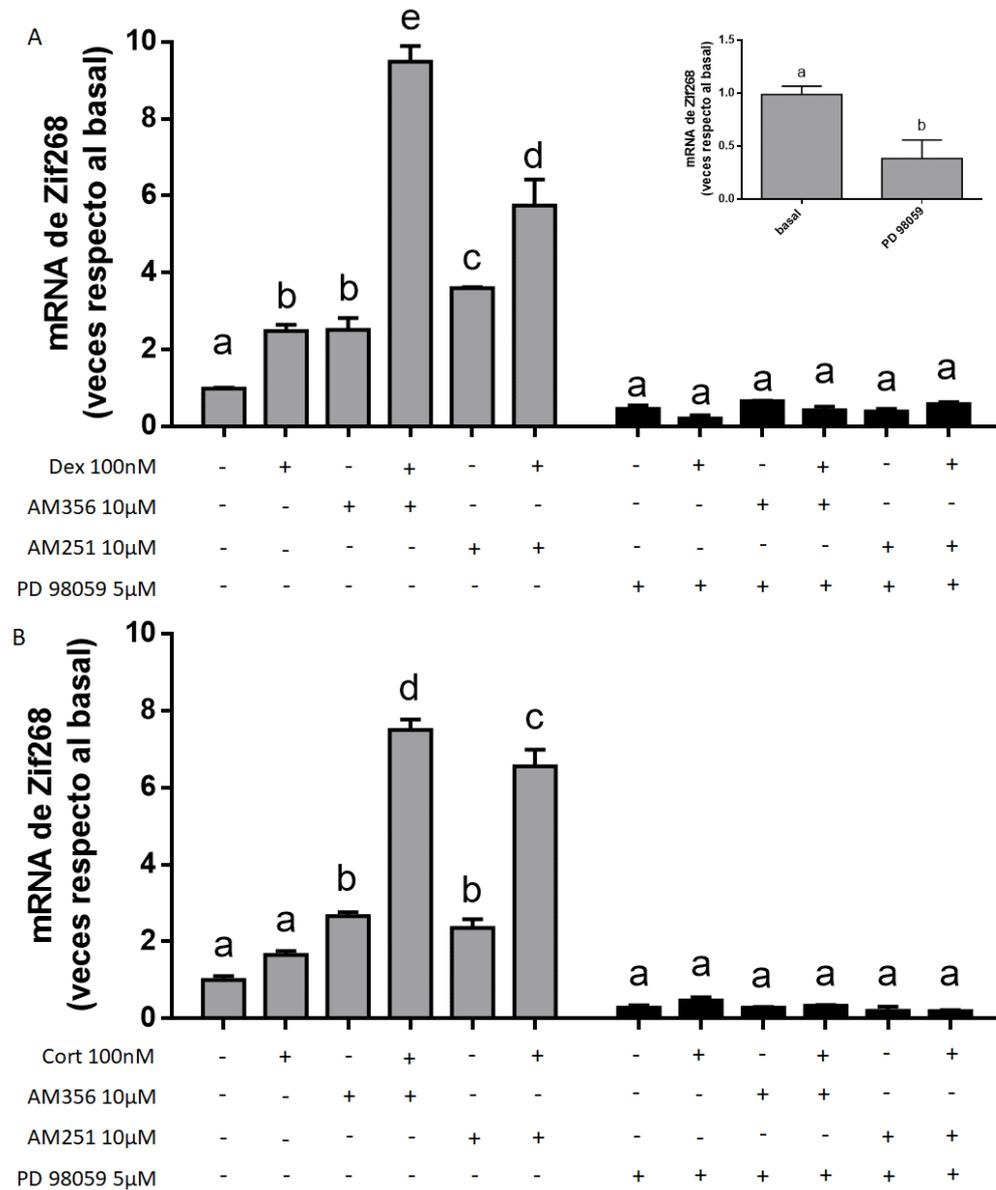
Estudios previos han demostrado que el CB1 puede inducir la activación de la vía de las MAPKs, incluyendo la activación de ERK. Esta respuesta depende del tipo celular y del ligando implicado [132]. En nuestro modelo celular, el efecto sobre la fosforilación de ERK de los ligandos CB1 que utilizamos no ha sido estudiado hasta el momento. Es por ello que decidimos medir mediante WB los niveles de fosforilación de esta proteína ante el tratamiento con AM356 10  $\mu$ M y AM251 10  $\mu$ M a distintos tiempos. Utilizamos como control positivo un tratamiento por 5 min con SFB al 30%. Como el AM251 es considerado un agonista inverso del CB1, también realizamos cotratamientos entre ambos ligandos con el fin de evaluar un posible bloqueo del efecto del AM356, pretratando por 5 min con AM251. El AM356 aumenta los niveles de pERK1/2 a los 15 y 30 min de tratamiento. El AM251, durante los primeros 5 min, induce una leve disminución significativa en los niveles de pERK, pero a partir de los 15 min aumenta la fosforilación de esta kinasa, alcanzando niveles similares a los generados por el AM356. A los 30 min, también induce la fosforilación de ERK pero en menor medida que el AM356. A este tiempo, el pretratamiento con AM251 bloquea la respuesta del AM356, indicando que ambos ligandos estarían actuando a través del mismo receptor (Fig 3.26). Debido a que a estas concentraciones de trabajo estos cannabinoides presentan efectos diferentes sobre los niveles de AMPc, se podría pensar que el efecto sobre la fosforilación de ERK ocurriría a través de un mecanismo independiente de la modulación de este segundo mensajero.



**Figura 3.26:** Niveles de fosforilación de ERK1/2 en células HT22 tratadas con AM356 y AM251. Células HT22 cultivadas por 48hs en placas de 12 pocillos se hambrearón por 2 horas y se trataron por distintos tiempos con AM356 10  $\mu$ M, AM251 10  $\mu$ M o combinaciones de estos ligandos. Los cotratamientos se realizaron pretratando las células por 5 min con AM251 10  $\mu$ M seguido del agregado de AM356 10  $\mu$ M. Como control positivo de la activación de ERK, un pocillo con células se trató por 5 minutos con SFB al 30% (última calle de B). **A)** Densitometría del western blot. **B)** Western blot de pERK1/2 y  $\beta$ -tubulina. Los resultados se analizaron estadísticamente con un ANOVA de un factor, comparando los tratamientos de cada tiempo por separado. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes.

#### 3.4.2.2. Efecto del inhibidor de MEK PD98059 sobre la respuesta cruzada entre los receptores GR y CB1 a nivel del mRNA de Zif268

La fosforilación y activación de ERK1/2 se encuentra mediada por las kinasas MEK1 y MEK2. Utilizamos el inhibidor de MEK1/2 PD98059 para estudiar el papel de ERK sobre la inducción de la transcripción de Zif268 regulada por el GR y el CB1. Células HT22 se pretrataron por 30 min con PD98059 5  $\mu$ M y luego se incubaron por otros 20 min con AM356 10  $\mu$ M, AM251 10  $\mu$ M, DEX 100 nM o combinaciones de estos ligandos. El pretratamiento con el inhibidor de MEK1/2 disminuye la transcripción basal de este gen de manera significativa (Fig 3.27A, inserto). Como había sido determinado previamente, el estímulo con los ligandos por separado aumentó en todos los casos la respuesta medida. Todos los ligandos probados y sus cotratamientos perdieron su efecto inductor al ser pretratados con PD98059 5  $\mu$ M (Fig 3.27A). Los mismos resultados se obtuvieron al tratar las células con CORT 100nM en lugar de DEX (Fig 3.27B). La activación de ERK parece ser sumamente necesaria para la transcripción de Zif268 controlada tanto por el CB1 como por el GR.



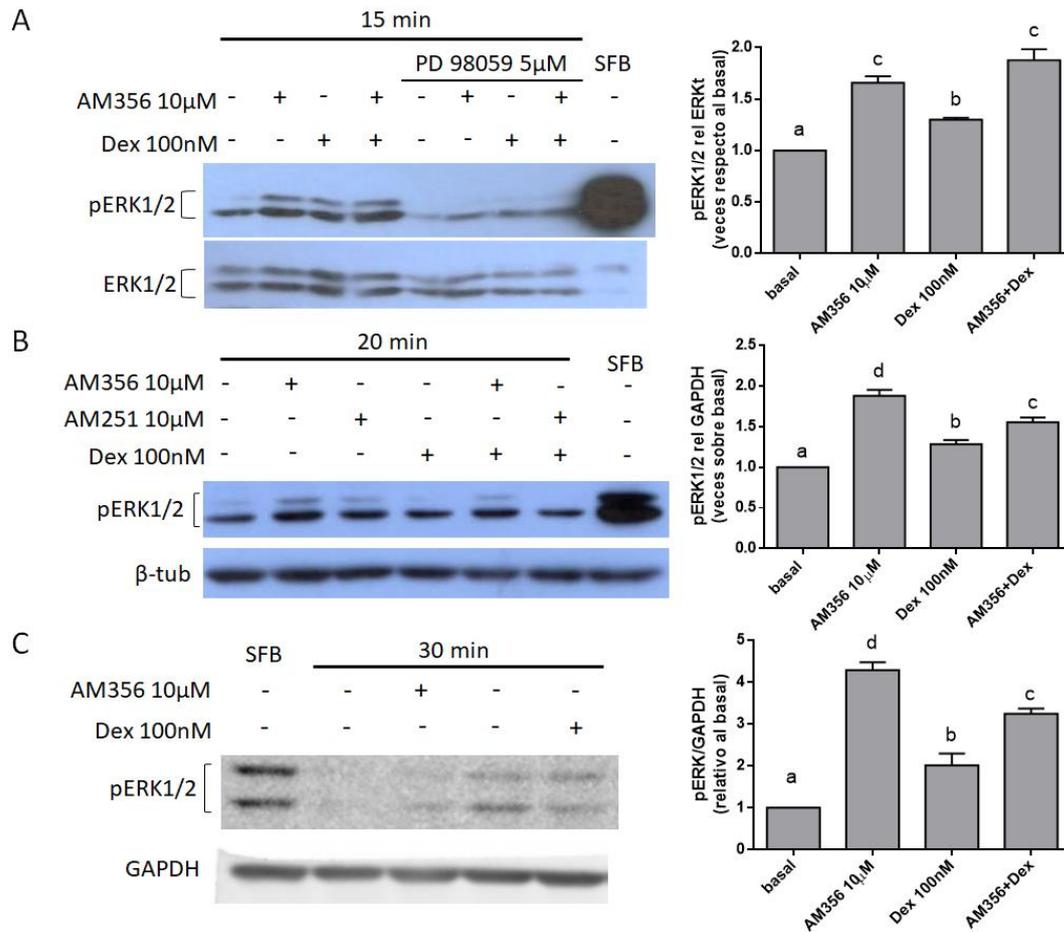
**Figura 3.27:** Niveles de mRNA de Zif268 en células HT22 ante el cotratamiento con PD98059, AM356, AM251 y GCs. Células HT22 cultivadas por 48 hs placas de 12 pocillos se pretrataron por 30 min con PD98059 5 µM y luego se incubaron por otros 20 min con AM356 10 µM, AM251 10 µM, DEX 100 nM **(A)**, CORT 100 nM **(B)** o combinaciones de estos ligandos. Los resultados se analizaron estadísticamente con un ANOVA de dos factores (ligandos-PD 98059) y con el test a posteriori de Tukey comparando los tratamientos con o sin PD 98059 por separado. **Inserto en A:** Células HT22 cultivadas por 48 hs en wells de p12 se trataron por 50 min con PD98059 5 µM. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test de Student de dos colas. Los resultados representan la media +/- SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

A partir de estos resultados y teniendo en cuenta que los ligandos cannabinoides aumentan los niveles de fosforilación de ERK, se podría pensar que el AM356 y el AM251 inducen la transcripción de Zif268 actuando a través de activación de esta quinasa. Por otro lado, nuestros resultados dan indicios de que la activación de ERK sería sumamente necesaria para la transcripción de *Zif268* ya que el tratamiento con

PD98059 disminuye la transcripción basal de dicho gen e inhibe los efectos potenciadores de todos los cotratamientos. Se ha hipotetizado a partir de estudios moleculares en pruebas conductuales, como el miedo condicionado y el laberinto acuático de Morris, que la vía de señalización ERK1/2-MSK1/2-Elk1 originaría una marca epigenética requerida para la transcripción de este gen en la neurona granulosa del giro dentado. Esta marca revertiría la condensación de la cromatina permitiendo la transcripción de dicho gen [86]. Los resultados tan contundentes en las HT22 dan idea de que un mecanismo similar podría estar llevándose a cabo en este sistema.

#### 3.4.2.3. Estudio de la interacción entre el AM356 y la dexametrasona sobre la fosforilación de ERK

En la búsqueda de un mecanismo que explique la respuesta cruzada entre el CB1 y el GR sobre la transcripción de *Zif268*, decidimos evaluar el efecto de la señalización de ambos sistemas sobre la activación de la vía de las MAPKs, midiendo los niveles de pERK mediante la técnica de Western Blot ante cotratamientos con AM356 y Dex. Células HT22 se trataron por distintos tiempos con AM356 10  $\mu$ M, DEX 100 nM o con combinaciones de estos ligandos. Para controlar que la modulación observada corresponda a cambios en la fosforilación de ERK, en algunos casos también realizamos los mismos estímulos pretratando las células con el inhibidor de MEK1/2 PD 98059 5  $\mu$ M. Como control positivo de la banda de pERK1/2 estimulamos un pocillo de células con SFB al 30% por 5 min. A partir de los 15 min de tratamiento, la DEX 100 nM también aumentó los niveles de pERK1/2, pero en menor medida que el AM356 10  $\mu$ M. Al cotratar las células con ambos ligandos, la activación resultó igual (15 min) (Fig. 3.28A) o menor (20 y 30 min) (Fig. 3.28B y C respectivamente) que la inducida por el AM356 *per se*. Es decir, los efectos no se potencian ni se suman, sino que estos ligandos estarían “compitiendo” por la activación de ERK. Si bien la activación de esta kinasa resulta crucial para la transcripción de *Zif268* y tanto el AM356 como la DEX aumentan sus niveles de fosforilación, su activación no participaría en la interacción positiva entre estos dos compuestos sobre la inducción de *Zif268*. Estos resultados se podrían interpretar teniendo en cuenta que la DEX inhibe la actividad de la FAAH y podría estar aumentando el contenido de AEA presente en el medio de cultivo celular. En este caso, al coestimular las células con AM356 y DEX, la respuesta originada sobre la activación de ERK resultaría de la competencia entre un agonista total (AM356) y un agonista parcial (AEA).

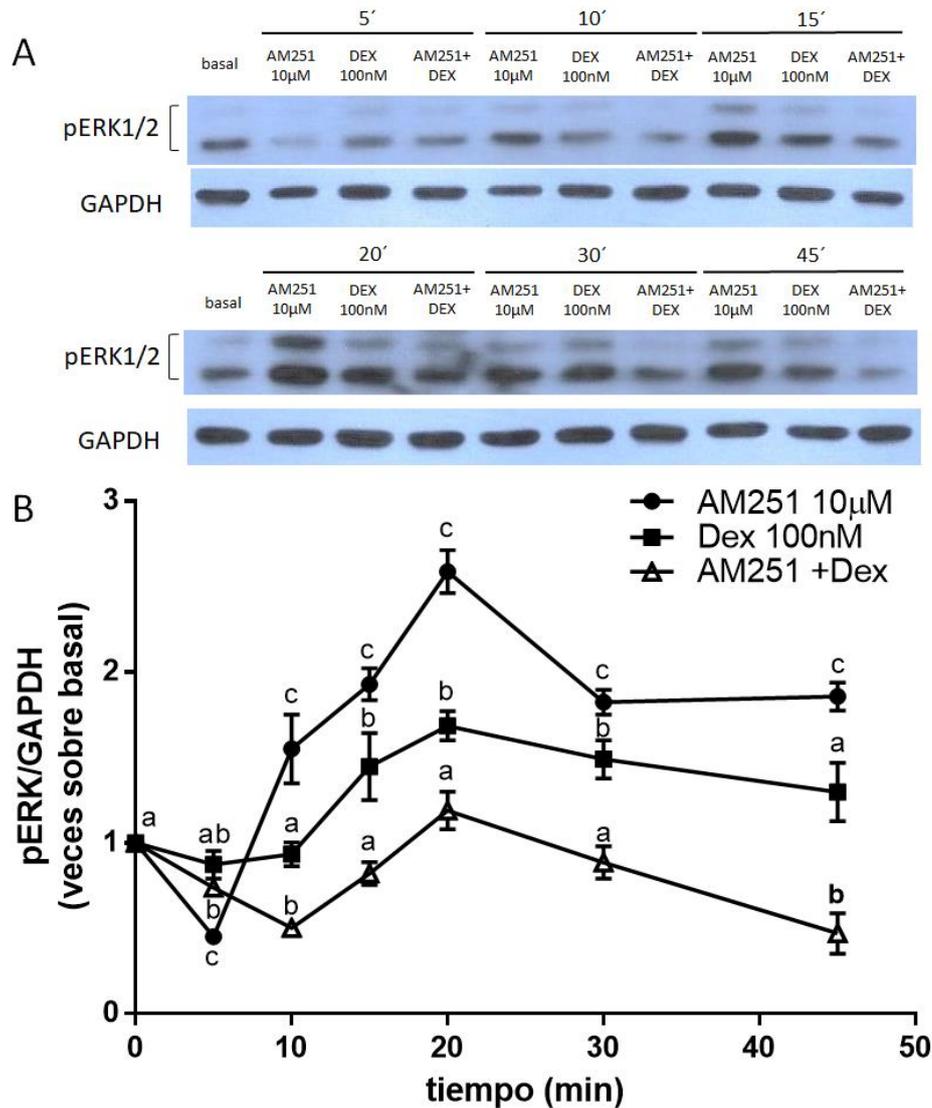


**Figura 3.28:** Niveles de fosforilación de ERK1/2 cotratadas con AM251 y dexametasona. Células HT22 cultivadas por 48 hs en placas de 12 pocillos se hambreadaron por 2 horas y se trataron por 15 **(A)**, 20 **(B)**, o 30 minutos **(C)** con AM356 10  $\mu$ M, DEX 100 nM o combinaciones de estos ligandos. Las células estimuladas con PD 98059 5  $\mu$ M se pre-trataron con este ligando 2X por 30 min. Como control positivo de la activación de ERK, un pocillo con células se estimuló por 5 minutos con SFB al 30%. Los controles se utilizaron para la identificación de las bandas y no se incluyeron en el análisis densitométrico. Los resultados se analizaron estadísticamente con un ANOVA de un factor seguido del test a posteriori de Tukey, comparando todos los tratamientos entre sí. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes.

#### 3.4.2.4. Estudio de la interacción entre el AM251 y la dexametasona sobre la fosforilación de ERK

Como el efecto del cotratamiento del AM251 y la DEX sobre la transcripción de *Zif268* depende del tiempo, realizamos una cinética de activación de ERK con el fin de comprender el rol de la vía de las MAPKs en cada una de las etapas de este proceso. Para ello, medimos los niveles de fosforilación de ERK ante el tratamiento con AM251 10  $\mu$ M, DEX 100 nM y combinaciones de estos ligandos a distintos tiempos. En concordancia con los resultados mostrados en la Fig 3.25, ante 5 min de tratamiento, el AM251 inhibe disminuye la fosforilación de ERK pero a partir de los 10 min la aumenta de manera significativa. Esta respuesta se mantiene hasta por lo menos unos 45 min de

estímulo y presenta un pico a los 20 min. Por su lado, la DEX también aumenta la fosforilación de ERK entre los 15 y los 30 min de tratamiento, pero en menor medida que el AM251. La respuesta medida ante el cotratamiento con AM251 y DEX resultó en todos los tiempos menor a la generada por cada uno de los ligandos por separado, excepto para los 5 min de tratamiento. El ANOVA de dos factores (DEX-AM251) realizado para cada tiempo arrojó una interacción significativa en todos los casos (Fig 3.29). Estos resultados podrían indicar que la vía de las MAPKs podría estar involucrada en la etapa inhibitoria de la transcripción de *Zif268* regulada por el co-tratamiento con AM251 y DEX y que la etapa potenciadora actuaría a través de otros mecanismos.

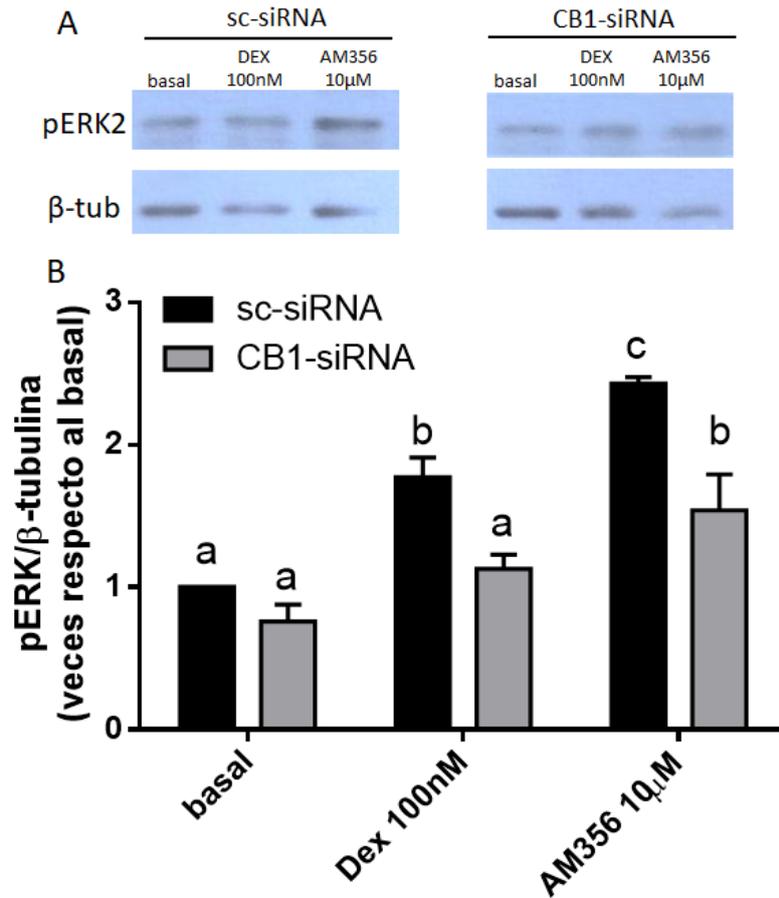


**Figura 3.29:** Niveles de fosforilación de ERK1/2 cotratadas con AM251 y dexametasona. Células HT22 cultivadas por 48hs en placas de 12 pocillos se hambreadon por 2 horas y se trataron por distintos tiempos con AM251 10 µM, DEX 100 nM o combinaciones de estos ligandos. **A)** Western blot de pERK1/2 y GAPDH. **B)** Densitometría del western blot. Los resultados se analizaron estadísticamente con un ANOVA de dos factores (DEX-AM251) para cada tiempo por separado, seguido del test a posteriori de Tukey, comparando todos los tratamientos entre sí y contra el basal. Los resultados representan la media +/- SD de tres experimentos independientes.

### 3.4.3. Efecto del AM356 y de la dexametasona sobre la fosforilación de ERK al silenciar el receptor CB1 con RNA de interferencia

A partir de la medición de los niveles de fosforilación de ERK en presencia de DEX y AM356 hipotetizamos que el efecto de la DEX podría estar mediado por el aumento de AEA en el cultivo celular debido al efecto inhibitorio de este glucocorticoide sobre la FAAH. En dicho caso, la respuesta inducida por la DEX se encontraría mediada por la señalización de la AEA sobre el receptor CB1. Con el fin de confirmar si este receptor participa de la activación de ERK inducida por la DEX, decidimos medir la capacidad de este ligando de fosforilar ERK al silenciar el CB1 utilizando un RNA de interferencia. Para ello, células HT22 se transfectaron de manera transitoria con un siRNA contra el mRNA que codifica para este receptor (CB1-siRNA) o con una secuencia control que no interfiere con ningún mRNA (sc-siRNA). A las 24 hs las células se volvieron a sembrar en placas de 12 pocillos y a las 48hs se trataron con AM356 10  $\mu$ M (control positivo) o con DEX 100 nM por 15 min (Fig.3.30). Para confirmar la disminución de la expresión del CB1 en las células transfectadas con el CB1-siRNA, se plaqueó un pocillo extra de cada transfección y se cuantificaron sus niveles basales de mRNA por PCR en tiempo real.

La estadística de los resultados se analizó comparando cada ligando contra el basal. El ANOVA de dos factores (respuesta del ligando vs expresión del CB1) arrojó una interacción significativa para todos los ligandos probados, indicando que sus efectos dependen de la expresión del CB1. En las células transfectadas con la secuencia inespecífica (sc-siRNA), ambos ligandos indujeron la fosforilación de ERK. La transfección con el CB1-siRNA bloquea por completo la respuesta de la DEX 100 nM y parcialmente la del AM356 10  $\mu$ M (Fig 3.30B). Estos resultados sugieren por un lado que el AM356 activaría ERK señalizando a través del receptor CB1. Teniendo en cuenta que la dexametasona disminuye la actividad de la FAAH en este modelo celular, y que el silenciamiento del receptor CB1 disminuiría el efecto de este GC sobre la activación de ERK, probablemente el aumento de la fosforilación de ERK inducido por la dexametasona se deba al aumento del contenido de anandamida en el cultivo celular y al efecto de este endocannabinoide sobre el CB1.



**Figura 3.30:** Niveles de fosforilación de ERK ante el tratamiento con AM356 y DEX en células HT22 transfectadas con CB1-siRNA. Células HT22 se transfectaron con sc-siRNA o CB1-siRNA y a las 24 hs se replaquearon a placas de 12 pocillos. A las 48 hs se hambreadaron por 2 horas y cada transfección se trató por 15 min con AM356 10 μM o Dex 100 nM **A)** Western blot de pERK1/2 y β-tubulina. **B)** Densitometría del western blot. Los resultados se analizaron estadísticamente con un ANOVA de dos factores (respuesta del ligando vs expresión del CB1) comparando cada ligando contra el basal, seguido del test a posteriori de Tukey. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes.

Los resultados obtenidos en este modelo celular describen mecanismos moleculares que podrían participar de la interacción entre el sistema endocannabinoide y glucocorticoide sobre la formación de memorias aversivas. Estos mecanismos involucran la modulación de la actividad de la FAAH, la señalización del receptor CB1, cambios en los niveles de fosforilación de ERK y la modulación de la transcripción de Zif268.

## **4.DISCUSIÓN**

El trabajo realizado durante el desarrollo de esta tesis permitió ampliar nuestros conocimientos al explorar diversos campos. Por un lado, aportamos evidencia sobre el rol del sistema endocannabinoide, y en particular del receptor CB1, como mediador de los efectos de los glucocorticoides sobre procesos que podrían estar implicados en la formación de memorias aversivas. Por el otro, postulamos un mecanismo de acción novedoso para el efecto de los glucocorticoides sobre el aumento del contenido de anandamida en el SNC que involucraría la modulación de la actividad de la hidrolasa de amidas de ácidos grasos. También caracterizamos la interacción entre cannabinoides sintéticos del CB1 y GCs sobre la regulación de los niveles de mRNA de Zif268 y estudiamos el rol de la kinasa ERK en dicho proceso. Este trabajo nos permitió corroborar nuestra hipótesis al observar que el agonista del CB1 AM356 potencia el efecto de la dexametasona sobre la latencia de retención en la prueba de evitamiento inhibitorio, y que en los ratones KO para el receptor CB1 este glucocorticoide pierde su efecto facilitador. A continuación, se discuten los aspectos más relevantes surgidos de este estudio.

#### **4.1. MECANISMOS MOLECULARES QUE ESTARÍAN IMPLICADOS EN LOS EFECTOS DE LOS CANNABINOIDES SINTÉTICOS SOBRE LA MODULACIÓN DE MEMORIAS AVERSIVAS**

Hasta el momento, el mecanismo de acción propuesto para el SEC como facilitador de la consolidación de la memoria involucra la liberación del neurotransmisor GABA y la modulación de la actividad GABAérgica [136]. El receptor CB1 se sobreexpresa en las interneuronas GABAérgicas de la amígdala basolateral (ABL) y se ha demostrado que su activación suprime la liberación de GABA [112, 156] a través de la inhibición de la entrada de  $Ca^{2+}$  en las terminales [98, 157]. Se encuentra bien establecido que el sistema GABAérgico de la amígdala participa en la modulación de la memoria, ya que la infusión de antagonistas del receptor GABA en la ABL facilitarían la consolidación de la memoria [2].

En este contexto, el presente trabajo provee evidencia novedosa de que ligandos cannabinoides sintéticos, actuando a través del receptor CB1, podrían modular la consolidación de la memoria induciendo la transcripción de Zif268. En la línea celular HT22, tanto el agonista CB1 AM356 como el agonista inverso AM251 aumentan los niveles del mRNA de este IEG. En el hipocampo de los ratones CD1 WT, si bien se registró un aumento en los niveles del mensajero de 1,5 veces con respecto al vehículo ante el tratamiento con el agonista CB1 HU210, este incremento no resultó significativo. El AM251 tampoco mostró un efecto *per se* sobre este proceso en el hipocampo murino. Existen discrepancias en los protocolos entre ambos sistemas que podrían haber dado origen a este resultado, como por ejemplo el tiempo de estímulo utilizado. Se ha encontrado que la administración aguda del cannabinoide natural  $\Delta$ -9-tetrahidrocannabinol (THC) induce la expresión rápida de Zif268 en la corteza cingulada,

núcleo estriado, corteza fronto-parietal y en el hipocampo [158] y también aumenta la transcripción de Zif268 en el hipocampo murino [159]. En base a nuestros resultados *in vitro* y a la información presente en bibliografía deberíamos corroborar el efecto de estos ligandos sintéticos sobre la modulación de los niveles de mRNA de Zif268 a tiempos cortos de tratamiento en el hipocampo murino.

Resulta interesante mencionar la correlación observada entre los resultados obtenidos en la línea celular y los efectos de ciertos cannabinoides sintéticos sobre la consolidación de memorias aversivas. Si bien el AM356 a la dosis utilizada no aumentó de manera significativa la respuesta de evitamiento inhibitorio, se ha determinado que el agonista del receptor CB1 WIN55,212-2 aumenta la latencia de retención de manera dosis dependiente al ser evaluada en la misma prueba conductual [84]. Por su parte, la administración post-entrenamiento del agonista inverso AM251 también aumenta la respuesta de evitamiento inhibitorio al entrenar animales utilizando un protocolo de baja aversión (0,2mA; 2seg) [133].

Teniendo efectos opuestos sobre la actividad del CB1 dependiente de la proteína  $G\alpha_{i/o}$ , el agonista AM356 y el agonista inverso AM251 inducen la transcripción de Zif268. Nuestros resultados sugieren que este efecto se ejerce a través de la activación de ERK ya que ambos ligandos se comportan como agonistas en función de la activación de esta kinasa, y que la inducción de la transcripción de Zif268 se pierde al cotratarse las células con el inhibidor de MEK PD 98059. En base a estos resultados y teniendo en cuenta el rol fundamental de esta kinasa en la consolidación de la memoria y que también se ha observado en oligodendrocitos que WIN55,212-2 aumenta sus niveles de fosforilación [160], la activación de ERK podría estar mediando los efectos de los cannabinoides sobre la consolidación de memoria.

#### **4.2. ROL DEL SEC, SEÑALIZANDO A TRAVÉS DEL RECEPTOR CB1, EN LA FORMACIÓN DE MEMORIAS EVALUADAS EN LA PRUEBA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO**

Al estudiar el comportamiento de los ratones KO en la prueba de evitación pasiva, se observó que estos presentan un incremento significativo en la formación de la memoria asociativa evaluada en la prueba de evitamiento inhibitorio con respecto al fenotipo salvaje al aplicar un shock eléctrico de 0,35 mA, pero no se observan diferencias significativas entre los fenotipos al trabajar con un amperaje de 0,2 mA. En este caso en particular, nos referimos al desempeño global de los animales en la prueba y no específicamente a la consolidación porque las fases de adquisición y evocación también se ven afectadas por la delección genética del CB1. Esta dependencia del efecto de la delección genética del CB1 con el grado de aversión de la experiencia también fue confirmada por el grupo de Woltjak y col. (Jacob 2012), pero estudiando el comportamiento de ratones KO en otra prueba conductual de condicionamiento clásico. Entrenaron a los animales en el aparato de condicionamiento del miedo utilizando dos

protocolos, uno de aversión moderada (0,7 mA) y uno de alta aversión (1,5 mA). Los animales expuestos al protocolo de aversión moderada, al ser evaluados a las 24 hs mostraron una respuesta similar al fenotipo salvaje mientras que los que fueron expuestos al protocolo de alta aversión mostraron un incremento en la formación de la memoria [161]. Este efecto de la delección genética del CB1 resulta llamativo porque se contradice con lo esperado en función del efecto facilitador que presentan ciertos agonistas CB1 sobre la consolidación de este tipo de memorias [84]. El grupo de Woltjak y col. postula que el sistema endocannabinoide funcionaría como un sistema “buffer”, que previene la formación de memorias exageradas tras encuentros de alta aversión.

De la mano de esta teoría, Atsak y col. describieron posteriormente que, al igual que los efectos de los glucocorticoides sobre la consolidación de la memoria, la infusión de WIN55,212-2 intra ABL muestra una relación dosis dependiente con forma de U invertida sobre la retención de evitamiento inhibitorio. La infusión de 10 ng de este ligando aumenta la retención mientras que una infusión de 30 o 100 ng carece de efecto [162]. En nuestro modelo *in vitro* no observamos este tipo de relación entre los niveles del mensajero de Zif268 y la concentración de los ligandos cannabinoides utilizados. Esto se podría deber a que no trabajamos con concentraciones lo suficientemente altas como para ver estos efectos o a que la fase inhibitoria de la curva no correlaciona con este IEG.

En base a nuestros resultados y a la información presente en bibliografía, postulamos que el SEC podría facilitar la formación de memorias asociativas entre el contexto y el estímulo aversivo cuando el grado de aversión es bajo o moderado, pero cuando este aumenta el SEC le pondría un freno al proceso señalizando a través del receptor CB1.

#### **4.3. ROL DEL SEC COMO MEDIADOR DE LOS EFECTOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA FORMACIÓN DE MEMORIAS EN LA PRUEBA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO**

Hasta el momento, algunos estudios demostraron que el sistema endocannabinoide podría mediar los efectos rápidos que los glucocorticoides ejercen sobre la consolidación de la memoria. Estos trabajos utilizaron estrategias farmacológicas para modular la señalización del CB1 y de esta manera caracterizar su rol en dichos procesos. Estudios realizados en modelos murinos mostraron que la administración post-entrenamiento del antagonista del CB1, AM251, bloquea el efecto facilitador de la corticosterona [84] y de la dexametasona [134]. En este trabajo utilizamos una herramienta distinta, la disrupción de la expresión del CB1 a través de la delección genética del gen que codifica para el receptor CB1 en ratones CD1. Nuestros resultados muestran que la expresión del CB1 sería necesaria para que la dexametasona aumente la latencia de retención en la prueba de evitamiento inhibitorio en experiencias de aversión moderada. A su vez, la expresión del CB1 también es necesaria para que los glucocorticoides aumenten los niveles de mRNA de Zif268 tanto en el hipocampo de

ratones CD1 WT como en la línea celular HT22. Estos resultados confirman y aportan evidencia acerca del rol del SEC, en particular del receptor CB1, como mediador de los efectos de los glucocorticoides sobre la consolidación de memorias aversivas.

#### 4.3.1. La dexametasona y el metabolismo de los endocannabinoides

El contenido de endocannabinoides (EC) se encuentra finamente regulado, y debido a la naturaleza lipofílica de estos compuestos, su liberación se produce a demanda. La concentración de EC en el espacio sináptico resulta del equilibrio entre su síntesis y su degradación. Hay varios trabajos publicados por el grupo de Tasker y col. en los que detectan un aumento en los niveles de AEA y 2-AG en cortes de hipotálamo frente al tratamiento con DEX 1  $\mu$ M por 10 min. En dichas publicaciones [71, 138] concluyen que la DEX induce la biosíntesis rápida de AEA y 2-AG, pero nunca estudian el mecanismo por el cual los GC ejercen este efecto, y no plantean que estos resultados también se podrían deber a una disminución en la degradación de los compuestos, teniendo en cuenta que se afirma que este es el punto clave que determina los niveles de estos cannabinoides.

En otro trabajo publicado por el grupo de Mc Ewen y col. [140] determinan que la administración subcutánea de CORT 3 mg/kg y 10 mg/kg aumenta el contenido de AEA, pero no de 2-AG en el hipocampo de ratas a los 10 min de tratamiento. También determinan el contenido de otras *N*-acetiletanolaminas (NAEs), palmitoiletanolamina (PEA) y oleoiletanolamina (OEA). El contenido de estos NAEs no se modificó ante el tratamiento con CORT. Ellos sugieren que estos resultados dan luz acerca de las rutas metabólicas implicadas en el mecanismo de acción de la CORT, y plantean que la vía de  $\alpha/\beta$ -hidrolasa-4 y glicerolfosfodiasterasa, quienes selectivamente aumentan la síntesis de NAEs poliinsaturados como la AEA, y no mono- o insaturados como PEA u OEA podría ser el blanco de los GC. Descartan la participación de la FAAH alegando que los tres NAEs son sustratos de esta enzima. Si bien la FAAH está implicada en la ruta catabólica de la OEA y la PEA [163], ante determinadas condiciones, esta enzima hidroliza preferentemente la AEA sobre estos otros NAEs [164]. El tratamiento con el inhibidor de la FAAH URB532 (10 mg/kg) en cerebros post-mortem de ratas de fenotipo salvaje disminuye de manera significativa el contenido de AEA pero no modifica significativamente los niveles de OEA y PEA [163]. El hecho de que el tratamiento con DEX aumente solamente los niveles de AEA, y este cambio no se vea acompañado de un aumento en el contenido de OEA y PEA no descarta la posibilidad de que los GC estén actuando mediante la inhibición de la FAAH.

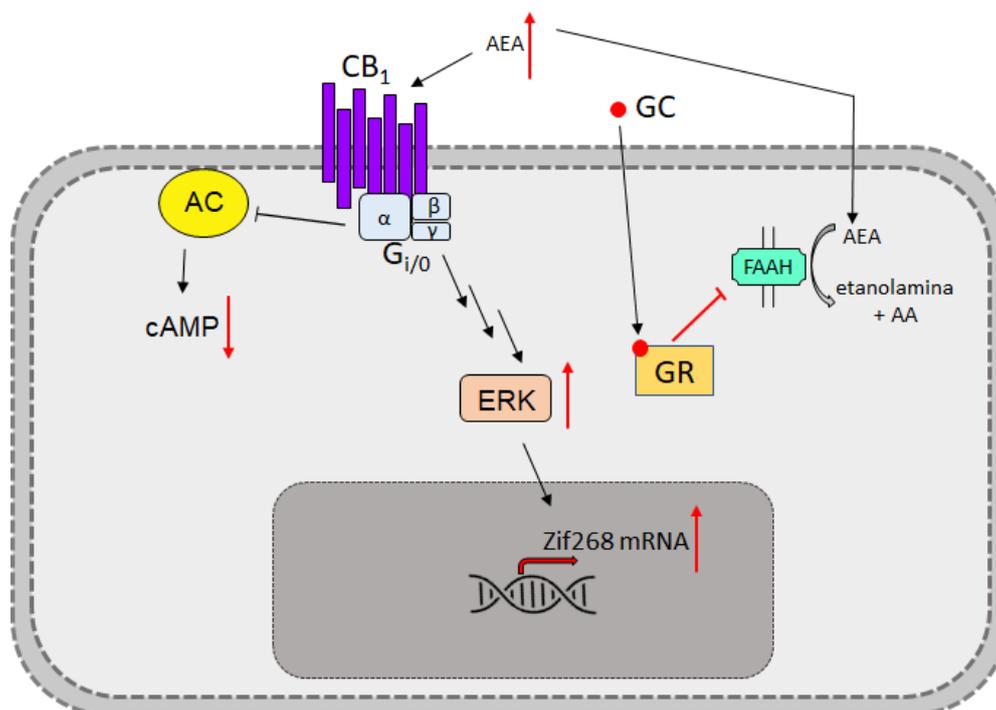
Los resultados presentados en este trabajo describen un mecanismo novedoso a través del cual los GC serían capaces de aumentar el contenido de AEA en la sinapsis neuronal, que hasta el momento había sido dejado de lado y descartado. Por primera vez se determina el efecto de los GC sobre la actividad de enzimas que participan de las rutas implicadas en el metabolismo de la AEA. Nuestros resultados *in vitro* concuerdan con la información publicada en bibliografía en cuanto a las concentraciones utilizadas y a los tiempos de tratamiento en los que se observaron los cambios en el

contenido de AEA en el hipocampo. Estos resultados se deben confirmar determinando la actividad de la FAAH en el hipocampo murino de los ratones CD1 WT ante el tratamiento con DEX, para verificar que el efecto observado en la línea celular HT22 también se encuentra presente en los modelos *in vivo*.

Confirmando este resultado, el tratamiento con dexametasona disminuye los niveles de AMPc en la línea celular HT22, efecto que resulta bloqueado por el antagonista O2050, siguiendo una cinética muy similar a la generada sobre la inhibición de la actividad de la FAAH. Estos resultados sugieren que la dexametasona aumenta el contenido de AEA en el cultivo celular a través de la inhibición de la FAAH, disminuyendo los niveles de AMPc a través de la activación del CB1 (Fig. 4.1).

#### 4.3.2. El modelo

Como ya mencionamos, hasta el momento se había propuesto que el sistema endocannabinoide mediaba los efectos de los GC regulando la liberación de neurotransmisores y la actividad del sistema GABAérgico [136]. Nuestros resultados proponen un nuevo mecanismo de acción, en donde la activación del GR induce la transcripción del gen que codifica para el factor de transcripción Zif268 mediante el aumento del contenido de anandamida en el espacio sináptico. El modelo planteado en este trabajo sugiere que, tras la unión del glucocorticoide a su receptor, este disminuye la actividad de la FAAH, una enzima que cataliza la hidrólisis anandamida, aumentando de este modo la concentración de AEA en el cultivo celular, la cual señalizando a través del receptor CB1, disminuye los niveles del segundo mensajero AMPc, aumenta la fosforilación de ERK y, a través de la activación de esta kinasa, induce la transcripción de Zif268 (Fig. 4.1). Vale mencionar que este mecanismo es propuesto en base a los resultados obtenidos tanto *in-vitro* como *in-vivo*, y que su papel en la consolidación de la memoria todavía debe ser evaluado. Sin embargo, la consistencia entre estos modelos y la información bibliográfica resultan alentadoras.



**Figura 4.1:** Mecanismo de acción propuesto para el efecto de los glucocorticoides sobre la transcripción de Zif268. Tras la unión de los GC a su receptor intracelular (GR), se inhibe la actividad de la FAAH y concomitantemente disminuye la hidrólisis del endocannabinoide anandamida (AEA). El aumento de AEA en el cultivo celular aumenta la señalización del receptor CB1, el cuál disminuye los niveles de AMPc, aumenta los niveles de fosforilación de ERK e induce la transcripción de Zif268.

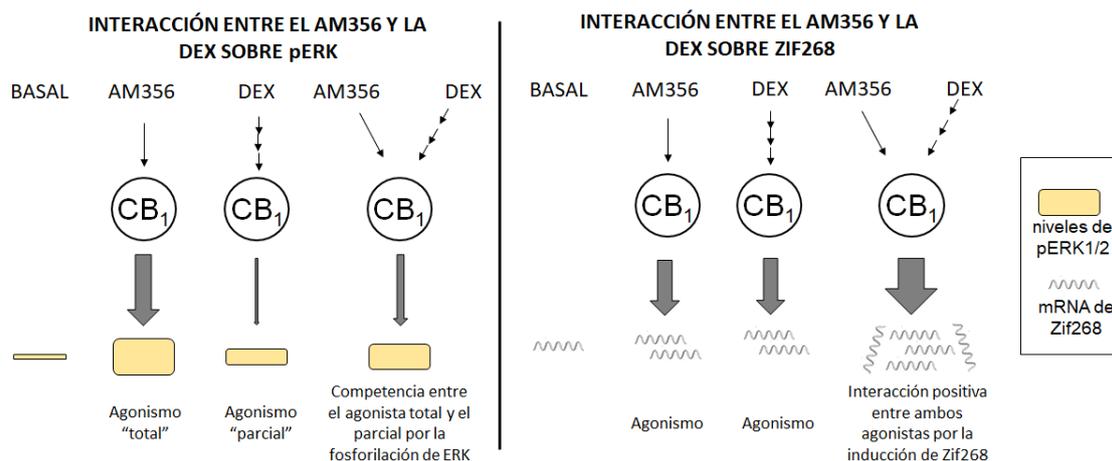
#### 4.4. INTERACCIÓN ENTRE EL CANNABINOIDE AM356 Y LOS GCs SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE ERK, EL mRNA DE ZIF268 Y LA RESPUESTA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO.

Nuestros resultados muestran que el agonista del CB1 AM356 potencia el efecto de la actividad del receptor a glucocorticoides sobre la latencia de retención en la prueba de evitamiento inhibitorio. Al haber administrado los compuestos post-entrenamiento descartamos que dicha interacción ocurra durante la etapa de adquisición de la memoria. Debido a que no controlamos los efectos de los ligandos ante la administración a las 6-8 hs post-entrenamiento, cuando se supone que ha concluido el período durante el cual la consolidación de la memoria puede ser modulada, no podemos descartar que las respuestas obtenidas no se deban en parte a la acción de los mismos a nivel de la evocación. Sin embargo, es probable que el efecto se encuentre a nivel de la consolidación ya que los glucocorticoides presentarían efectos opuestos a nivel de la consolidación y de la evocación de la memoria [165]. En este sentido, se ha demostrado que el estrés agudo por restricción del movimiento y la administración de dexametasona impiden la recuperación de la memoria a largo plazo al ser evaluada en la prueba de evitamiento inhibitorio [166].

La interacción positiva entre el AM356 y los GCs también ocurre cuando se evalúan los niveles de mRNA de Zif268, tanto en el hipocampo de ratones CD1 WT como en la línea celular HT22. Como es de esperar, esta interacción necesita de la señalización del CB1 debido a que no se expresa en los ratones KO para este receptor.

Tras haber observado que la interacción positiva entre el AM356 y los GC sobre la inducción del mRNA de Zif268 era bloqueada por el inhibidor de la activación de ERK PD98059, y que tanto el cannabinoide como la dexametasona aumentaban los niveles de fosforilación de esta kinasa, hipotetizamos que este era el punto de respuesta cruzada entre ambas vías. Sin embargo, cuando medimos los niveles de fosforilación de ERK ante el cotratamiento con ambos ligandos no se observó a ningún tiempo una interacción positiva. Por el contrario, la respuesta resultante parecía ser un valor intermedio entre el generado por el AM356 y la dexametasona, como si estos ligandos fueran una agonista total y un agonista parcial compitiendo por la fosforilación de esta kinasa.

Como hemos mencionado, en la línea celular HT22, es necesaria la activación de ERK para que el AM356 induzca la transcripción de Zif268. Hemos postulado un mecanismo de acción similar para la dexametasona, ya que el estímulo con este glucocorticoide aumenta de manera significativa la fosforilación de ERK a partir de los 15 min de tratamiento y el cotratamiento con el inhibidor de MEK PD98059 bloquea su efecto sobre el mensajero de Zif268. Lo más interesante es que ambas respuestas (la activación de ERK y la transcripción de Zif268), se pierden al silenciar el receptor CB1 con un RNA de interferencia. Esto sugiere que los efectos del GR sobre ERK y Zif268 se encuentran intrínsecamente relacionados con sus efectos sobre la FAAH y probablemente estén mediados por el aumento del contenido del endocannabinoide anandamida en el cultivo celular (Fig. 4.1). En este sentido, lo que podría estar ocurriendo a nivel molecular es que al cotratarse las células con AM356 y dexametasona, se generaría una competencia entre el AM356 y la AEA sobre la activación de ERK a través del receptor CB1. Este modelo se encuentra esquematizado en la figura 4.2. Si bien ambos ligandos actúan a través de la activación de ERK, debe existir otra respuesta cruzada entre ambas vías de señalización que justifique la interacción positiva a nivel de la transcripción de Zif268 ya que estos ligandos o sus intermediarios compiten entre sí por la fosforilación de ERK pero sus efectos sobre los niveles de mRNA de Zif268 se potencian (Fig. 4.2). Si bien nuestros resultados apuntan a que el receptor de glucocorticoides regula la transcripción de Zif268 a través de la disminución de la degradación de la anandamida, no puede descartarse la existencia de otros mecanismos concomitantes por los cuales los cannabinoides y los glucocorticoides interfieran entre sí para modular este proceso que se encuentren río abajo de la señalización del CB1.



**Figura 4.2:** Esquemización del efecto del cotratamiento con AM356 y dexametasona sobre los niveles de fosforilación de ERK (izquierda) y del mensajero de Zif268 (derecha) en la línea celular HT22.

#### 4.5. INTERACCIÓN ENTRE EL CANNABINOIDE AM251 Y LOS GCs SOBRE LA FORMACIÓN DE MEMORIAS AVERSIVAS, LA FOSFORILACIÓN DE ERK Y EL mRNA DE ZIF268

Como hemos desarrollado anteriormente, al igual que para el AM356, nuestros resultados demuestran que tanto el AM251 como los GCs aumentan la transcripción de Zif268 en la línea celular HT22. Al estudiar la interacción entre ambos ligandos sobre este proceso se encontró que el cotratamiento presenta efectos opuestos dependiendo del tiempo de estímulo: a los 20 min se observa una interacción positiva entre el AM251 y los GCs (etapa potenciadora) mientras que a partir de los 30 minutos el cotratamiento induce niveles de mRNA similares los basales (etapa inhibitoria).

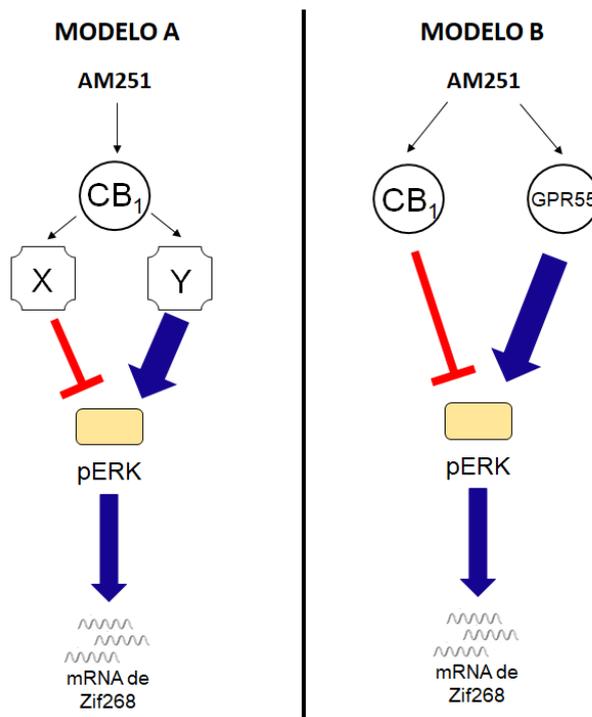
Al igual que para el AM356, la interacción positiva entre el AM251 y los GCs sobre la inducción del mRNA de Zif268 es bloqueada por el inhibidor de la activación de ERK PD98059 y el tratamiento con AM251 aumenta los niveles de fosforilación de esta kinasa a partir de los 15 minutos de tratamiento. En base a estos resultados hipotetizamos que ERK era el punto de contacto que determinaría la respuesta cruzada entre ambas vías durante la etapa potenciadora. Sin embargo, paradójicamente, cuando medimos los niveles de fosforilación de esta kinasa ante el cotratamiento con ambos ligandos la respuesta se revirtió por completo pasando de aumentar la fosforilación de ERK a disminuirla por debajo de los valores basales a todos los tiempos medidos (10-45 min). En este sentido, no deja de ser sorprendente como muchas veces las predicciones formuladas a priori no se condicen con los resultados obtenidos en los sistemas experimentales. Si bien estos resultados refutan la teoría de que ERK es necesaria para la respuesta cruzada entre el AM251 y los glucocorticoides en la etapa potenciadora, sugieren que esta kinasa podría estar involucrada en la etapa inhibitoria.

Ahora bien, encontrar un mecanismo que explique esta interacción negativa tanto a nivel de la fosforilación de ERK como del RNA de Zif268 resulta complejo. Es inesperado encontrar en sistemas biológicos estímulos que generen señales positivas *per se* pero que al coexistir desencadenen una señal negativa. Un primer indicio para plantear un mecanismo para este efecto paradójico es que, a los 5 min de tratamiento, el AM251 disminuye en un 50% la fosforilación basal de ERK de manera significativa, mientras que a partir de los 10 min de tratamiento esta respuesta se revierte por completo, alcanzando valores máximos a los 20 minutos de un 250% con respecto al basal. Este resultado sugiere que el AM251 podría estar señalizando sobre ERK a través de dos vías, una inhibitoria y otra activadora con cinéticas diferentes, cuya respuesta resultante dependerá de la señal que prevalezca.

Si bien ambas vías podrían encontrarse río abajo del receptor CB1 (X e Y en la Fig. 4.3 Modelo A) se ha descrito que el AM251, además de unirse a este receptor también actúa como agonista del receptor GPR55, acoplado clásicamente a la proteína Gq. En un modelo de células HEK293 que expresan de manera estable el CB1, se ha observado que estimulando las células durante 15 minutos con AM251, este ligando atenúa la fosforilación basal de pERK1/2, con una pEC50 de  $8,2 \pm 0,4$  [167]. Ese mismo año, se caracterizó también el efecto del AM251 sobre la activación de ERK señalizando a través del receptor GPR55, utilizando células HEK293 transfectadas de manera estable con dicho receptor. En este modelo, se observó una activación de ERK concentración dependiente con una pEC50 de  $6,3 \pm 0,3$  a los 25 min de tratamiento con AM251 [168].

Si bien no hemos determinado la expresión del GPR55 en la línea celular HT22, se ha demostrado que se expresa en el hipocampo murino, y no podemos descartar que la señal medida sea la resultante de la interacción del AM251 tanto con este receptor como con el CB1. En este caso, un posible candidato para "X" sería el CB1, mientras que el GPR55 podría ser "Y" (Fig. 4.3 Modelo B). Por supuesto, esto no quita que otras macromoléculas puedan ser las responsables de esta respuesta celular.

Teniendo en cuenta que el mediador de los efectos de la dexametasona sobre ERK probablemente sea la anandamida, ambos modelos podrían predecir, considerando ciertos valores de afinidad y eficacia que, ante el agregado del glucocorticoide, la AEA podría competir con el AM251 por la unión a estos receptores de modo tal que termine prevaleciendo la señal inhibitoria por sobre la activadora. Debido a que no contamos con estos parámetros, plantear un modelo de competencia entre la AEA y el AM251 resulta demasiado especulativo. En principio, nuestra perspectiva a futuro es cuantificar el contenido de AEA ante el agregado de dexametasona e identificar cuáles son los receptores involucrados en la señalización del AM251 sobre ERK.



**Figura 4.3:** Esquematación de los mecanismos de acción propuestos para la regulación de la fosforilación de ERK y el aumento de los niveles de mRNA de Zif268 para el cannabinoide AM251.

Más allá del modelo o del mecanismo que explique los efectos observados, resulta muy interesante destacar cómo en presencia de la DEX, el efecto del AM251 se revierte por completo y pasa de inducir la activación de ERK y la transcripción de Zif268 a inhibir ambos procesos en presencia de los GC. En bibliografía se observa un comportamiento ambiguo para el AM251 sobre la consolidación de memorias evaluadas en pruebas de condicionamiento clásico, y el efecto parecería guardar una correlación con el grado de aversión de la prueba (amperaje del shock eléctrico). En ensayos de condicionamiento clásico, al utilizar una intensidad de shock eléctrico moderada (0,2-0,4 mA), el AM251 facilita la consolidación de la memoria, mientras que al utilizar valores altos de intensidad (0,6-1 mA) se observa un efecto amnésico (Tabla 4.1).

Intensidad del shock (mA)	Prueba cognitiva	Momento de administración	Efecto	Cita
0,2	EI	post-entrenamiento	facilitador	Kruk-Slomka 2016
0,3	CM	post-entrenamiento	no tiene efecto	Oliveira 2010
0,4	CM	pre-entrenamiento	facilitador	KS Sink 2010
0,6	EI	post-entrenamiento	disruptivo	Campolongo 2009
0,7	CM	post-entrenamiento	disruptivo	Oliveira 2010
1,0	CM	pre-entrenamiento	disruptivo	Arenos 2006

**Tabla 4.1:** Efecto de la administración del agonista inverso del CB1 AM251 sobre la adquisición y consolidación de memorias aversivas. EI: evitación inhibitoria. CM: condicionamiento de miedo.

En particular, el trabajo de de Oliveira Alvarez y col. [134] estudió la interacción entre el grado de aversión de la prueba de condicionamiento de miedo al contexto y el efecto del AM251, utilizando dos protocolos con distintas intensidades de shock eléctrico. La administración de AM251 en el hipocampo luego de la sesión de entrenamiento resultó amnésica solo en el protocolo de alta intensidad de shock eléctrico. También observaron que la infusión de AM251 bloquea el efecto facilitador de la DEX sobre la consolidación de la memoria. Si bien ellos le atribuyen este efecto a que en presencia del AM251 el SEC no sería capaz de mediar los efectos de los glucocorticoides sobre la consolidación de la memoria, un mecanismo similar al que nosotros observamos en el ratón KO para el receptor CB1, esto no explica por qué en algunos casos el AM251 es capaz de facilitar la consolidación de la memoria [133].

El grado de aversión de la prueba conductual (intensidad del shock) y la respuesta de condicionamiento clásico parecería guardar relaciones opuestas si comparamos el efecto de “bloquear” farmacológicamente al CB1 con su agonista inverso AM251 o de deletar genéticamente a este receptor. Esto se podría deber a varios motivos. Por un lado, como hemos mencionado, en los ratones KO no se puede estudiar exclusivamente el efecto de la delección genética sobre la consolidación de la memoria, sino que también se ven implicadas las fases de adquisición y de evocación. Por otro lado, tratar a un animal con un agonista inverso no implica anular la señalización de su receptor blanco. Como bien hemos caracterizado en la línea celular HT22, el AM251 no es un mero antagonista del CB1, sino que activa cascadas de señalización que se traducen en respuestas genómicas que podrían estar implicadas en la formación de memorias aversivas.

En base a nuestros resultados, el mecanismo de acción propuesto para el AM251 y la información presente en bibliografía hipotetizamos que, ante un bajo nivel de aversión, el AM251 facilita la consolidación de la memoria. A medida que aumenta el grado de aversión y concomitantemente la concentración de GCs en SNC, el equilibrio de su señalización celular se desplaza hacia las vías inhibitorias involucradas en los procesos relacionados con la consolidación de la memoria, prevaleciendo su efecto amnésico.

#### **4.6. RELEVANCIA CLÍNICA**

Encontrar compuestos que inhiban la consolidación de la memoria resulta de gran interés para el tratamiento farmacológico preventivo de desórdenes de ansiedad, tales como el trastorno de estrés post-traumático (TEPT) y ciertas fobias. Existe evidencia para postular al condicionamiento clásico como un proceso involucrado en la etiología y el mantenimiento de estos desórdenes [76].

Las encuestas World Mental Health del año 2014, iniciativa de la Organización Mundial de la Salud, documentan diferencias entre la prevalencia de exposición a eventos traumáticos (73,8%-54%) y del TEPT (8,8%-1,3%). Estos rangos corresponden a los

valores máximos y mínimos informados por los distintos países que participaron en las encuestas [169]. Estos datos reflejan que la exposición a un evento traumático, si bien es necesaria, no alcanza para desarrollar el cuadro. Hasta el momento se desconoce la etiología de este trastorno, pero se postula que presenta causas multifactoriales y que su prevalencia depende de la naturaleza y la intensidad de la experiencia traumática y de factores que determinan la predisposición del individuo (niveles elevados de ansiedad, comportamiento inhibitorio, carga genética, experiencias vividas durante la niñez, etc.) [142].

Los tratamientos actuales para los desórdenes de ansiedad consisten en psicoterapia y en terapia farmacológica con antidepresivos (benzodiazepinas) y ansiolíticos (serotonina u otros inhibidores de la recaptación de monoaminas). El tratamiento farmacológico se orienta a aliviar los síntomas de tipo ansioso y no a atacar la causa del desorden. Los únicos fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento del TEPT son la paroxetina y la sertralina, con los cuales alrededor de un 20 a un 30% de los pacientes alcanzan la remisión del cuadro clínico [170, 171]. Hasta el momento, el desarrollo de los fármacos que se encuentran en uso clínico se ha basado en la observación de los efectos de drogas aprobadas para otras indicaciones, por lo que no debe sorprender que los tratamientos farmacológicos disponibles ataquen la sintomatología y tengan una eficacia baja.

En este marco, se ha planteado como nueva estrategia para el diseño racional de fármacos la elección de procesos de consolidación de memoria como blancos farmacológicos para la prevención del desarrollo del TEPT [172]. En referencia al condicionamiento clásico Pavloviano como causa del TEPT, dos teorías son aceptadas: que el TEPT se desencadena debido i) a la formación de una memoria excesivamente fuerte, ii) a que los procesos de actualización de la memoria (reconsolidación – extinción) son deficientes.

Al momento no se registran datos clínicos acerca del efecto de la inhibición de la consolidación ante un evento traumático mediante el bloqueo farmacológico de receptor de glucocorticoides. Sin embargo, sí se ha estudiado el efecto de la administración de altas dosis de corticoides como terapia preventiva para evitar el desarrollo de TEPT ante la exposición a un evento traumático. En este contexto, un estudio preliminar mostró que una única dosis de cortisol (100-140 mg dependiendo del peso del individuo) administrada antes de que se cumplan las 6 horas del trauma, redujo el riesgo de desarrollar TEPT. El estudio se realizó con 17 pacientes (placebo N=8; cortisol N=9) que en su gran mayoría habían sufrido accidentes automovilísticos [173]. Este efecto del cortisol se puede atribuir a los efectos disruptivos observados para altas dosis de corticosterona sobre la consolidación de memorias evaluadas en las pruebas de evitamiento inhibitorio y condicionamiento de miedo.

Teniendo en cuenta que tanto la activación de ERK [37, 153, 154] como la inducción de Zif268 [4, 44] serían necesarias para la consolidación de memorias aversivas, y que el cotratamiento con AM251 y dexametasona presenta un efecto inhibitorio sobre ERK en la línea celular HT22 y sobre Zif268 tanto *in vitro* como en el hipocampo murino, puede postularse que una terapia combinada con altas dosis de dexametasona y algún antagonista del receptor CB1 de uso en humanos podría ser de utilidad para el tratamiento preventivo de trastorno de estrés post-traumático.

#### 4.7. CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

La evidencia molecular presentada acerca de la interacción entre los sistemas glucocorticoide y endocannabinoide abre numerosos caminos e invita a profundizar el estudio pensando en una potencial aplicación para el tratamiento del trastorno de estrés post-traumático combinando un glucocorticoide y un análogo del AM251.

Los ensayos realizados permitieron alcanzar los objetivos planteados, caracterizando la interacción entre ligandos del receptor CB1 y del GR a nivel conductual sobre la respuesta de evitamiento inhibitorio, y a nivel molecular sobre la actividad de la FAAH, la fosforilación de ERK y la expresión del mensajero de Zif268. Nuestros resultados ponen de manifiesto la complejidad de los sistemas neuronales y la necesidad de estudiar las vías de señalización en su conjunto. Conocer cómo las señales se integran y se transforman en una respuesta conductual determinada resulta fundamental para comprender los mecanismos que subyacen la consolidación de memorias. En ese sentido este trabajo pretende ser un grano de arena en el conocimiento de la neurobiología molecular.

Sobre la base de los reportes bibliográficos y los resultados experimentales presentados, quedan pendientes varias tareas e interrogantes. En tal sentido nos planteamos como perspectivas a corto plazo los siguientes puntos:

- Estudiar si la DEX también es capaz de inhibir la actividad de la FAAH en el hipocampo murino de ratones CD1 WT. Hasta el momento, el mecanismo por el cual los GC aumentan el contenido de EC en hipotálamo e hipocampo no ha sido dilucidado. Caracterizar el efecto de la CORT, glucocorticoide endógeno, sobre la actividad de la FAAH, tanto *in vitro* en la línea celular HT22 como *in vivo* en el hipocampo murino.
- Cuantificar los niveles de AEA y 2-AG ante el agregado de DEX y CORT en el cultivo celular de HT22, para confirmar que la inhibición de la FAAH induce un incremento en el contenido de estos EC en el medio de cultivo.
- Determinar el efecto de la AEA sobre la activación de ERK y la transcripción de Zif268, para confirmar el rol del sistema endocannabinoide en la modulación de

este gen. Si bien el AM356 es su análogo estable, hay que confirmar el efecto del endocannabinoide.

- Estudiar cuáles son las moléculas implicadas en la activación de ERK inducida por el AM251, utilizando distintas estrategias. Por un lado, evaluar la respuesta del AM251 tanto a nivel de ERK como sobre la transcripción de Zif268 al silenciar el CB1. Por otro lado, determinar las mismas respuestas, pero en presencia de antagonistas específicos de los distintos receptores cannabinoides (O-2050 para el CB1, CID16020046 para el GPR55).
- Estudiar el efecto de altas concentraciones de DEX y CORT sobre la transcripción de Zif268 en la línea celular HT22 para evaluar si al igual que sobre la respuesta de evitamiento inhibitorio presentan una dependencia de la concentración con forma de U invertida.

## **5.BIBLIOGRAFÍA**

1. Kandel, E.R. and L.R. Squire, *Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind*. Science, 2000. **290**(5494): p. 1113-20.
2. Roozendaal, B. and J.L. McGaugh, *Memory modulation*. Behav Neurosci, 2011. **125**(6): p. 797-824.
3. Lechner, H.A., L.R. Squire, and J.H. Byrne, *100 years of consolidation--remembering Muller and Pilzecker*. Learn Mem, 1999. **6**(2): p. 77-87.
4. Katche, C., et al., *Maintenance of long-term memory storage is dependent on late posttraining Egr-1 expression*. Neurobiol Learn Mem, 2012. **98**(3): p. 220-7.
5. Flexner, J.B., L.B. Flexner, and E. Stellar, *Memory in mice as affected by intracerebral puromycin*. Science, 1963. **141**(3575): p. 57-9.
6. Roozendaal, B., et al., *Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11642-7.
7. Bradley, M.M., et al., *Remembering pictures: pleasure and arousal in memory*. J Exp Psychol Learn Mem Cogn, 1992. **18**(2): p. 379-90.
8. Cahill, L. and J.L. McGaugh, *A novel demonstration of enhanced memory associated with emotional arousal*. Conscious Cogn, 1995. **4**(4): p. 410-21.
9. van Ast, V.A., et al., *Modulatory mechanisms of cortisol effects on emotional learning and memory: novel perspectives*. Psychoneuroendocrinology, 2013. **38**(9): p. 1874-82.
10. Sweatt, J.D., *Mechanisms of Memory*. Second ed. 2010: ELSEVIER.
11. Sanchez-Resendis, O., et al., *Glucocorticoid-cholinergic interactions in the dorsal striatum in memory consolidation of inhibitory avoidance training*. Front Behav Neurosci, 2012. **6**: p. 33.
12. Baarendse, P.J., et al., *Differential involvement of the dorsal hippocampus in passive avoidance in C57bl/6J and DBA/2J mice*. Hippocampus, 2008. **18**(1): p. 11-9.
13. Burwell, R.D., et al., *Corticohippocampal contributions to spatial and contextual learning*. J Neurosci, 2004. **24**(15): p. 3826-36.
14. McGaugh, J.L., *The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences*. Annu Rev Neurosci, 2004. **27**: p. 1-28.
15. Izquierdo, I., et al., *Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation*. Trends Neurosci, 2006. **29**(9): p. 496-505.
16. Goelet, P., et al., *The long and the short of long-term memory--a molecular framework*. Nature, 1986. **322**(6078): p. 419-22.
17. Davis, H.P. and L.R. Squire, *Protein synthesis and memory: a review*. Psychol Bull, 1984. **96**(3): p. 518-59.
18. Montarolo, P.G., et al., *A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in Aplysia*. Science, 1986. **234**(4781): p. 1249-54.
19. Kang, H., et al., *An important role of neural activity-dependent CaMKIV signaling in the consolidation of long-term memory*. Cell, 2001. **106**(6): p. 771-83.
20. Bourtchuladze, R., et al., *Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein*. Cell, 1994. **79**(1): p. 59-68.
21. Jones, M.W., et al., *A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories*. Nat Neurosci, 2001. **4**(3): p. 289-96.
22. Levenson, J.M., et al., *A bioinformatics analysis of memory consolidation reveals involvement of the transcription factor c-rel*. J Neurosci, 2004. **24**(16): p. 3933-43.
23. Cole, A.J., et al., *Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation*. Nature, 1989. **340**(6233): p. 474-6.
24. Steward, O. and P.F. Worley, *Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation*. Neuron, 2001. **30**(1): p. 227-40.
25. Abraham, W.C., et al., *Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation*. Neuroscience, 1993. **56**(3): p. 717-27.

26. Chung, L., *A Brief Introduction to the Transduction of Neural Activity into Fos Signal*. Dev Reprod, 2015. **19**(2): p. 61-7.
27. Kandel, E.R., *The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses*. Science, 2001. **294**(5544): p. 1030-8.
28. Ahmed, T. and J.U. Frey, *Plasticity-specific phosphorylation of CaMKII, MAP-kinases and CREB during late-LTP in rat hippocampal slices in vitro*. Neuropharmacology, 2005. **49**(4): p. 477-92.
29. Wu, H., Y. Zhou, and Z.Q. Xiong, *Transducer of regulated CREB and late phase long-term synaptic potentiation*. Febs j, 2007. **274**(13): p. 3218-23.
30. Eliot, L.S., et al., *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin sensitivity may be common to all forms of neural adenylate cyclase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(23): p. 9564-8.
31. Impey, S., et al., *Cross talk between ERK and PKA is required for Ca<sup>2+</sup> stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation*. Neuron, 1998. **21**(4): p. 869-83.
32. Sanderson, T.M., et al., *Hippocampal metabotropic glutamate receptor long-term depression in health and disease: focus on mitogen-activated protein kinase pathways*. J Neurochem, 2016. **139** Suppl 2: p. 200-214.
33. Turu, G. and L. Hunyady, *Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor*. J Mol Endocrinol, 2010. **44**(2): p. 75-85.
34. Xue, B., et al., *Regulation of synaptic MAPK/ERK phosphorylation in the rat striatum and medial prefrontal cortex by dopamine and muscarinic acetylcholine receptors*. J Neurosci Res, 2015. **93**(10): p. 1592-9.
35. Takeda, K., et al., *5-HT<sub>7</sub> receptor-mediated fear conditioning and possible involvement of extracellular signal-regulated kinase*. Neurosci Lett, 2017. **638**: p. 69-75.
36. Scheiderer, C.L., et al., *Coactivation of M(1) muscarinic and alpha1 adrenergic receptors stimulates extracellular signal-regulated protein kinase and induces long-term depression at CA3-CA1 synapses in rat hippocampus*. J Neurosci, 2008. **28**(20): p. 5350-8.
37. Lonze, B.E. and D.D. Ginty, *Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system*. Neuron, 2002. **35**(4): p. 605-23.
38. Mayr, B. and M. Montminy, *Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(8): p. 599-609.
39. Davis, S., et al., *The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo*. J Neurosci, 2000. **20**(12): p. 4563-72.
40. Veyrac, A., et al., *The transcription factor Zif268/Egr1, brain plasticity, and memory*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2014. **122**: p. 89-129.
41. Wisden, W., et al., *Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord*. Neuron, 1990. **4**(4): p. 603-14.
42. Zalcman, G., et al., *Nuclear factor kappa B-dependent Zif268 expression in hippocampus is required for recognition memory in mice*. Neurobiol Learn Mem, 2015. **119**: p. 10-7.
43. Barry, D.N. and S. Commins, *Temporal dynamics of immediate early gene expression during cellular consolidation of spatial memory*. Behav Brain Res, 2017. **327**: p. 44-53.
44. Besnard, A., S. Laroche, and J. Caboche, *Comparative dynamics of MAPK/ERK signalling components and immediate early genes in the hippocampus and amygdala following contextual fear conditioning and retrieval*. Brain Struct Funct, 2014. **219**(1): p. 415-30.
45. Thiel, G., S. Schoch, and D. Petersohn, *Regulation of synapsin I gene expression by the zinc finger transcription factor zif268/egr-1*. J Biol Chem, 1994. **269**(21): p. 15294-301.
46. Das, A.T., et al., *Isolation and characterization of the rat gene encoding glutamate dehydrogenase*. Eur J Biochem, 1993. **211**(3): p. 795-803.

47. Kleiman, A. and J.P. Tuckermann, *Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: lessons from conditional knockout mice*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **275**(1-2): p. 98-108.
48. Buckingham, J.C., *Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S258-68.
49. Keeney, G.E., et al., *Dexamethasone for acute asthma exacerbations in children: a meta-analysis*. Pediatrics, 2014. **133**(3): p. 493-9.
50. Zhou, J. and J.A. Cidlowski, *The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses*. Steroids, 2005. **70**(5-7): p. 407-17.
51. Lu, N.Z. and J.A. Cidlowski, *Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes*. Mol Cell, 2005. **18**(3): p. 331-42.
52. Morimoto, M., et al., *Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study*. Neurosci Res, 1996. **26**(3): p. 235-69.
53. Chwang, W.B., et al., *The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation*. J Neurosci, 2007. **27**(46): p. 12732-42.
54. Pratt, W.B., et al., *Role of molecular chaperones in steroid receptor action*. Essays Biochem, 2004. **40**: p. 41-58.
55. Galliher-Beckley, A.J. and J.A. Cidlowski, *Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease*. IUBMB Life, 2009. **61**(10): p. 979-86.
56. Vandevyver, S., L. Dejager, and C. Libert, *On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back*. Traffic, 2012. **13**(3): p. 364-74.
57. Grontved, L., et al., *C/EBP maintains chromatin accessibility in liver and facilitates glucocorticoid receptor recruitment to steroid response elements*. Embo j, 2013. **32**(11): p. 1568-83.
58. Gronemeyer, H. and W. Bourguet, *Allosteric effects govern nuclear receptor action: DNA appears as a player*. Sci Signal, 2009. **2**(73): p. pe34.
59. Lim, H.W., et al., *Genomic redistribution of GR monomers and dimers mediates transcriptional response to exogenous glucocorticoid in vivo*. Genome Res, 2015. **25**(6): p. 836-44.
60. Surjit, M., et al., *Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor*. Cell, 2011. **145**(2): p. 224-41.
61. Ratman, D., et al., *How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering*. Mol Cell Endocrinol, 2013. **380**(1-2): p. 41-54.
62. Almawi, W.Y. and O.K. Melemedjian, *Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(1): p. 9-15.
63. Necela, B.M. and J.A. Cidlowski, *Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells*. Proc Am Thorac Soc, 2004. **1**(3): p. 239-46.
64. Polman, J.A., et al., *A genome-wide signature of glucocorticoid receptor binding in neuronal PC12 cells*. BMC Neurosci, 2012. **13**: p. 118.
65. Croxtall, J.D., Q. Choudhury, and R.J. Flower, *Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism*. Br J Pharmacol, 2000. **130**(2): p. 289-98.
66. Losel, R., et al., *Rapid effects of aldosterone on vascular cells: clinical implications*. Steroids, 2004. **69**(8-9): p. 575-8.

67. Buttgereit, F. and A. Scheffold, *Rapid glucocorticoid effects on immune cells*. Steroids, 2002. **67**(6): p. 529-34.
68. Liu, X.H., et al., *Rapid inhibition of ATP-induced currents by corticosterone in rat dorsal root ganglion neurons*. Pharmacology, 2008. **82**(2): p. 164-70.
69. Bartholome, B., et al., *Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis*. Faseb j, 2004. **18**(1): p. 70-80.
70. Ayrout, M., et al., *A novel non genomic glucocorticoid signaling mediated by a membrane palmitoylated glucocorticoid receptor cross talks with GnRH in gonadotrope cells*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 1537.
71. Malcher-Lopes, R., et al., *Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release*. J Neurosci, 2006. **26**(24): p. 6643-50.
72. Qi, A.Q., et al., *Rapid activation of JNK and p38 by glucocorticoids in primary cultured hippocampal cells*. J Neurosci Res, 2005. **80**(4): p. 510-7.
73. Li, X., et al., *Corticosterone-induced rapid phosphorylation of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in PC12 cells*. FEBS Lett, 2001. **492**(3): p. 210-4.
74. Revest, J.M., et al., *The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids*. Nat Neurosci, 2005. **8**(5): p. 664-72.
75. Taylor, V.A., et al., *The effects of glucocorticoids on the inhibition of emotional information: A dose-response study*. Biol Psychol, 2011. **86**(1): p. 17-25.
76. de Quervain, D., L. Schwabe, and B. Roozendaal, *Stress, glucocorticoids and memory: implications for treating fear-related disorders*. Nat Rev Neurosci, 2017. **18**(1): p. 7-19.
77. Diamond, D.M., et al., *The temporal dynamics model of emotional memory processing: a synthesis on the neurobiological basis of stress-induced amnesia, flashbulb and traumatic memories, and the Yerkes-Dodson law*. Neural Plast, 2007. **2007**: p. 60803.
78. Buchanan, T.W., D. Tranel, and R. Adolphs, *Impaired memory retrieval correlates with individual differences in cortisol response but not autonomic response*. Learn Mem, 2006. **13**(3): p. 382-7.
79. Coluccia, D., et al., *Glucocorticoid therapy-induced memory deficits: acute versus chronic effects*. J Neurosci, 2008. **28**(13): p. 3474-8.
80. Okuda, S., B. Roozendaal, and J.L. McGaugh, *Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(3): p. 853-8.
81. Zorawski, M. and S. Killcross, *Posttraining glucocorticoid receptor agonist enhances memory in appetitive and aversive Pavlovian discrete-cue conditioning paradigms*. Neurobiol Learn Mem, 2002. **78**(2): p. 458-64.
82. Lupien, S.J. and B.S. McEwen, *The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies*. Brain Res Brain Res Rev, 1997. **24**(1): p. 1-27.
83. Roozendaal, B., G. Portillo-Marquez, and J.L. McGaugh, *Basolateral amygdala lesions block glucocorticoid-induced modulation of memory for spatial learning*. Behav Neurosci, 1996. **110**(5): p. 1074-83.
84. Campolongo, P., et al., *Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(12): p. 4888-93.
85. Reul, J.M., et al., *Epigenetic mechanisms in the dentate gyrus act as a molecular switch in hippocampus-associated memory formation*. Epigenetics, 2009. **4**(7): p. 434-9.
86. Reul, J.M., *Making memories of stressful events: a journey along epigenetic, gene transcription, and signaling pathways*. Front Psychiatry, 2014. **5**: p. 5.
87. Pagotto, U. and R. Pasquali, *Endocannabinoids and energy metabolism*. J Endocrinol Invest, 2006. **29**(3 Suppl): p. 66-76.

88. Maccarrone, M., et al., *Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC*. Trends Pharmacol Sci, 2015. **36**(5): p. 277-96.
89. Devane, W.A., et al., *Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1946-9.
90. Sugiura, T., et al., *2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **215**(1): p. 89-97.
91. Di Marzo, V. and L. De Petrocellis, *Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand?* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2012. **367**(1607): p. 3216-28.
92. Battista, N., et al., *The endocannabinoid system: an overview*. Front Behav Neurosci, 2012. **6**: p. 9.
93. Zygmunt, P.M., et al., *Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide*. Nature, 1999. **400**(6743): p. 452-7.
94. Pacher, P., S. Batkai, and G. Kunos, *The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(3): p. 389-462.
95. Kano, M., et al., *Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission*. Physiol Rev, 2009. **89**(1): p. 309-80.
96. Murataeva, N., A. Straiker, and K. Mackie, *Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(6): p. 1379-91.
97. Gerdeman, G. and D.M. Lovinger, *CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum*. J Neurophysiol, 2001. **85**(1): p. 468-71.
98. Hoffman, A.F. and C.R. Lupica, *Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus*. J Neurosci, 2000. **20**(7): p. 2470-9.
99. Huang, H., et al., *FABP1: A Novel Hepatic Endocannabinoid and Cannabinoid Binding Protein*. Biochemistry, 2016. **55**(37): p. 5243-55.
100. Blankman, J.L., G.M. Simon, and B.F. Cravatt, *A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol*. Chem Biol, 2007. **14**(12): p. 1347-56.
101. Rouzer, C.A. and L.J. Marnett, *Endocannabinoid oxygenation by cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochromes P450: cross-talk between the eicosanoid and endocannabinoid signaling pathways*. Chem Rev, 2011. **111**(10): p. 5899-921.
102. Gaoni, Y. and R. Mechoulam, *Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish*. Journal of the American Chemical Society, 1964. **86**(8): p. 1646-1647.
103. Devane, W.A., et al., *Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain*. Mol Pharmacol, 1988. **34**(5): p. 605-13.
104. Matsuda, L.A., et al., *Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA*. Nature, 1990. **346**(6284): p. 561-4.
105. Shire, D., et al., *An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing*. J Biol Chem, 1995. **270**(8): p. 3726-31.
106. Ryberg, E., et al., *Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB1 receptor*. FEBS Lett, 2005. **579**(1): p. 259-64.
107. Straiker, A., et al., *Differential signalling in human cannabinoid CB1 receptors and their splice variants in autaptic hippocampal neurones*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(8): p. 2660-71.
108. Liu, Q.R., et al., *Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands*. Genes Brain Behav, 2009. **8**(5): p. 519-30.
109. Pertwee, R.G., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2)*. Pharmacol Rev, 2010. **62**(4): p. 588-631.

110. Moriconi, A., et al., *GPR55: Current knowledge and future perspectives of a purported "Type-3" cannabinoid receptor*. *Curr Med Chem*, 2010. **17**(14): p. 1411-29.
111. Mackie, K., *Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system*. *Handb Exp Pharmacol*, 2005(168): p. 299-325.
112. Katona, I., et al., *Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons*. *J Neurosci*, 1999. **19**(11): p. 4544-58.
113. Maroso, M., et al., *Cannabinoid Control of Learning and Memory through HCN Channels*. *Neuron*, 2016. **89**(5): p. 1059-73.
114. Stella, N., *Endocannabinoid signaling in microglial cells*. *Neuropharmacology*, 2009. **56 Suppl 1**: p. 244-53.
115. Castillo, P.E., et al., *Endocannabinoid signaling and synaptic function*. *Neuron*, 2012. **76**(1): p. 70-81.
116. Tam, J., et al., *The cannabinoid CB1 receptor regulates bone formation by modulating adrenergic signaling*. *Faseb j*, 2008. **22**(1): p. 285-94.
117. Pertwee, R.G., *Cannabinoids and the gastrointestinal tract*. *Gut*, 2001. **48**(6): p. 859-67.
118. Engeli, S., et al., *Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity*. *Diabetes*, 2005. **54**(10): p. 2838-43.
119. Galiegue, S., et al., *Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations*. *Eur J Biochem*, 1995. **232**(1): p. 54-61.
120. Munro, S., K.L. Thomas, and M. Abu-Shaar, *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids*. *Nature*, 1993. **365**(6441): p. 61-5.
121. Wright, K.L., M. Duncan, and K.A. Sharkey, *Cannabinoid CB2 receptors in the gastrointestinal tract: a regulatory system in states of inflammation*. *Br J Pharmacol*, 2008. **153**(2): p. 263-70.
122. Howlett, A.C., *The cannabinoid receptors*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002. **68-69**: p. 619-31.
123. Gong, J.P., et al., *Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain*. *Brain Res*, 2006. **1071**(1): p. 10-23.
124. den Boon, F.S., et al., *Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(9): p. 3534-9.
125. Maneuf, Y.P. and J.M. Brotchie, *Paradoxical action of the cannabinoid WIN 55,212-2 in stimulated and basal cyclic AMP accumulation in rat globus pallidus slices*. *Br J Pharmacol*, 1997. **120**(8): p. 1397-8.
126. Glass, M. and C.C. Felder, *Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor*. *J Neurosci*, 1997. **17**(14): p. 5327-33.
127. Lauckner, J.E., B. Hille, and K. Mackie, *The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(52): p. 19144-9.
128. Fisyunov, A., et al., *Cannabinoids modulate the P-type high-voltage-activated calcium currents in purkinje neurons*. *J Neurophysiol*, 2006. **96**(3): p. 1267-77.
129. Szabo, G.G., et al., *Presynaptic calcium channel inhibition underlies CB(1) cannabinoid receptor-mediated suppression of GABA release*. *J Neurosci*, 2014. **34**(23): p. 7958-63.
130. Howlett, A.C., L.C. Blume, and G.D. Dalton, *CB(1) cannabinoid receptors and their associated proteins*. *Curr Med Chem*, 2010. **17**(14): p. 1382-93.
131. Bouaboula, M., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1*. *Biochem J*, 1995. **312 ( Pt 2)**(Pt 2): p. 637-41.

132. Rueda, D., et al., *The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46645-50.
133. Kruk-Slomka, M., et al., *Correlations between the Memory-Related Behavior and the Level of Oxidative Stress Biomarkers in the Mice Brain, Provoked by an Acute Administration of CB Receptor Ligands*. Neural Plast, 2016. **2016**: p. 9815092.
134. de Oliveira Alvares, L., et al., *Stress response recruits the hippocampal endocannabinoid system for the modulation of fear memory*. Learn Mem, 2010. **17**(4): p. 202-9.
135. Evanson, N.K., et al., *Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling*. Endocrinology, 2010. **151**(10): p. 4811-9.
136. Atsak, P., B. Roozendaal, and P. Campolongo, *Role of the endocannabinoid system in regulating glucocorticoid effects on memory for emotional experiences*. Neuroscience, 2012. **204**: p. 104-16.
137. Di, S., et al., *Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism*. J Neurosci, 2003. **23**(12): p. 4850-7.
138. Di, S., et al., *Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and gamma-aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons*. Endocrinology, 2005. **146**(10): p. 4292-301.
139. Di, S., et al., *Glucocorticoids regulate glutamate and GABA synapse-specific retrograde transmission via divergent nongenomic signaling pathways*. J Neurosci, 2009. **29**(2): p. 393-401.
140. Hill, M.N., et al., *Rapid elevations in limbic endocannabinoid content by glucocorticoid hormones in vivo*. Psychoneuroendocrinology, 2010. **35**(9): p. 1333-8.
141. Waleh, N.S., et al., *Transcriptional regulation of the mouse fatty acid amide hydrolase gene*. Gene, 2002. **291**(1-2): p. 203-10.
142. Mineka, S. and K. Oehlberg, *The relevance of recent developments in classical conditioning to understanding the etiology and maintenance of anxiety disorders*. Acta Psychol (Amst), 2008. **127**(3): p. 567-80.
143. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
144. Gilman, A.G., *A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1970. **67**(1): p. 305-12.
145. Davio, C.A., et al., *H1 and H2 histamine receptors in N-nitroso-N-methylurea (NMU)-induced carcinomas with atypical coupling to signal transducers*. Biochem Pharmacol, 1995. **50**(1): p. 91-6.
146. Orr, S.P., et al., *De novo conditioning in trauma-exposed individuals with and without posttraumatic stress disorder*. J Abnorm Psychol, 2000. **109**(2): p. 290-8.
147. Wang, Q., et al., *Glucocorticoid receptor protein expression in human hippocampus; stability with age*. Neurobiol Aging, 2013. **34**(6): p. 1662-73.
148. Marx, V., *Models: stretching the skills of cell lines and mice*. Nature Methods, 2014. **11**: p. 617.
149. Schlachetzki, J.C.M., S.W. Saliba, and A.C.P.d. Oliveira, *Studying neurodegenerative diseases in culture models %J Brazilian Journal of Psychiatry*. 2013. **35**: p. S92-S100.
150. Jia, J., et al., *Anandamide protects HT22 cells exposed to hydrogen peroxide by inhibiting CB1 receptor-mediated type 2 NADPH oxidase*. Oxid Med Cell Longev, 2014. **2014**: p. 893516.
151. Hu, F., T.W. Pace, and A.H. Miller, *Interferon-alpha inhibits glucocorticoid receptor-mediated gene transcription via STAT5 activation in mouse HT22 cells*. Brain Behav Immun, 2009. **23**(4): p. 455-63.

152. Li, X., et al., *A Pulsed Electromagnetic Field Protects against Glutamate-Induced Excitotoxicity by Modulating the Endocannabinoid System in HT22 Cells*. Front Neurosci, 2017. **11**: p. 42.
153. Alonso, M., et al., *Aversive experiences are associated with a rapid and transient activation of ERKs in the rat hippocampus*. Neurobiol Learn Mem, 2002. **77**(1): p. 119-24.
154. Atkins, C.M., et al., *The MAPK cascade is required for mammalian associative learning*. Nat Neurosci, 1998. **1**(7): p. 602-9.
155. Walz, R., et al., *Dose-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by immediate post-training infusion of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor into cortical structures*. Behav Brain Res, 1999. **105**(2): p. 219-23.
156. Katona, I., et al., *Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission*. J Neurosci, 2001. **21**(23): p. 9506-18.
157. Wilson, R.I., G. Kunos, and R.A. Nicoll, *Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus*. Neuron, 2001. **31**(3): p. 453-62.
158. Mailleux, P., et al., *Activation of multiple transcription factor genes by tetrahydrocannabinol in rat forebrain*. Neuroreport, 1994. **5**(10): p. 1265-8.
159. Derkinderen, P., et al., *Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus*. J Neurosci, 2003. **23**(6): p. 2371-82.
160. Sun, J., et al., *WIN55, 212-2 promotes differentiation of oligodendrocyte precursor cells and improve remyelination through regulation of the phosphorylation level of the ERK 1/2 via cannabinoid receptor 1 after stroke-induced demyelination*. Brain Res, 2013. **1491**: p. 225-35.
161. Jacob, W., et al., *Cannabinoid CB1 receptor deficiency increases contextual fear memory under highly aversive conditions and long-term potentiation in vivo*. Neurobiol Learn Mem, 2012. **98**(1): p. 47-55.
162. Atsak, P., et al., *Endocannabinoid signaling within the basolateral amygdala integrates multiple stress hormone effects on memory consolidation*. Neuropsychopharmacology, 2015. **40**(6): p. 1485-94.
163. Patel, S., et al., *The postmortal accumulation of brain N-arachidonyl ethanolamine (anandamide) is dependent upon fatty acid amide hydrolase activity*. J Lipid Res, 2005. **46**(2): p. 342-9.
164. Muccioli, G.G., *Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex*. Drug Discov Today, 2010. **15**(11-12): p. 474-83.
165. Roozendaal, B., *Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval*. Neurobiol Learn Mem, 2002. **78**(3): p. 578-95.
166. Rashidy-Pour, A., et al., *The effects of acute restraint stress and dexamethasone on retrieval of long-term memory in rats: an interaction with opiate system*. Behav Brain Res, 2004. **154**(1): p. 193-8.
167. Hudson, B.D., T.E. Hebert, and M.E. Kelly, *Physical and functional interaction between CB1 cannabinoid receptors and beta2-adrenoceptors*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(3): p. 627-42.
168. Henstridge, C.M., et al., *GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(3): p. 604-14.
169. Atwoli, L., et al., *Epidemiology of posttraumatic stress disorder: prevalence, correlates and consequences*. Curr Opin Psychiatry, 2015. **28**(4): p. 307-11.
170. Ursano, R.J., et al., *Practice guideline for the treatment of patients with acute stress disorder and posttraumatic stress disorder*. Am J Psychiatry, 2004. **161**(11 Suppl): p. 3-31.
171. Stein, D.J., J. Ipser, and N. McAnda, *Pharmacotherapy of posttraumatic stress disorder: a review of meta-analyses and treatment guidelines*. CNS Spectr, 2009. **14**(1 Suppl 1): p. 25-31.

172. Cain, C.K., G.D. Maynard, and J.H. Kehne, *Targeting memory processes with drugs to prevent or cure PTSD*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012. **21**(9): p. 1323-50.
173. Zohar, J., et al., *High dose hydrocortisone immediately after trauma may alter the trajectory of PTSD: interplay between clinical and animal studies*. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2011. **21**(11): p. 796-809.