



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR A GLUCOCORTICOIDES EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS ENTRENADAS EN LA TAREA DE EVITACIÓN  
INHIBITORIA**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
AMÉRICA MONTSERRATCRUZ QUIROZ

TUTORES PRINCIPALES

DRA. GINA LORENA QUIRARTE  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MAGDALENA GIORDANO NOYOLA  
DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

CAMPUS UNAM-JURIQUILLA, QUERÉTARO, QRO. OCTUBRE 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Instituto de Neurobiología**

Los miembros del Comité revisor certificamos que la tesis elaborada por: América Montserrat Cruz Quiroz, intitulada: “Activación del receptor a glucocorticoides en el hipocampo de ratas entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente  
Dr. Manuel Salas Alvarado

Secretaria  
Dra. Gina Lorena Quirarte

Vocal  
Dra. María Eugenia Garín Aguilar

Suplente  
Dr. Pavel Ernesto Rueda Orozco

Suplente  
Dra. Maricela Luna Muñoz

Aprobado por el Comité Académico  
Coordinadora del Programa  
Dra. Maricela Luna Muñoz

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer al Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Juriquilla, en donde cursé la Maestría en Ciencias (Neurobiología), gracias a todos los doctores que impartieron clases a través de los cuales tuve la oportunidad de adquirir conocimiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, donativos 251634 y 130524, beca 621351/331018); y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM IN202414) por el financiamiento otorgado para la realización de la presente investigación.

De forma muy especial quiero agradecer a mi tutora, la Dra. Gina Lorena Quirarte, por brindarme la oportunidad de unirme a su grupo de investigación, por creer en mi trabajo y por ofrecerme su apoyo a lo largo de mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Mauricio Díaz por su tiempo, enseñanzas y comentarios que fortalecieron y dieron otra perspectiva a los resultados del trabajo.

A la Dra. Magda Giordano y a la Dra. Maricela Luna por su apoyo, disponibilidad y sus observaciones que hicieron de este un mejor trabajo.

A las siguientes personas de las unidades de apoyo del INB-UNAM Campus Juriquilla:

Bioterio: M.V.Z. Martín García Servín.

Microscopía: I.S.C. Elsa Nydia Hernández Ríos y I.B.Q. Ma. Lourdes Palma Tirado.

Cómputo: Ing. Ramón Martínez Olvera, Ing. Alberto Lara Ruvalcaba, Ing. Omar González Hernández e I.S.C. Sandra Hernández García.

Enseñanza: Mtra. Leonor Casanova Rico.

Videoconferencia: Lourdes Lara.

Biblioteca: Lic. Francisco Javier Valles Valenzuela y Lic. Soledad Medina Malagón.

A los miembros del Laboratorio de Aprendizaje y Memoria, principalmente al Dr. Roberto A. Prado Alcalá, a la Dra. Cristina Medina Frago por sus aportaciones y colaboración durante mi estancia en el laboratorio, y muy especialmente a la M.V.Z. Norma Serafín López por todo su apoyo técnico y personal.

A los Maestros en Ciencias Diego Alexander González Franco y Paola Bello Medina por sus asesorías, comentarios, esfuerzo y apoyo incondicional que me brindaron a lo largo del proyecto, no solo dentro del laboratorio sino fuera de él también.

A mis compañeros estudiantes del laboratorio con los que compartí muy bellos momentos y de los cuales me llevo mucho conocimiento, gracias por hacer mi estancia muy agradable.

Finamente a mis familiares y amigos que siempre están presentes y me animan en aquellos momentos más difíciles.

## DEDICATORIA

A mi madre Gabriela Quiroz Villegas y mi hermana Iranit Cruz Quiroz por su apoyo incondicional, las amo mucho.

ALilián Linares Cruz que se ha vuelto nuestra principal inspiración y motivación.

## Resumen

El estrés induce la liberación de glucocorticoides, corticosterona en roedores y cortisol en humanos. La corticosterona se une al receptor a glucocorticoides (GR) que se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro. Posteriormente el GR es fosforilado en la serina 211 (pGR-Ser211), se transloca al núcleo celular y actúa como factor de transcripción. Se sabe que en el hipocampo se encuentra una alta concentración de GR en el CA1 y en el giro dentado (GD), con una menor proporción en CA3 y que además esta estructura participa en la consolidación de la tarea de evitación inhibitoria, en la que se asocia un estímulo aversivo (choque eléctrico) con un contexto. El presente trabajo tuvo como objetivo cuantificar los núcleos que presentan el pGR-Ser211 en las regiones CA1, CA3 y GD de ratas entrenadas en una tarea de evitación inhibitoria, utilizando diferentes intensidades de choque eléctrico (0.5, 1.0 y 2.0 mA) además se incluyeron 3 grupos control: un grupo en el cual se colocó a la rata en el contexto, pero no se le administró choque eléctrico (0.0 mA), otro grupo al que solo se le administró el choque (2.0 mA) sin entrenamiento y un grupo que solo fue manipulado. Los cerebros fueron extraídos 60 min después del entrenamiento y crioseccionados para la detección de núcleos neuronales y del pGR-Ser211 mediante la técnica de inmunohistoquímica. Los resultados conductuales muestran que los grupos entrenados con 1.0 y 2.0 mA tuvieron una retención mayor, así como una resistencia a la extinción en comparación con los entrenados sin choque (0.0 mA) o con choque eléctrico de 0.5 mA. Por otro lado, los resultados histológicos indican un mayor aumento en la proporción de núcleos con pGR-Ser211 en CA1 en el grupo entrenado con el choque eléctrico de 2.0 mA. Las regiones de CA3 y GD no presentaron cambios entre los grupos. Estos hallazgos sugieren que la activación de GR en CA1 participa en la formación de una memoria duradera, posiblemente modulando la expresión de genes que participan en la consolidación de información perdurable.

## **Abstract**

Stress induces the release of corticosterone in rodents and cortisol in humans. Corticosterone reaches the glucocorticoid receptor (GR) in the brain and then GR is phosphorylated at serine 211 (pGRser211) and internalized into the nucleus, acting as a transcription factor. The GR is present in a high concentration in CA1 and dentate gyrus (DG) of the hippocampus, with a smaller proportion in CA3. These hippocampal regions are involved in memory consolidation of inhibitory avoidance (IA), in which an electric foot-shock is associated with a context. This study aimed to quantify nuclear pGRser211 in CA1, CA3, and DG of rats trained in IA, using different intensities of electric foot-shock (0.5, 1.0, and 2.0 mA); additionally, we included three control groups: the first group was placed in the context but without foot-shock (0.0 mA), the second group received only the foot-shock (2.0 mA) without training, and the last one was a home-cage group. Brains were dissected 60 min after training and cryosectioned for immunodetection of pGRser211+ cells. The behavioral results show a higher retention in the groups trained with 1.0 and 2.0 mA than in the 0.0 mA or 0.5 mA groups. The highest proportion of pGRser211 cells was found in CA1 of the 2.0 mA trained group. However, no changes were observed in CA3 and DG. These findings suggest that activation of GR in CA1 is involved in the consolidation of a stronger memory of IA, possibly through the modulation of gene expression.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Aprendizaje	2
2.1.1 Tipos de aprendizaje	2
2.2 Memoria	3
2.2.1 Consolidación	4
2.2.2 Clasificación de la memoria	5
2.3 Hipocampo	6
2.3.1 Organización estructural	6
2.3.2 Conectividad	8
2.3.3 Función	8
2.4 Estrés	9
2.4.1 Eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA)	10
2.4.2 Los glucocorticoides	11
2.4.3 Receptor a glucocorticoides (GR)	13
3. Justificación	17
4. Hipótesis	18
5. Objetivos	18
5.1 Objetivo general	18
5.2 Objetivos específicos	18
6. Materiales y métodos	19
6.1 Sujetos	19
6.2 Evitación inhibitoria	19
6.3 Grupos y tratamientos	20
6.4 Sesión de entrenamiento	21
6.5 Sesión de prueba	21
6.6 Extinción	21
6.7 Obtención de tejido	21
6.8 Cortes cerebrales	22
6.9 Técnica inmunohistoquímica	22
6.10 Toma de imágenes	23
6.11 Análisis de imágenes	23
6.12 Análisis estadístico	24
7. Resultados	26
7.1 Conductuales	26
7.1.1 Latencias de entrada, escape y retención	26
7.1.2 Extinción	27
7.1.2.1 Análisis estadístico entre los grupos	27
7.1.2.2 Análisis estadístico dentro de los grupos	28
7.2 Histológicos	30
7.2.1 Neuronas pGR+ en el cuerno de Ammón 1 (CA1)	30
7.2.2 Neuronas pGR+ en el cuerno de Ammón3 (CA3)	32
7.2.3 Neuronas pGR+ en el giro dentado (GD)	33
8. Discusión	34
9. Conclusiones	38
10. Perspectivas	39
11. Referencias bibliográficas	40



## Índice de abreviaturas

ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ANDEVA	Análisis de varianza
CDK	Cinasas dependientes de ciclina
CDK5	Cinasa dependientes de ciclina 5
CA	Cuerno de Ammon
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
Cy3	Cianina 3
DBD	Dominio de unión al ADN
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
GD	Giro dentado
GR	Receptor a glucocorticoides
GREs	Elementos de respuesta a glucocorticoides
GSK3	Cinasa 3 Glicógeno sintasa
HPA	Hipotálamo-pituitario-adrenal
Hsp90	Proteína de choque térmico 90
JNK	Cinasas c-Jun N-terminal
LBD	Dominio de unión a ligando
mA	mili amperes
MAPK	Proteína cinasa de unión a mitógeno
MR	Receptor a mineralocorticoides
NTD	Dominio de activación transcripcional en el extremo N-terminal
pGR	Receptor a glucocorticoides fosforilado
pGR-Ser211	Receptor a glucocorticoides fosforilado en la serina 211
RC	Respuesta condicionada
RI	Respuesta incondicionada
Ser211	Serina 211

## 1. Introducción

El aprendizaje y la memoria son procesos que permiten utilizar la información del entorno para adaptarnos al medio. Ambos procesos son mediados por diferentes estructuras cerebrales como el hipocampo(Dudai, 2004), la amígdala(Roozendaal, Portillo-Marquez, & McGaugh, 1996), la corteza prefrontal y los ganglios basales(McEwen, 2016; Medina et al., 2007; Roozendaal & McGaugh, 2011).

Ante una experiencia estresante de peligro, se activan en el organismo mecanismos de regulación, como la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal(HPA) cuyo producto final es la liberación de las hormonas glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores y aves)(Sandi, Venero, & Cordero, 2001). Estas hormonas llevan a cabo su acción al unirse a receptores específicos distribuidos en diversas estructuras del organismo(Cain & Cidlowski, 2015), estos receptores son de dos tipos, el receptor a mineralocorticoides (MR) y el receptor a glucocorticoides (GR) (De Kloet, Vreugdenhil, Oitzl & Joels, 1998). Diversas investigaciones han reportado la participación de los glucocorticoides en procesos de memoria y aprendizaje (McCormick, McNamara, Mukhopadhyay & Kelsey, 1997; Roozendaal, Portillo-Marquez & McGaugh, 1996; Sandi & Rose, 1997).

El MR debido a su alta afinidad por la hormona, se encuentra unido al ligando en condiciones basales, mientras que el GR tiene menor afinidad y se une al ligando cuando éste se encuentra en concentraciones altas en situaciones de estrés o en ciertos momentos del ciclo circadiano(Sandi, Venero & Cordero, 2001).

Diversas estructuras cerebrales participan en el aprendizaje y la memoria, una de las más estudiadas es el hipocampo que participa principalmente en tareas de índole espacial (Dillon, Qu, Marcus, & Dodart, 2008) y de contexto (Chang, Chen, & Liang, 2008), además presenta un alto nivel de concentración del GR(McEwen, Weiss, & Schwartz, 1968).

## 2. Antecedentes

### 2.1. Aprendizaje

El aprendizaje es entendido como aquel cambio relativamente permanente en la conducta que se debe a la experiencia (McGaugh, 1973). Al limitar el aprendizaje a cambios relativamente permanentes, se excluyen modificaciones de la conducta debidas a factores de motivación, a la adaptación sensorial o a la fatiga. Al señalar que la práctica, el entrenamiento y la experiencia son las condiciones esenciales del aprendizaje, se excluyen cambios de la conducta que son resultado de la maduración, la senectud, o de variables fisiológicas (Bower & Hilgard, 2011).

#### 2.1.1 Tipos de aprendizaje

El aprendizaje se ha clasificado en no asociativo y asociativo. El primer tipo de aprendizaje implica experiencia con uno o con dos estímulos que no tienen necesariamente una relación temporal (Mendoza, 2002), ejemplos de este tipo de aprendizaje incluyen la habituación, la deshabituación, la sensibilización y la impronta (Carew, 1989).

La habituación es el decremento de una respuesta innata a un estímulo que se repite (Mendoza, 2002; Rosenzweig & Leiman, 2003). La sensibilización se refiere a la facilitación de una respuesta al presentarse un estímulo nocivo, ante presentaciones sucesivas del mismo estímulo o uno parecido, la respuesta incrementa su amplitud (Rosenzweig & Leiman, 2003).

Por otro lado, el aprendizaje asociativo implica la asociación entre eventos: un estímulo y una respuesta, una respuesta y su consecuencia, o entre dos o más estímulos (Mendoza, 2002); dentro de este tipo de aprendizaje encontramos el condicionamiento clásico y el condicionamiento operante.

El condicionamiento clásico se basa en la asociación entre un estímulo neutro, incapaz por sí mismo de producir una respuesta y que se denomina estímulo condicionado (EC), con un estímulo incondicionado (EI) que por sí solo provoca una respuesta a la que se denomina respuesta incondicionada (RC); al cabo de varios ensayos el EC, como consecuencia de la asociación con el EI, es capaz de producir

una respuesta condicionada (RC) muy semejante a la respuesta incondicionada (González-Cabanach, 1995). Pavlov (1927) encontró que cuando durante varios ensayos se presenta el EC sin la presencia del EI, la RC empieza a decaer gradualmente e inclusive desaparecer; a esto se le llama extinción de la respuesta. Si se vuelve a presentar el EI, se puede dar de nuevo la respuesta, fenómeno al que se le llama recuperación espontánea (Téllez, 2005).

Por su parte, el condicionamiento instrumental u operante, inició con el conexionismo desarrollado por Edward Thorndike quien identificó la forma de aprendizaje dada por ensayo y error (Bower & Hilgard, 2011). Posteriormente se describió el condicionamiento operante, que implica una relación de contingencias en donde un estímulo es seguido por una respuesta y a esta última le sigue una consecuencia, la cual tendrá un efecto sobre la probabilidad de presentación futura de la respuesta, las consecuencias pueden ser reforzadores o castigos; un reforzador es cualquier estímulo que incrementa la probabilidad de ocurrencia de una respuesta, mientras que un castigo es cualquier estímulo que disminuye la probabilidad de ocurrencia de una respuesta (Skinner, 1994).

Dentro del aprendizaje operante se puede entender a la extinción como un decremento de la conducta debido a la suspensión del reforzador (Bermúdez-Rattoni & Prado-Alcalá, 2001). Korol y Gold (2007) proponen que en aquellas ocasiones donde se utiliza algún estímulo aversivo podría entenderse que hay también un descenso de miedo condicionado.

Se sabe también que en la experiencia aprendida, la intensidad y duración del estímulo tiene un efecto sobre la fuerza de la respuesta condicionada la cual puede manifestarse durante una prueba que nos permita medir la resistencia a la extinción (Garín-Aguilar et al., 2012).

## 2.2 Memoria

La memoria es el almacenamiento de la información producto del aprendizaje (McGaugh, 1973). La memoria y el aprendizaje están estrechamente relacionados, no se puede observar la evocación o recuperación de la información si antes ésta no fue aprendida (Mendoza, 2002).

## 2.2.1 Consolidación

Para que la información sea almacenada debe pasar por un proceso de consolidación (Lechner, Squire, & Byrne, 1999), entendido como la estabilización progresiva de la memoria de largo plazo después de la adquisición. El término de consolidación se utiliza comúnmente para referirse a dos tipos de procesos, la consolidación sináptica que se lleva a cabo dentro de los primeros minutos a horas después de aprender e implican mecanismos de acción nuclear y producción de proteínas *de novo*; y la consolidación de los sistemas de memoria que implica a las estructuras cerebrales, y conlleva mucho más tiempo. En este proceso de consolidación el hipocampo funge una función de filtro y reorganización de información para después ser almacenada en otras áreas (Dudai, 2004). El proceso de consolidación parece ser susceptible a una variedad de influencias que pueden facilitarla o afectarla (McGaugh, 1966). A través de diversas tareas experimentales que permiten estudiar a la memoria, se ha encontrado que cada ensayo de entrenamiento repetido puede potenciar los procesos de corta duración que subyacen a la adquisición y a su vez mejora simultáneamente la consolidación a largo plazo. En la Figura 1 se muestra el modelo estándar de la consolidación de la memoria.

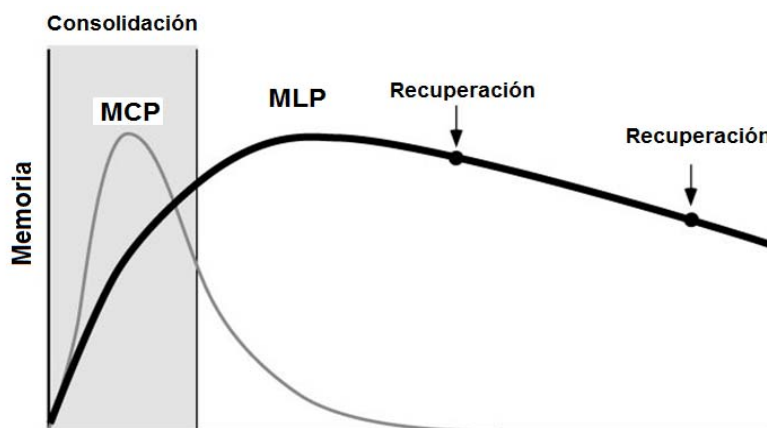


Figura 1. Modelo estándar de la consolidación de la memoria. MCP: memoria de corto plazo, MLP: memoria de largo plazo. Modificado de Dudai (2004).

La memoria implica la participación de diversas estructuras cerebrales que trabajan como un sistema en el que cada estructura está involucrada según el tipo de

información que deba ser almacenada. Prado-Alcalá et al., (2006) mencionan que la información derivada del aprendizaje podría quedar almacenada en virtud de cambios en la estructura y el metabolismo neuronal (crecimiento dendrítico, formación de espinas dendríticas, incremento en la producción y liberación de neurotransmisores, síntesis de receptores de membrana sensibles a neurotransmisores específicos, etc.). Además, se ha estudiado el papel que juegan distintos tipos de hormonas y neurotransmisores en el proceso de aprendizaje y memoria. Diversas investigaciones apuntan a la participación de las hormonas liberadas bajo condiciones de estrés: los glucocorticoides y la adrenalina, secretadas por las glándulas adrenales (Cordero, Merino, & Sandi, 1998; Medina et al., 2007; Téllez, 2005; Korol & Gold, 2007).

### 2.2.2 Clasificación de la memoria

Tomando en cuenta la temporalidad de la memoria se le ha clasificado en memoria de corto plazo y memoria de largo plazo. Los procesos a corto plazo proporcionan una base temporal de recuerdo de experiencias y la consolidación de esta información a largo plazo implica procesos que ocurren en intervalos relativamente largos de tiempo.

En lo que se refiere a las características de la información almacenada, Squire (1987), divide a la memoria en declarativa y no declarativa, la primera se refiere al almacenamiento y recuperación consciente de la información que puede expresarse mediante el lenguaje y se subdivide en hechos y eventos. Por otro lado, la memoria no declarativa es aquella en la que la experiencia altera la conducta inconscientemente sin proveer acceso a ningún contenido nemónico y se subdivide en habilidades y hábitos; priming, aprendizaje asociativo y aprendizaje no asociativo. Téllez (2005) menciona que dentro de la memoria de corto plazo se puede encontrar a la memoria de trabajo y sensorial, la primera tiene dos componentes, un sistema de memoria de corta duración y un sistema ejecutivo que usa esa memoria para la ejecución de operaciones cognitivas, mientras que la segunda tiene que ver con la fase inicial que es la atención y el proceso de registro involucrado en la percepción (Figura 2).

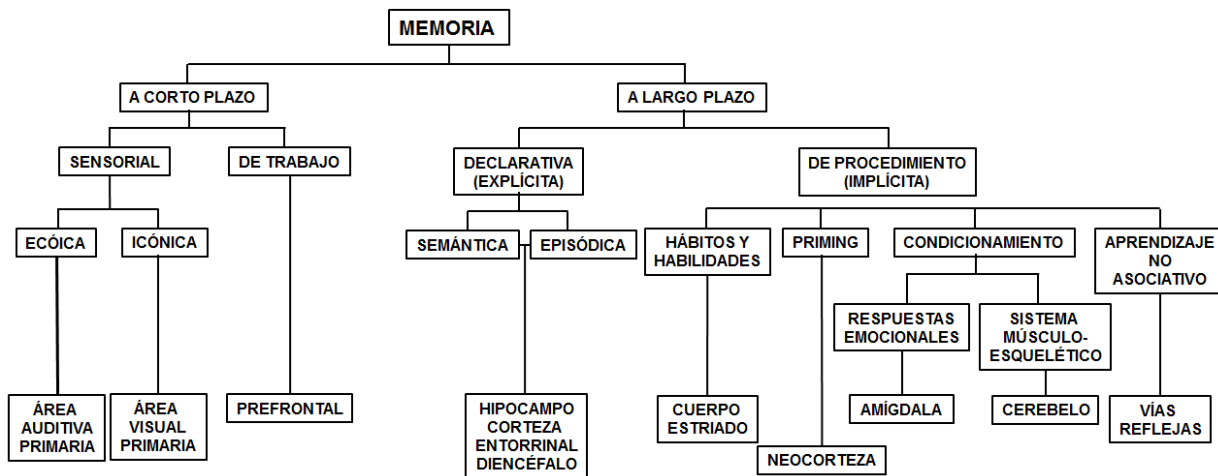


Figura 2. Clasificación de la memoria y las estructuras cerebrales implicadas. Modificado de Squire y Zola (1996).

### 2.3. Hipocampo

Es una estructura cerebral que participa en procesos como la memoria (Quiroz et al., 2003) y la plasticidad sináptica. En situaciones de estrés es un blanco clave de acción para las hormonas glucocorticoides y que participa en la regulación del eje HPA (Sandi, 2004). El hipocampo forma parte del sistema límbico; se extiende siguiendo una curva desde la neocorteza lateral del lóbulo temporal medial hasta la línea media del encéfalo y se encuentra dentro del lóbulo temporal.

#### 2.3.1 Organización estructural

El hipocampo está formado por dos circunvoluciones, cuerno de Ammón (CA) y el giro dentado (GD); cada una contiene un tipo de células de proyección distinto; en CA se encuentran células piramidales, en cambio en el GD encontramos células granulares; el asta de Ammón está dividido en cuatro regiones: CA1, CA2, CA3, y CA4 (Nava, 2011).

El GD recibe aferencias directas de la corteza entorrinal, está compuesto de tres capas, la más superficial es la capa molecular, la segunda y principal es la capa de las células granulares y la tercera capa más profunda es la capa polifórmica. El principal tipo celular en el giro dentado son las neuronas granulares, también se encuentran las

células mossy cuyo axón sale del giro dentado de un lado del cerebro sólo para inervar el giro dentado de la otra parte. Las interneuronas principales que presenta el GD son las células de canasta las cuales son inhibitorias, otro tipo de interneuronas encontradas son las células axo-axónicas, células HICAP (por sus siglas en inglés hilar commissural-associational pathway related cells), células MOPP (por sus siglas en inglés molecular layer perforant path-associated cell) y células HIPP (por sus siglas en inglés hilar perforant path-associated cell) (Amaral & Lavenex, 2007).

En las áreas CA1, CA2, CA3 y CA4 el principal tipo neuronal son las células piramidales, la capa relativamente libre de células ubicada en la profundidad de la capa de células piramidales se le conoce como stratum oriens (región infralímbica) que contiene las dendritas basales de las células piramidales y varias clases de interneuronas donde se encuentran algunas conexiones de asociación dentro de la región de CA3, y se localizan las conexiones colaterales de Schaffer hacia CA1. En CA3 existe una zona acelular estrecha conocida como el stratum lucidum y está ocupado por las fibras musgosas. Localizado superficialmente al stratum lucidum se encuentra el stratum radiatum, que es la región suprapiramidal donde ocurren las conexiones asociativas dentro de CA3 y las conexiones de CA3 (colaterales de Schaffer) a CA1. La capa más superficial es el stratum lacunosum-moleculare. En el stratum radiatum y el stratum lacunosum-moleculare se encuentran una gran variedad de interneuronas como las células axo-axónicas, células de canasta, células bistratificadas, células trilaminares (horizontales y radiales) y las células oriens lacunosum-moleculare (Amaral & Lavenex, 2007).

En las regiones de CA1, CA3 y GD se encuentran oligodendrocitos, microglía y astrocitos, estos últimos tipos celulares se ha reportado que participan en las sinapsis del hipocampo jugando un papel primordial para la comunicación intercelular en esta estructura (Volterra y Steinhäuser 2004).



### 2.3.2 Conectividad

Las eferencias de la corteza entorrinal (vía perforante) llegan tanto al GD como a CA3, el GD proyecta a CA3 (fibras musgosas) y a su vez CA3 proyecta a CA1 (colaterales de Schaffer), a esto se le conoce como el circuito trisináptico del hipocampo (Figura 3).

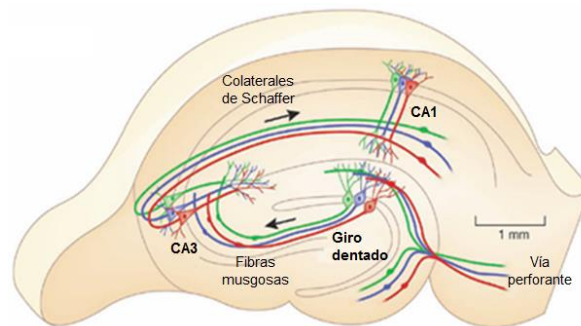


Figura 3. Esquema representativo de los circuitos neuronales del hipocampo de la rata. Modificado de Moser(2011).

El hipocampo está conectado a su vez a las estructuras corticales temporales a través de la vía perforante como los cuerpos mamilares del tronco encefálico, al tálamo, la corteza frontal, los ganglios basales y el hipotálamo(Kolb & Whishaw, 2009).

### 2.3.3 Función

El hipocampo participa en el proceso de memoria de tipo declarativa, episódica, espacial y de contexto(Sweatt & McKnight, 2010).Esta estructura juega un papel relevante en la regulación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (Jacobson & Sapolsky, 1991) y en el paso de la memoria de corto a largo plazo.

El hipocampo puede dividirse funcionalmente en dorsal y ventral, estudios anatómicos sugieren que las aferencias y eferencias son también distintas en dichas regiones(Fanselow & Dong, 2010);el hipocampo dorsal tiene mayor participación en procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria, como ejemplo de esto Dillon, Qu, Marcus y Dodart (2008)realizaron un estudio donde lesionaron con ácido N-metil-D-aspartato (NMDA)la región de CA1 y encontraron déficits en el aprendizaje y la

memoria en las tareas del laberinto radial y el laberinto en forma de Y, mientras que el hipocampo ventral está más relacionado con el comportamiento de tipo emocional como la ansiedad (Swanson & Cowan, 1975; Yamada & Jinno, 2014). Kjelstrup et al. (2002) encontraron que al lesionar la región del hipocampo ventral en ratas y entrenarlas en el laberinto elevado en cruz, estas no evitan los brazos abiertos del laberinto y muestran disminuidas las respuestas neuroendocrinas al estrés durante el confinamiento en una cámara iluminada.

## 2.4 Estrés

El estrés es la condición del organismo producida por una situación aversiva que desencadena alteraciones conductuales y fisiológicas (Kim & Diamond, 2002), la situación aversiva conlleva un estímulo externo que causa un cambio en la homeostasis del organismo e involucra la respuesta de un sistema autorregulable dada por una alarma general (Joseph-Bravo & De Gortari, 2007) que sirve para restaurar la homeostasis y facilitar la adaptación (de Kloet, Vreugdenhil, Oitzl & Joëls, 1998). El agente que induce esta respuesta es llamado estresor (Sherwood 2001).

La reacción de cada organismo ante una situación de estrés depende de la naturaleza, intensidad, duración y frecuencia del estímulo estresante produciendo cambios a corto o largo plazo, en toda una serie de sistemas (Sandi et al., 2001), así como de las regiones activadas del sistema nervioso central (en particular el sistema límbico: amígdala, corteza frontal, hipocampo e hipotálamo), los sistemas de neurotransmisión involucrados como el glutamatérgico, GABAérgico, adrenérgico y colinérgico y las hormonas liberadas.

Existen estresores físicos que son estímulos que alteran el estado fisiológico afectando mecanismos homeostáticos que activan las vías nerviosas que llegan a núcleos localizados en la parte superior de la médula espinal y en el tallo cerebral, los cuales envían eferencias al núcleo paraventricular del hipotálamo e incitan una respuesta rápida y necesaria para la supervivencia, pero no requieren mayor interpretación por estructuras superiores del cerebro; ejemplos de estos tipos de estresores son los estímulos del medio externo (frío, calor, ruido, algún golpe recibido, entre otros). Por otro lado, existen los estresores psicológicos, estímulos que no

representan una amenaza inmediata a las condiciones fisiológicas del individuo, pero provocan un estado de anticipación ante posibles peligros, estos estímulos necesitan ser procesados por la corteza antes de iniciar la respuesta al estrés para tener un significado fisiológico, y dependen en gran medida de experiencias previas. Esta información es organizada en las estructuras límbicas induciendo respuestas neuroendocrinas y conductuales ante el estrés (Sandi, 2001; Joseph-Bravo & De Gortari, 2007).

Se han realizado diversos estudios para conocer los mecanismos cerebrales de la formación de la memoria mediada por diferentes intensidades de estímulo, uno ejemplo de ellos es el de Quiroz et al. (2003) que entrenaron ratas en la tarea de evitación inhibitoria utilizando diferentes intensidades de choque eléctrico, 0.8 o 1.0 mA, e inmediatamente después administraron bilateralmente tetrodotoxina en el hipocampo dorsal para inactivar la actividad neural, los resultados corroboraron el efecto amnésico en las ratas entrenadas con 0.8 mA, sin embargo, observaron que ante la intensidad más alta (1.0 mA) el tratamiento fue inefectivo para producir amnesia, sugiriendo que después de una experiencia sobrerreforzada otras estructuras del cerebro son activadas.

#### 2.4.1 Eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA)

Durante la respuesta del organismo al estrés se activa el eje HPA. Inicialmente se producen señales de activación procedentes de distintas estructuras cerebrales, que convergen en un grupo de neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo, estas neuronas sintetizan arginina vasopresina (AVP) y la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que es liberada en la eminencia media, en donde hay una serie de capilares que forman un sistema de vasos portales, estos vasos ponen en comunicación al hipotálamo con la hipófisis anterior donde la CRH estimula a las células corticotrópicas, que sintetizan y liberan a la circulación sanguínea la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la cual es secretada a la circulación sanguínea y activa la captación de glucosa en el músculo esquelético, al llegar a la corteza de las glándulas adrenales estimula la producción y liberación de los glucocorticoides a la sangre, la secreción de corticoides adrenales suele alcanzar niveles máximos a los 15

minutos después de la activación de HPA (de Kloet et al., 1998; Sandi et al., 2001). (Figura 4).

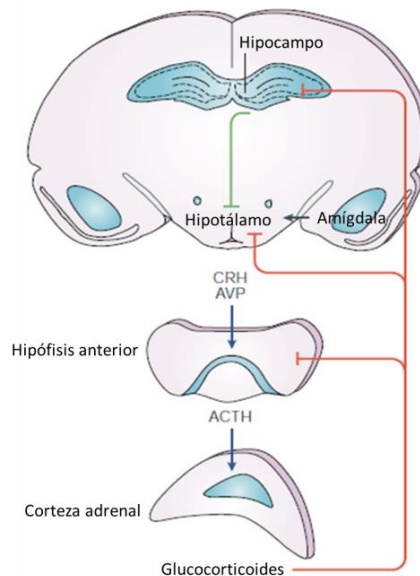


Figura. 4. Representación de la activación del Eje HPA. Comienza con la producción de CRH y AVP en el núcleo paraventricular del hipotálamo, estas hormonas estimulan a la hipófisis anterior la cual libera ACTH y provoca la secreción de glucocorticoides de la corteza adrenal. El eje tiene puntos de retroalimentación negativa en el hipotálamo y la hipófisis, así como en algunas estructuras como el hipocampo. Modificado de Sandi (2004).

Los glucocorticoides participan como elementos clave en la respuesta de estrés del organismo, desempeñan un importante papel en la facilitación de la memoria asociada a las vivencias emocionales y estresantes (Sandi, 2004).

#### 2.4.2 Los glucocorticoides

Los glucocorticoides son hormonas esteroideas adrenocorticales secretadas al torrente sanguíneo inmediatamente después de ser sintetizadas (Koolman & Röhm, 2004); donde se unen a proteínas plasmáticas que ayudan a su transporte (Sandi et al., 2001); debido a su naturaleza lipofílica pueden atravesar la membrana citoplasmática de la célula y unirse a su receptor, este complejo receptor-hormona es translocado al núcleo celular donde se homodimeriza para unirse a los elementos de respuesta en el ácido desoxirribonucleico (ADN), reclutando maquinaria transcripcional y coactivadores o correpresores que regulan la transcripción de genes (Gallagher-Beckley & Cidlowski, 2009).

Los glucocorticoides tienen efectos metabólicos que incluyen la estimulación de la gluconeogénesis, aumentan el catabolismo de las proteínas, la movilización de ácidos grasos e inhiben la respuesta inflamatoria Korol y Gold (2007).

La regulación de la transcripción por los glucocorticoides depende de la disponibilidad del ligando, del receptor y el reclutamiento de cofactores y otras proteínas; también depende del tejido blanco y la sensibilidad del individuo hacia los glucocorticoides (Lu & Cidlowski, 2006).

Los glucocorticoides desempeñan un papel crítico en la terminación de su propia secreción. Dicha retroalimentación negativa la realizan mediante la inhibición de la secreción de CRH y ACTH en el hipotálamo y la hipófisis, respectivamente, así como al interactuar con el hipocampo y otras regiones cerebrales (Sandi, 2004).

En trabajos donde se administran diferentes dosis de corticosterona se ha observado que con dosis bajas no hay efecto sobre la retención de la tarea, sin embargo en dosis intermedias se observa un efecto facilitador en la consolidación, por el contrario, dosis muy altas la inhiben (Medina et al., 2007; Roozendaal et al., 1996; Sandi & Rose, 1997).

Se asume que los efectos de los glucocorticoides sobre la memoria y el aprendizaje siguen un efecto de U invertida, de tal manera que la ausencia de glucocorticoides o su bloqueo empeora el aprendizaje, de igual manera que los niveles muy elevados; en cambio las dosis moderadas tienen un efecto facilitador de la memoria; este efecto depende de la interacción de la hormona con sus receptores (receptor a mineralocorticoides y receptor a glucocorticoides), ya que cuando están completamente saturados existe una deficiencia en la memoria (Lupien, Maheu, Tu, Fiocco & Schramek, 2007) (Figura 5).

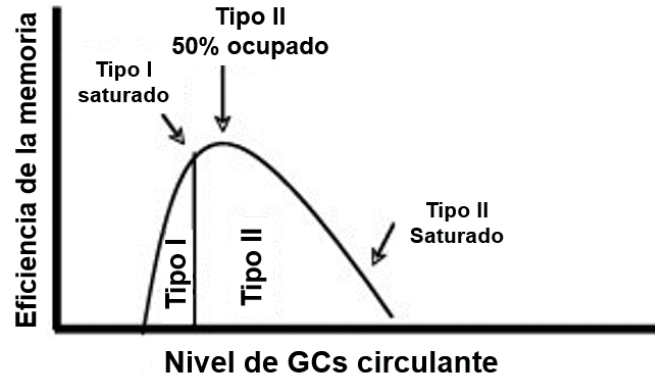


Figura 5. Representación esquemática de la ocupación de los receptores a glucocorticoides en función de los niveles circulantes de glucocorticoides y la modulación resultante de la memoria. Modificado de Lupien et al. (2007).

### 2.4.3 Receptor a glucocorticoides (GR)

Las acciones de los glucocorticoides en el cerebro están mediadas por su unión a receptores específicos, el de GR y el MR (De Kloet et al., 1998).

El MR tiene gran afinidad por el ligando, por lo que se encarga del mantenimiento de la actividad HPA basal y por su parte el GR tiene una afinidad menor y facilita la recuperación de la activación inducida por el estrés (De Kloet et al., 1998). Ambos tipos de receptores están presentes en áreas del cerebro como el hipocampo y la amígdala, así como en otros tejidos del cuerpo como el hígado (McEwen, Sakai & Spencer, 1993). La alta densidad de receptores para corticosteroides expresados en áreas cerebrales implicadas en los procesos de aprendizaje y memoria, como el hipocampo, la corteza cerebral y la amígdala, denota su localización clave para afectar funciones cognitivas (Sandi, 2004).

Herman y Spencer (1998) evaluaron la regulación del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y el nivel de proteína del GR en ratas adrenalectomizadas, observaron diferencias en la expresión del ARNm del GR entre las regiones del hipocampo, siendo mayor en CA1 y GD además, encontraron que en situaciones basales el GR en el hipocampo es regulado por el MR, en contraste, cuando los niveles de glucocorticoides circulantes son altos ocurre una evidente autorregulación del GR, (Figura 6).

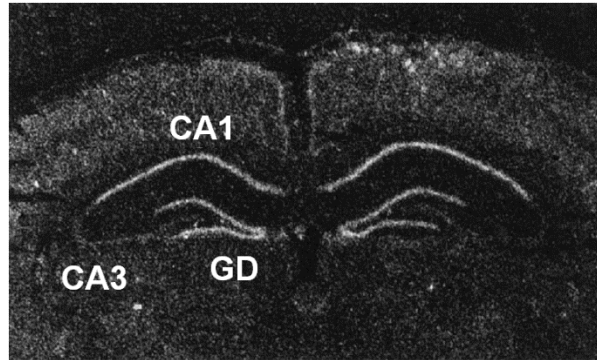


Figura 6. Imagen de un corte coronal del hipocampo, sometido a la técnica de hibridación *in situ*, donde se puede observar la localización del ARNm del GR en las áreas de CA1, CA3 y GD del hipocampo. Modificado de Herman y Spencer (1998).

El GR tiene una estructura modular que está formada por dominios de diferente longitud y función; los cuales son el dominio de activación transcripcional en el extremo N-terminal (NTD, por sus siglas en inglés, N-terminal transactivation domain), el dominio de unión al ácido desoxirribonucleico (DNA) (DBD, por sus siglas en inglés, DNA Binding Domain) y el dominio de unión al ligando (LBD, por sus siglas en inglés, ligand-binding domain) (Koolman & Röhm, 2004). El dominio NTD AF1 que permite el reclutamiento de co-reguladores y de maquinaria transcripcional. El DBD contiene dos motivos “dedos de zinc” que se unen al DNA. El LBD contiene una bolsa hidrofóbica para unir al ligando y un dominio AF2 para las interacciones con los co-reguladores. El GR contiene también una región bisagra (H) que separa al DBD y al LBD (Cain & Cidlowski, 2015)(Figura 7).

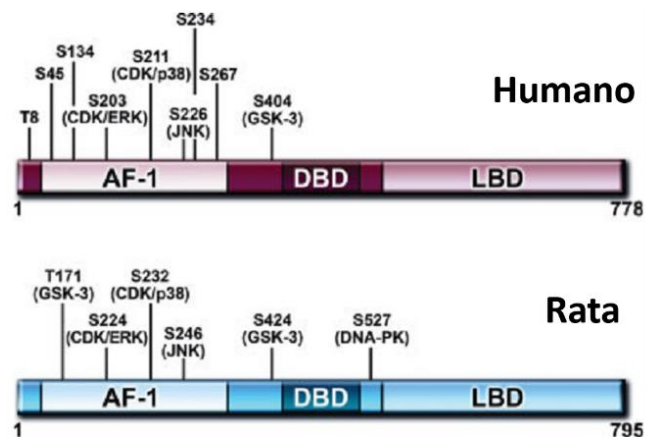


Figura 7. Esquema en donde se representan los dominios del GR y los sitios de fosforilación conocidos en humano y rata. En paréntesis se muestran las cinasas implicadas en la fosforilación de los diferentes residuos. AF-1: dominio de activación transcripcional. DBD: dominio de unión al DNA, LBD: dominio de unión al ligando. Modificado de Galliher-Beckley y Cidlowski (2009).

La estructura del gen del receptor a glucocorticoides en el humano consta de un total de 9 exones y tiene un tamaño de 80 kilobases, el exón 1 consta de una secuencia 5' no traducida, el exón 2 codifica para la porción amino-terminal del receptor, y un total de 5 exones combinan para el dominio de unión a la hormona. Como producto del splicing alternativo, son generadas dos isoformas;  $\alpha$  y  $\beta$  cada una codificada por el exón 9 (Encio & Detera-Wadleigh, 1991).

Ante la ausencia de hormona, el GR se encuentra en el citoplasma unido a proteínas chaperonas, principalmente a la proteína de choque térmico hsp90 (Koolman & Röhm, 2004).

El GR es una proteína que es blanco de modificaciones postraduccionales como la fosforilación, ubiquitinación, sumoilación y acetilación, estas modificaciones alteran la función del GR (Cain & Cidlowski, 2015). Las cinasas implicadas en la fosforilación de los diferentes residuos de aminoácidos en AF1 son las cinasas dependientes de ciclina (CDK), las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), las cinasas c-Jun N-terminal (JNK) y las cinasas del glucógenosintetasa (GSK3). Se ha reportado la fosforilación en los residuos de Ser113, Ser134, Ser141, Ser143, Ser203, Ser211, Ser226 y en Ser 404 (Kadmiel & Cidlowski, 2013). Cuando la Ser211, homóloga a la Ser 232 en la rata, es fosforilada existe una mayor actividad transcripcional del GR e incrementa el reclutamiento de promotores (Galliher-Beckley & Cidlowski, 2009; Gehring, 1993; Necela & Cidlowski, 2004; Vandevyver, Dejager & Libert, 2012).

El complejo hormona-receptor es conducido al núcleo, pasando a través de la membrana nuclear donde puede unirse directamente al ADN para regular la expresión del gen diana a través de secuencias específicas del ADN que reconocen al GR activado y se denominan elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs). Existen dos tipos de GREs: GREs positivos que determinan la inducción de la transcripción y GREs negativos que la reprimen (Figura 8). En los GREs positivos participan complejos de coactivadores como el del receptor de esteroides-1, p/CIF, SWI/SNF, y GRIP1/TIF2; mientras que en los GREs negativos participan los factores de transcripción AP-1 y el factor nuclear  $\kappa$ B, estas interacciones le dan al complejo hormona-receptor la capacidad de interactuar con el genoma (Koolman & Röhm, 2004).



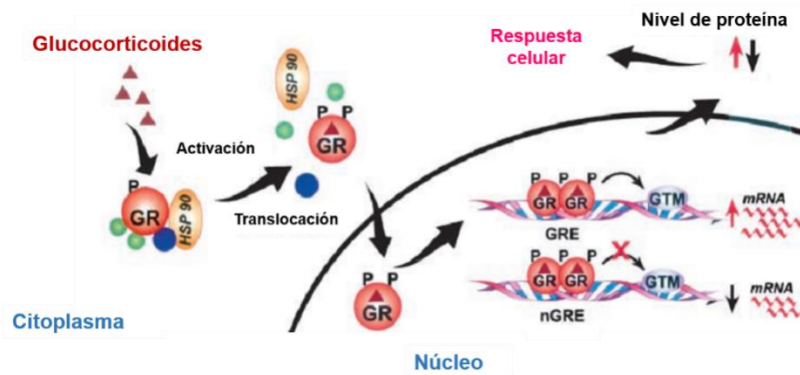


Figura 8. Esquema del mecanismo básico de acción del GR al unirse a la hormona. El GR reside en el citoplasma unido a proteínas de choque térmico (HSP). Al unirse a la hormona, el GR se disocia de las HSP y sufre cambios postraduccionales como fosforilaciones (P) para después internalizarse en el núcleo donde actúa como factor de transcripción. GSM maquinaria general de transcripción. Modificado de Necela y Cidlowski (2004).

Wang, Frederick y Garabedian (2002) aplicaron dexametasona, un glucocorticoide sintético, y observaron a distintos tiempos la localización subcelular de la Ser203 y Ser211 fosforiladas, encontraron que solo después de una hora de la administración del tratamiento la Ser 211 fosforilada se observaba de manera evidente dentro del núcleo, después de dos horas la señal se iba atenuando y saliendo del núcleo hacia el citoplasma; a diferencia de la Ser203 que solo fue observada en el citoplasma, encontrando así una correlación entre la fosforilación de la Ser211 y la transactivación del GR, ellos proponen a la Ser-211 fosforilada como un biomarcador de activación hormonal del GR y sugieren que las diferencias en la fosforilación y la localización subcelular se deben a los distintos aspectos de la modulación y función del receptor (Figura 9).

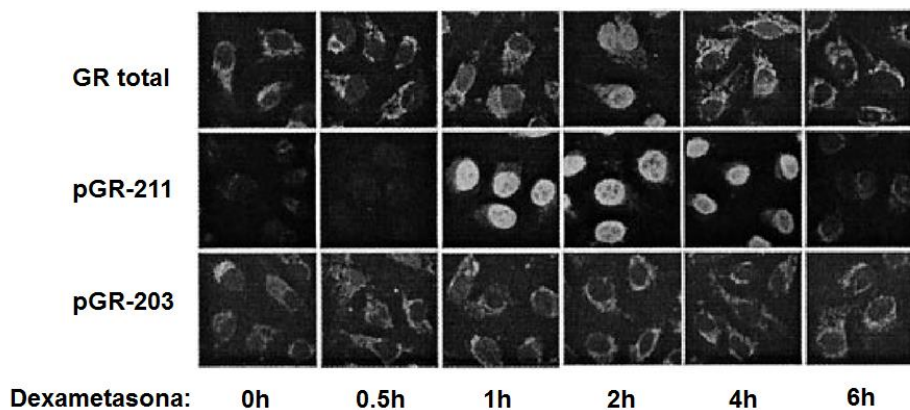


Figura 9. Localización subcelular de la Ser203 y Ser211 fosforiladas en cultivo celular humano observadas a distintos tiempos después de la administración de dexametasona. Modificado de Wang et al. (2002).

### 3. Justificación

La liberación de hormonas corticosteroides provocada por el estrés, tiene influencia en la regulación de los procesos de aprendizaje, consolidación y evocación de la memoria; estas hormonas son liberadas como producto de la activación del eje HPA; dicha activación depende de la intensidad y la frecuencia de exposición al estresor. Al llegar al cerebro estas hormonas se unen a sus receptores específicos, entre ellos el GR; se forma el complejo hormona-receptor y se homodimeriza para translocarse al núcleo. El GR sufre cambios conformacionales como la fosforilación en la serina 211 mediada por la cinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5) y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) p38 y p35 que favorecen la actividad transcripcional del GR.

Se sabe que una de las estructuras cerebrales que presenta una alta concentración de GR y que participa en la consolidación de la memoria es el hipocampo, por ello es importante conocer si el aprendizaje mediado por un estresor puede tener efecto en el número de núcleos neuronales que presentan el GR fosforilado en la serina 211 en las regiones de CA1, CA3 y GD del hipocampo dorsal de ratas.

Una herramienta para estudiar los procesos de aprendizaje y memoria que permite fácilmente modificar el nivel de aprendizaje es la tarea de evitación inhibitoria, ya que la consolidación de la información depende de la intensidad del estímulo aversivo (choque eléctrico) que se utiliza.

Por lo anterior, en el presente trabajo nos planteamos la siguiente pregunta: ¿Existe relación entre el nivel de choque eléctrico administrado a ratas durante el entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria y el número de neuronas que presentan el receptor a glucocorticoides fosforilado en la serina 211 en el hipocampo dorsal?

## 4. Hipótesis

H1: El incremento en la intensidad de choque eléctrico administrado durante el entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria aumentará la resistencia a la extinción.

H2: El entrenamiento con intensidad alta de choque eléctrico en la tarea de evitación inhibitoria inducirá un aumento en el número de neuronas que presenten el pGR-Ser211 internalizado en el núcleo en la región CA1 del hipocampo.

H3: El entrenamiento con intensidad alta de choque eléctrico en la tarea de evitación inhibitoria inducirá un aumento en el número de neuronas que presenten el pGR-Ser211 internalizado en el núcleo en la región CA3 del hipocampo.

H4: El entrenamiento con intensidad alta de choque eléctrico en la tarea de evitación inhibitoria inducirá un aumento en el número de neuronas que presenten el pGR-Ser211 internalizado en el núcleo en la región GD del hipocampo.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Cuantificar las neuronas hipocampales que presentan el GR fosforilado en la Ser211 internalizado en el núcleo en ratas entrenadas en una tarea de evitación inhibitoria mediada por diferentes intensidades de choque eléctrico.

### 5.2 Objetivos específicos

- Entrenar ratas en la tarea de evitación inhibitoria con intensidades de choque eléctrico 0.5, 1.0 o 2.0 mA.
- Evaluar la retención y la extinción de la tarea de evitación inhibitoria mediada por diferentes intensidades de choque eléctrico.
- Cuantificar las neuronas en las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo que presentan el receptor a glucocorticoides fosforilado e internalizado en el núcleo, en

ratas entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria mediada por diferentes intensidades de choque eléctrico (0.5, 1.0 y 2.0 mA).

## 6. Materiales y métodos

El protocolo experimental del proyecto se llevó a cabo bajo los lineamientos aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM para el uso de animales experimentales acorde a las normas estipuladas por la norma mexicana (SAGARPANOM-062-ZOO-1999) y por la “Guide for care and use of Laboratory Animals” del NIH (National Research Council, 2011).

### 6.1 Sujetos

Se utilizaron 64 ratas macho adultos de la cepa Wistar, con un peso entre 250 y 300 g de la colonia del bioterio del Instituto de Neurobiología, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las ratas permanecieron en el bioterio del Laboratorio de Aprendizaje y Memoria; se mantuvieron en cajas de acrílico individuales de 47.6 cm x 25.6 cm x 20.6 cm con cama de aserrín, agua y comida *ad libitum*, con ciclo de luz-oscuridad de 12/12 h (luz encendida a las 7:00 h) y una temperatura constante de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 6.2 Evitación inhibitoria

La cámara de condicionamiento consta de dos compartimientos del mismo tamaño (30 x 30 cm cada uno) separados por una puerta deslizante y construida de acrílico rojo transparente, ubicada en un cuarto oscuro sonooamortiguado. Un compartimiento llamado “de seguridad” está más iluminado que el otro (por luz incandescente de 10 W) y tiene una rejilla metálica en el piso con espacios de 16 mm. El otro compartimiento “de castigo” es oscuro y las paredes laterales son en forma de V, de acero inoxidable, las cuales llegan al piso del compartimiento (justo a la mitad del compartimiento) y tienen una distancia entre ellas de 15 mm. Estas paredes laterales pueden ser electrificadas por un estimulador de corriente constante (GRASS S48, U.S.A.). La duración de la aplicación de los estímulos, las latencias de entrada y de

retención fueron medidas automáticamente con un cronómetro digital Scheider Electric S486 (Figura 10).

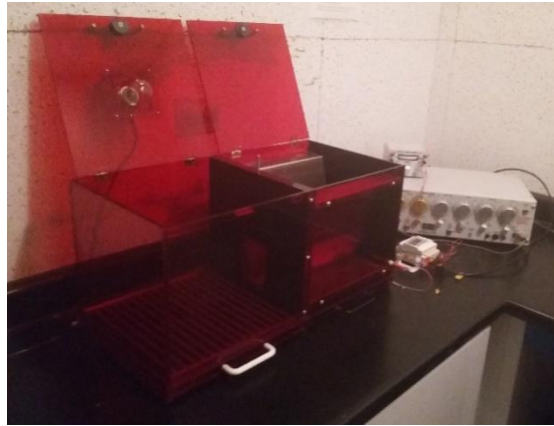


Figura. 10. Fotografía de la caja de evitación inhibitoria conectada a un estimulador y a un contador automático.

### 6.3 Grupos y tratamientos

Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a uno de los 6 grupos: ratas que solamente fueron manipuladas, pero no entrenados en la tarea, ratas que fueron entrenadas en la tarea sin recibir choque eléctrico, ratas que fueron entrenadas en la tarea ya sea con un choque de 0.5, 1.0 o 2.0 mA. Además, un grupo de ratas que no fue entrenado en la tarea de evitación inhibitoria, pero fue expuesto directamente al choque eléctrico alto (2.0 mA) durante 6.07 segundos que corresponde a los 5 segundos de exposición al choque en el compartimento oscuro más el promedio de tiempo de escape que tuvieron las ratas entrenadas en la tarea con 2.0 mA, este grupo tuvo como finalidad determinar la fosforilación del GR debida solo al choque (Tabla 1).

Tabla 1. Organización de los grupos experimentales

Grupo	Tratamiento	n conductual	N histológica
Sólo Manipulado (Man)	-----	-----	4
Sin choque eléctrico (0.0 mA)	0.0 mA	10	4
Intensidad baja (0.5 mA)	0.5mA	10	4
Intensidad media 1.0 mA)	1.0 mA	10	4
Intensidad alta (2.0 mA)	2.0 mA	10	4
Sólo choque (Sch 2.0 mA)	2.0 mA	-----	4

#### 6.4 Sesión de entrenamiento

Durante la sesión de entrenamiento, se colocó a la rata en el compartimiento iluminado, después de 10 s se abrió la compuerta que separa ambos lados de la caja, se midió el tiempo en que la rata cruzó la puerta para pasar al compartimiento oscuro (latencia de entrada), en ese momento se cerró la compuerta y comenzó la descarga eléctrica durante 10 s, al transcurrir los primeros 5 s de choque eléctrico la puerta fue abierta y se contabilizó el tiempo que le tomó a la rata escapar (latencia de escape). Terminado el entrenamiento cada uno de los grupos fue dividido en dos subgrupos: uno que fue sometido a la sesión de prueba y extinción; y el otro que fue utilizado para la detección del pGR.

#### 6.5 Sesión de prueba

A las 48 horas después del entrenamiento, se llevó a cabo la prueba de retención, colocando cada rata nuevamente en la caja de evitación inhibitoria. En esta sesión se siguió el mismo procedimiento empleado durante el entrenamiento, pero esta vez sin administrar el choque eléctrico; fue registrado el tiempo que le tomó al animal entrar al compartimiento oscuro, dando como máximo un tiempo de 600 s (latencia de retención).

#### 6.6 Extinción

A las 48 horas después de la sesión de entrenamiento, se midió la latencia de retención y la extinción de la tarea aprendida, las cuales fueron registradas cada 24 horas durante seis días consecutivos, llevando a cabo el mismo procedimiento que el día de prueba, el cual fue tomado como la primera retención.

#### 6.7 Obtención de tejido

Sesenta minutos después del entrenamiento las ratas fueron sacrificadas e inmediatamente después se realizó la extracción del cerebro, con el fin de permitir el

tiempo adecuado para que el receptor a glucocorticoides fosforilado en la serina 211 se translocará al núcleo. El cerebro fue congelado en isopentano a  $-30^{\circ}\text{C}$  aproximadamente y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## 6.8 Cortes cerebrales

Los cerebros fueron seccionados con la ayuda de navajas y una matriz de disección para cerebro de rata, se obtuvo la región medio-posterior del hemisferio izquierdo donde se encuentra el hipocampo. Una vez realizada la disección para su criosección los cerebros fueron distribuidos en bloques de hemisferios izquierdos distribuyéndolos aleatoriamente, designando al menos un sujeto del grupo manipulado por cada bloque como medida estereológica.

Se realizaron cortes coronales de  $20\ \mu\text{m}$  de grosor colocados en laminillas silanizadas (se utiliza este tipo de laminillas para asegurar una mejor adhesión del tejido a la laminilla sin dañarlo). Finalizados los cortes, Bregma  $-0.94$  a  $-2.80$  (Paxinos & Watson, 2007) se escogieron aquellas laminillas correspondientes a la ubicación del hipocampo dorsal.

## 6.9 Técnica inmunohistoquímica

Los tejidos fueron fijados en una solución de paraformaldehído al 2% y se lavaron con buffers TBS y TBS-T, para posteriormente ser sumergidos en una solución de bloqueo. Después se incubaron con el anticuerpo primario Phospho-Glucocorticoid Receptor (Ser211) (Antibody de CellSignaling) para detectar al receptor a glucocorticoides fosforilado en la Ser211. Posteriormente las laminillas fueron colocadas en incubación con el anticuerpo secundario (Goat Anti-Rabbit IgG-H&L (Biotin) que reconoce al anticuerpo primario.

La tinción fue visualizada usando el sistema de fluorescencia cianina 3 (Cy3) y los núcleos fueron contrateñidos con SYTOXgreen, en la Figura 11 se muestran imágenes representativas.



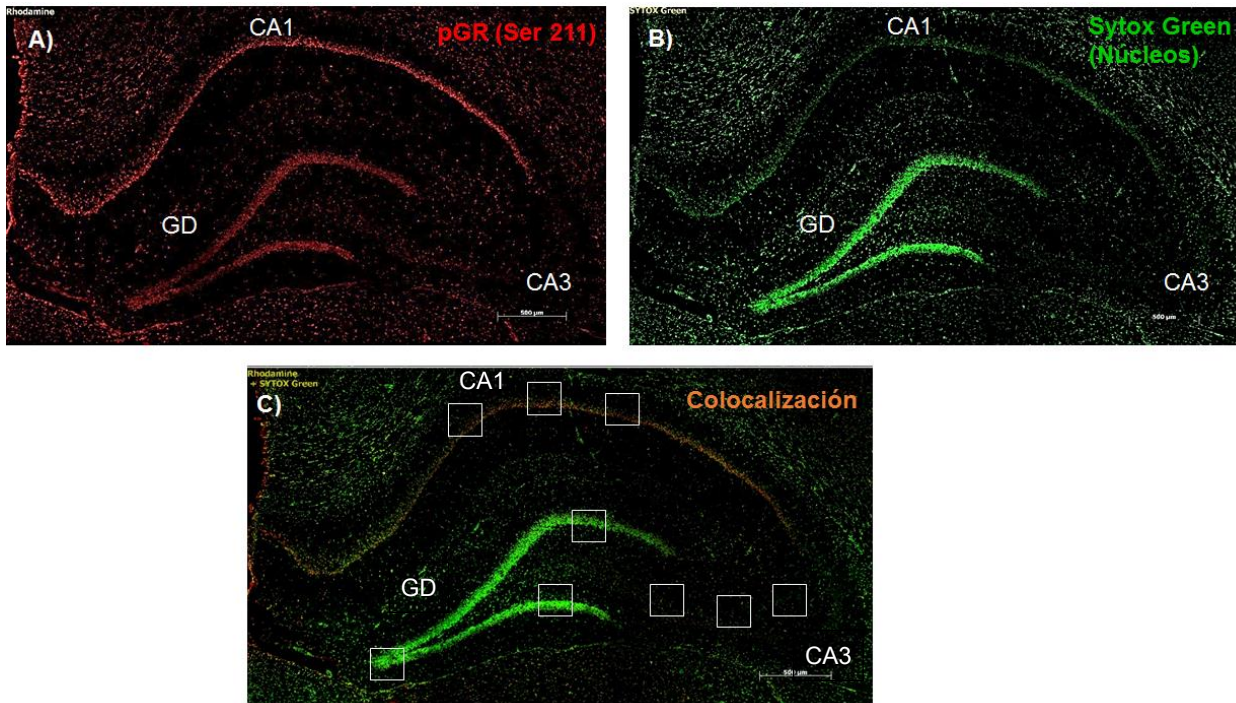


Figura. 11. Imágenes panorámicas del hipocampo dorsal izquierdo tomadas con el microscopio de fluorescencia Apotome. A) Inmunomarcaje de pGR-Ser211 en rojo. B) Contraintinción de los núcleos celulares con SYTOX Green. C) Colocalización de imágenes y ubicación de las 3 tomas por región. Barra de escala 500  $\mu\text{m}$ .

### 6.10 Toma de imágenes

El apilamiento de las imágenes en “Z-stack” de los tejidos se obtuvieron a partir de un objetivo apocromático 40x con el software de imágenes “AxioVision 4.8” en el sistema Apotome(ZEISS).

### 6.11 Análisis de imágenes

Después de obtener las imágenes de cada región con varios planos en Z (Z stack), éstas fueron analizadas con el programa IMAGE-J (Licencia libre). A partir del plano medial de cada apilamiento de imágenes en Z, se tomaron solo el 60% (30% hacia arriba y 30% hacia abajo) para poder observar y contabilizar los núcleos de las neuronas hipocampales contrateñidas con SYTOXGreen, esto con el fin de no contabilizar núcleos incompletos o que parte de ellos estuvieran en otra laminilla y prevenir que fueran contabilizados doble vez. Terminado el conteo de núcleos se hizo

la colocación de las imágenes (núcleos con SYTOXGreen y pGR-Ser211 con Cy3) y tomando en cuenta todos los planos útiles, se observaron y contabilizaron aquellos núcleos previamente marcados y contados que empalmaban con la señal del pGR-Ser211 (Cy3). Como criterio de inclusión se tomó en cuenta que la señal de pGR-Ser211 ocupara más de la mitad del núcleo y que la señal estuviera presente como mínimo en 3 planos en la proyección en Z, aquellos núcleos que cubrían con estos criterios fueron designados como núcleos pGR+ (Figura 12). Para determinar la proporción de núcleos pGR+ para cada región del hipocampo (CA1, CA3 y GD) se evaluaron los núcleos pGR+/los núcleos totales. Como método de control, el análisis de las imágenes se realizó en ciego, es decir, no se tuvo conocimiento de los grupos experimentales a los que pertenecía cada imagen al ser analizada.

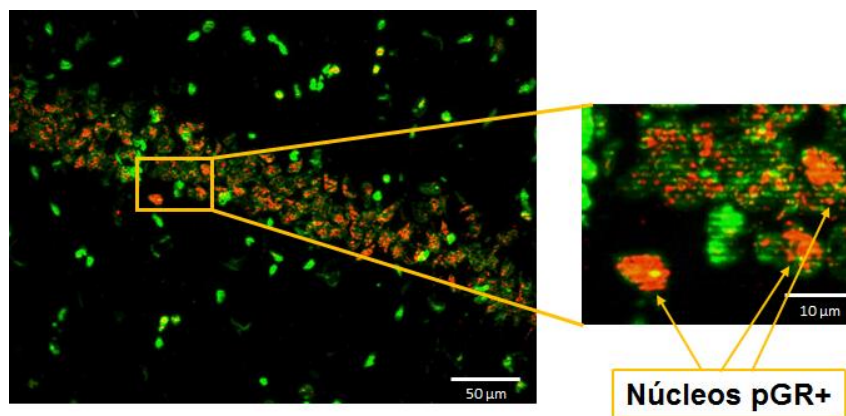


Figura. 12. Núcleos pGR+. Imagen de la colocación de señal en la región de CA1 tomadas con objetivo apocromático 40x del microscopio de fluorescencia Apotome. Las flechas señalan núcleos celulares determinados como núcleos pGR+. En verde se muestran la contraindicación de núcleos con SYTOX Green. En rojo se muestra la señal de pGR-Ser211. 50 y 10 µm.

## 6.12 Análisis estadístico

Las latencias de entrada y de escape de la sesión de entrenamiento y las latencias de retención de cada una de las sesiones de extinción fueron analizadas con estadística no paramétrica, debido a que los datos no siguieron una distribución normal, ya que se realizó un corte arbitrario en las latencias.

Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para conocer si existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, y con la finalidad de determinar entre que grupos se encontraban las diferencias se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney. Para comparar las latencias de retención a lo largo de las 6 sesiones de extinción se utilizó la prueba no paramétrica de medidas repetidas de Friedman por grupo y en caso de presentar diferencias se realizó una prueba de Wilcoxon entre pares de sesiones.

Debido a que la proporción de los núcleos pGR+ en las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo cumplieron con la prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov ( $p > 0.05$ ) se realizó la prueba paramétrica ANOVA de una vía para comparar entre grupos, en caso de existir diferencias significativas se utilizó la prueba post hoc de Tukey para determinar entre cuales grupos están las diferencias.

Las hipótesis fueron evaluadas con un nivel de significancia menor o igual a 0.05.

El diagrama general que resume el protocolo experimental descrito se representa en la Figura 13.

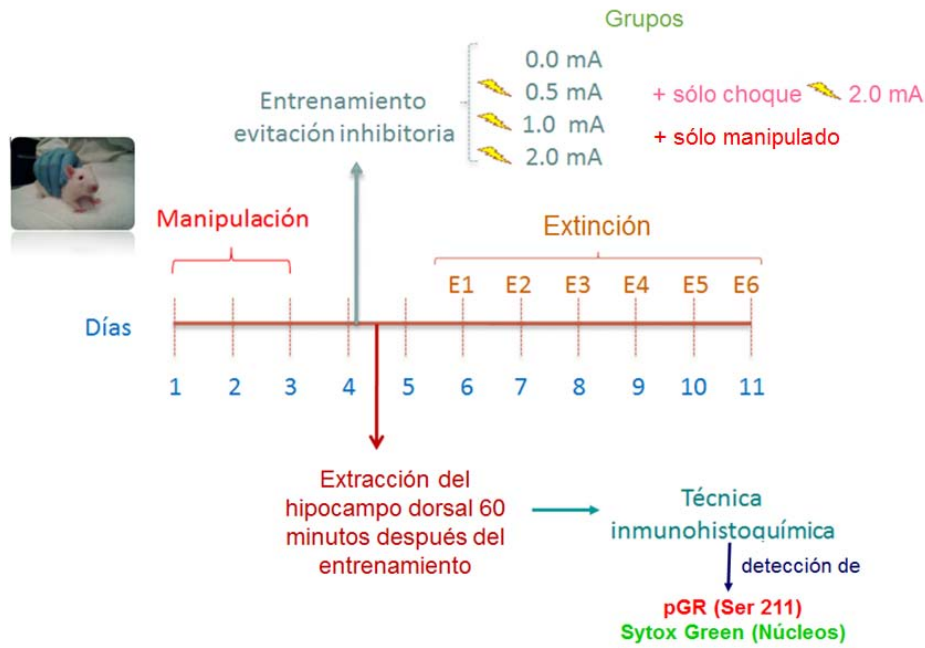


Figura 13. Diagrama general del protocolo experimental. Todos los grupos fueron manipulados durante tres días. Al cuarto día, los grupos de 0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 se entrenaron en la tarea de evitación inhibitoria; el grupo de sólo choque no fue sometido a la tarea. Se tomaron 4 ratas de cada grupo que fueron sacrificadas una hora después del entrenamiento para determinar la activación del pGR mediante una técnica de inmunohistoquímica. A la parte restante de cada grupo se le midió la extinción de la tarea 48 h después del entrenamiento del día 6 al 11.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Conductuales

Los datos de las latencias de entrada, escape y retención de cada grupo entrenado en la tarea de evitación inhibitoria, no siguen una distribución normal debido a que se realizó un corte arbitrario de medición, por ello se realizó un análisis no paramétrico. Para hacer una comparación entre los grupos entrenados (0.0, 0.5, 1.0 y 2.0) se realizó la prueba estadística de Kruskal Wallis, en caso de haber encontrado diferencias estadísticas, se aplicó una prueba post hoc de U de Mann-Whitney para la comparación entre pares de grupos. Los datos fueron graficados en medianas y rangos intercuartiles.

#### 7.1.1 Latencias de Entrada, Escape y Retención

El día del entrenamiento se registraron las latencias de entrada y escape para cada uno de los grupos, mientras que las latencias de retención fueron tomadas 48 horas después del entrenamiento.

Los grupos entrenados con diferentes intensidades de choque eléctrico (0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mA) no presentaron diferencias significativas en las latencias de entrada ( $H_{(3)} = 3.816$ ;  $p < 0.2820$ ), lo cual indica que todos los sujetos se encontraban en las mismas condiciones motoras.

Por el contrario en las latencias de escape los grupos presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $H_{(3)} = 25.83$ ;  $p < 0.0001$ ). La prueba U de Mann-Whitney mostró que los grupos entrenados con 0.5 ( $U = 3.0$ ;  $p < 0.0001$ ), 1.0 ( $U = 0.0$ ;  $p < 0.0001$ ) y 2.0 ( $U = 0.0$ ;  $p < 0.0001$ ) mA fueron diferentes del grupo entrenado con 0.0 mA.

La comparación de las latencias de retención de los grupos, mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $H_{(3)} = 32.23$ ,  $p < 0.0001$ ). La prueba post hoc demostró que el grupo de 0.0 mA no difiere del grupo de 0.5 mA pero si de los grupos entrenados con 1.0, 1.0 ( $U = 0.0$ ;  $p < 0.0001$ ) y 2.0 ( $U = 0.0$ ;  $p < 0.0001$ ).

En la Figura 14 se muestran los datos de las latencias de entrada, escape y retención de los grupos entrenados en la tarea de evitación inhibitoria con 0.0, 0.5, 1.0 o 2.0 mA.

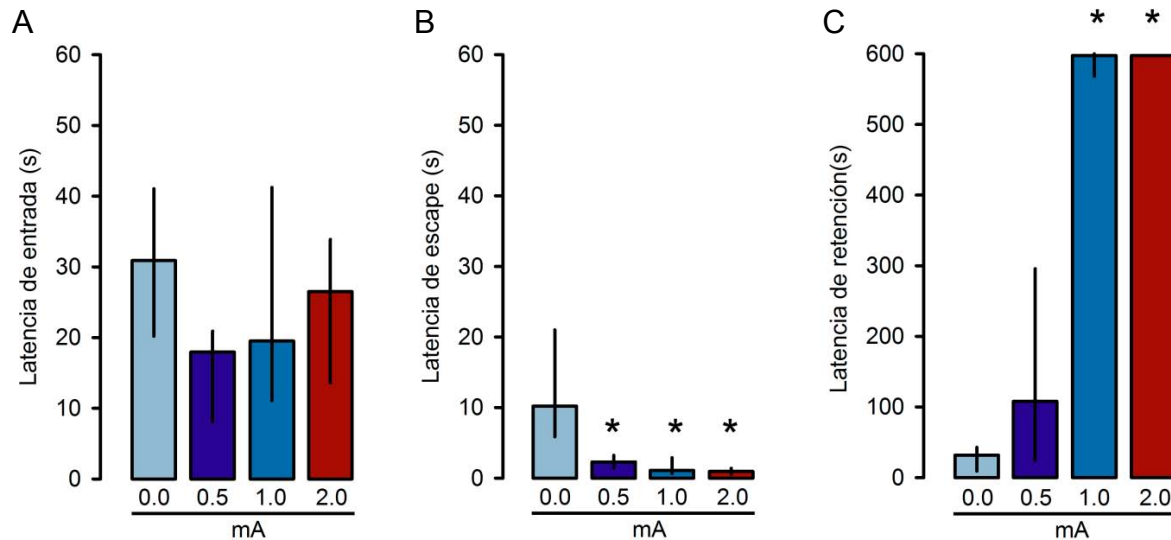


Figura 14. Se muestran los datos en medianas con rangos intercuartiles de cada grupo. Los grupos entrenados con 0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mA no presentaron diferencias significativas en las latencias de entrada (A) pero sí en las de escape (B) y de retención (C). El \* marca las diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo de 0.0 mA. El análisis estadístico utilizado fue la prueba de Kruskal Wallis y como prueba post-hoc la U de Mann-Whitney ( $p \leq 0.05$ ).

### 7.1.2 Extinción

A partir de las 48 horas después del entrenamiento se comenzaron a registrar las latencias de retención de cada grupo (0.0, 0.5, 0.1 y 2.0 mA) a lo largo de 6 días, cada 24 horas. La gráfica de la curva de extinción obtenida se muestra en la Figura 15.

#### 7.1.2.1 Análisis estadístico entre los grupos

Se utilizó la prueba Kruskal Wallis para comparar los grupos por sesión a lo largo de los 6 días ( $p < 0.001$  para cada sesión), y una prueba U de Mann-Whitney en caso de presentarse diferencias.

En el día 1 ( $H_{(3)} = 23.28$ ), la retención de la tarea del grupo de 0.0 mA es significativamente diferente de la retención de los grupos de 1.0 ( $U = 2.0$ ;  $p < 0.0001$ ) y 2.0 mA ( $U = 0.00$ ;  $p < 0.0001$ ); de igual manera que el grupo de 0.5 mA con los grupos de 1.0 ( $U=24.50$ ;  $p = 0.0435$ ) y 2.0 mA ( $U = 16.50$ ;  $p = 0.0049$ ).

En el día 2 ( $H_{(3)} = 22.08$ ) el grupo de 0.0 mA difiere de los grupos de 1.0 ( $U=6.0$  ;  $p = 0.0003$ ) y 2.0 mA ( $U=1.00$  ;  $p < 0.0001$ ) El grupo de 0.5 mA difiere del grupo de 2.0 mA ( $U=10.00$   $p = 0.0017$ ).

En el día 3 ( $H_{(3)} = 20.91$ ), el grupo de 0.0 mA es significativamente diferente de los grupos de 1.0 ( $U = 6.0$  ;  $p = 0.0003$ ) y 2.0 mA ( $U = 0.00$ ;  $p < 0.0001$ ); el grupo de 0.5 mA es diferente del grupo de 2.0 mA ( $U = 13.50$ ;  $p = 0.0063$ ).

En el día 4 ( $H_{(3)} = 19.71$ ), el grupo de 0.0 mA es significativamente diferente de los grupos de 1.0 ( $U = 9.00$ ;  $p = 0.0022$ ) y 2.0 mA ( $U = 2.00$ ;  $p = 0.0003$ ); el grupo de 0.5 mA es diferente del grupo de 2.0 mA ( $U = 17.50$  ;  $p = 0.0155$ ).

En el día 5 ( $H_{(3)} = 17.61$ ), la retención del grupo de 0.0 mA es significativamente diferente de los grupos de 1.0 ( $U = 19.00$  ;  $p = 0.0185$ ) y 2.0 mA ( $U = 2.00$  ;  $p = 0.0001$ ); el grupo de 0.5 mA es diferente del grupo de 2.0 mA ( $U = 11.50$  ;  $p = 0.0041$ ) y el grupo de 1.0 mA es diferente del grupo de 2.0 mA ( $U = 20.00$ ;  $p = 0.0232$ ).

Finalmente en el día 6 ( $H_{(3)} = 15.42$ ), el grupo de 2.0 mA mantiene la diferencia en su retención con respecto a todos los demás grupos, con el de 0.0 mA ( $U = 7.00$  ;  $p = 0.0005$ ); del grupo de 0.5 mA ( $U = 12.00$  ;  $p = 0.0029$ ) y del grupo de 1.0 mA ( $U = 13.00$ ;  $p = 0.0039$ ).

Como puede observarse el grupo de 1.0 mA es significativamente diferente del grupo de 0.0 mA en las sesiones 1, 2, 3, 4 y 5; el grupo de 2.0 mA es diferente del grupo 0.0 mA a lo largo de las seis sesiones lo cual indica una diferencia en la retención entre ambos grupos a lo largo de las 6 sesiones de extinción.

#### 7.1.2.2 Análisis estadístico dentro de los grupos

También se llevó a cabo el análisis estadístico de la conducta de retención dentro de cada grupo mediante la prueba de medidas repetidas Friedman para comparar las latencias de retención dentro de los grupos a lo largo de las 6 sesiones y en caso de presentar diferencias se realizó una prueba de Wilcoxon.

Dentro del grupo de 0.0 mA no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las latencias de retención del grupo a lo largo de las 6 sesiones ( $F = 9.029$ ,  $p = 0.1079$ ), por lo que la retención se mantiene sin cambios.

Dentro del grupo de 0.5 mA se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las retenciones con respecto al día uno ( $F_{(5)} = 18.67$  ;  $p=0.0022$ ) en los días 3( $p = 0.0391$ ); 4 ( $p = 0.0391$ ); 5( $p = 0.0078$ ) y 6 ( $p = 0.098$ ).

De igual manera dentro del grupo de 1.0 mA se encontraron diferencias ( $F_{(5)} = 36.03$  ;  $p < 0.0001$ ) a partir del día 3( $p = 0.0234$ ); 4 ( $p = 0.0020$ ); 5( $p = 0.0020$ ) y el día 6 ( $p = 0.0020$ ).

Finalmente dentro del grupo de 2.0 mA hubo diferencias ( $F_{(5)} = 33.54$ ,  $p < 0.0001$ ) del día 1 con respecto a los días 3( $p=0.156$ ); 4 ( $p = 0.0039$ ); 5( $p = 0.0039$ ) y el día 6 ( $p = 0.0039$ ).

Tomando como punto de comparación las latencias de retención, a lo largo de los 6 días, “dentro” de cada grupo, se puede observar que los grupos entrenados con intensidad de choque eléctrico (0.5, 1.0 y 2.0 mA) presentan diferencias conductuales en las latencias de retención a partir del día 3, esto con respecto al primer día de prueba.

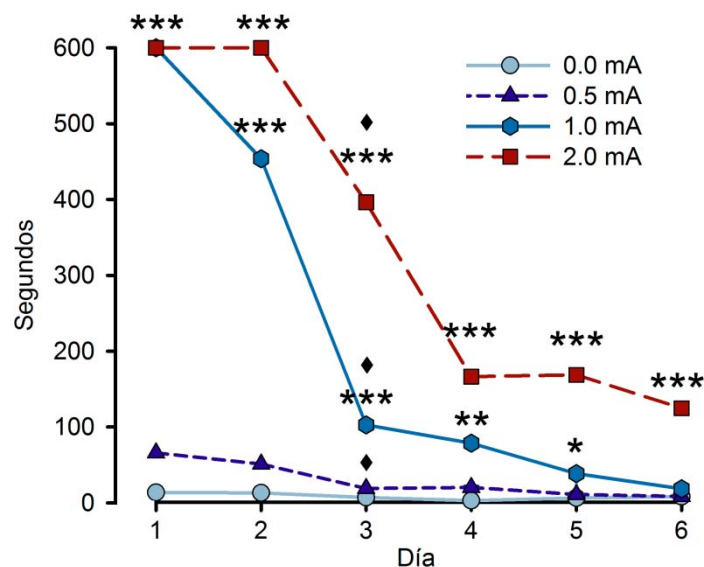


Figura 15. Se muestran las medianas de las latencias de retención a través de las 6 sesiones de extinción de los grupos entrenados en la tarea de evitación inhibitoria con 0.0, 0.5, 1.0 o 2.0 mA. El asterisco \* indica diferencias significativas entre los grupos por sesión con respecto al grupo de 0.0 mA (\* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$  y \*\*\* $p<0.001$ ). El análisis estadístico utilizado fue la prueba de Kruskal Wallis y la U de Mann-Whitney ( $p<0.0001$ ). El signo ♦ ( $p<0.05$ ) indica diferencias significativas dentro de los grupos entre las latencias de retención de los 6 días con respecto a la sesión 1, en esta comparación se utilizó la prueba de Friedman y como prueba post-hoc la de Wilcoxon ( $p<0.0001$ ).

## 7.2 Histológicos

Se contabilizaron las neuronas de las regiones de CA1, CA3 y GD del hipocampo que mostraron el receptor a glucocorticoides fosforilado en la serina 211 (pGR-211) internalizado en el núcleo, consideradas como pGR+, para cada uno de los grupos entrenados (0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mA) y para los grupos manipulado (Man) y solo choque (Sch 2.0 mA). La proporción de neuronas pGR+ se obtuvo a partir de la división entre el número de núcleos pGR+/número total de núcleos. Para el análisis estadístico se realizó una prueba de análisis de varianza (ANDEVA) de un factor y una prueba pos-hoc de Tukey.

### 7.2.1 NeuronaspGR+ en el cuerno de Ammón 1 (CA1)

Los grupos entrenados con diferentes intensidades de choque eléctrico, el grupo Man y el de Sch 2.0 mA presentaron diferencias en la proporción de pGR+ en la región de CA1 ( $F_{(5,17)}=22.70$  ;  $p < 0.001$ ); el grupo Man presentó una proporción de pGR+ basal que no difirió de los grupos entrenados con 0.0 mA y 0.5 mA. Se observó un incremento en la proporción de las neuronas pGR+ en los grupos entrenados con 1.0 mA ( $p < 0.01$ ), 2.0 mA ( $p < 0.001$ ) y el grupo de Sch 2.0 mA ( $p < 0.05$ ).

El grupo de 1.0 mA fue estadísticamente diferente en comparación con los grupos entrenados con 0.0 ( $p < 0.05$ ) y 0.5 mA ( $p < 0.05$ ).

Sin embargo, el grupo entrenado con 2.0 mA presenta la mayor proporción de neuronas pGR+ y es significativamente diferente de todos los demás grupos ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ ) (Figura 16).



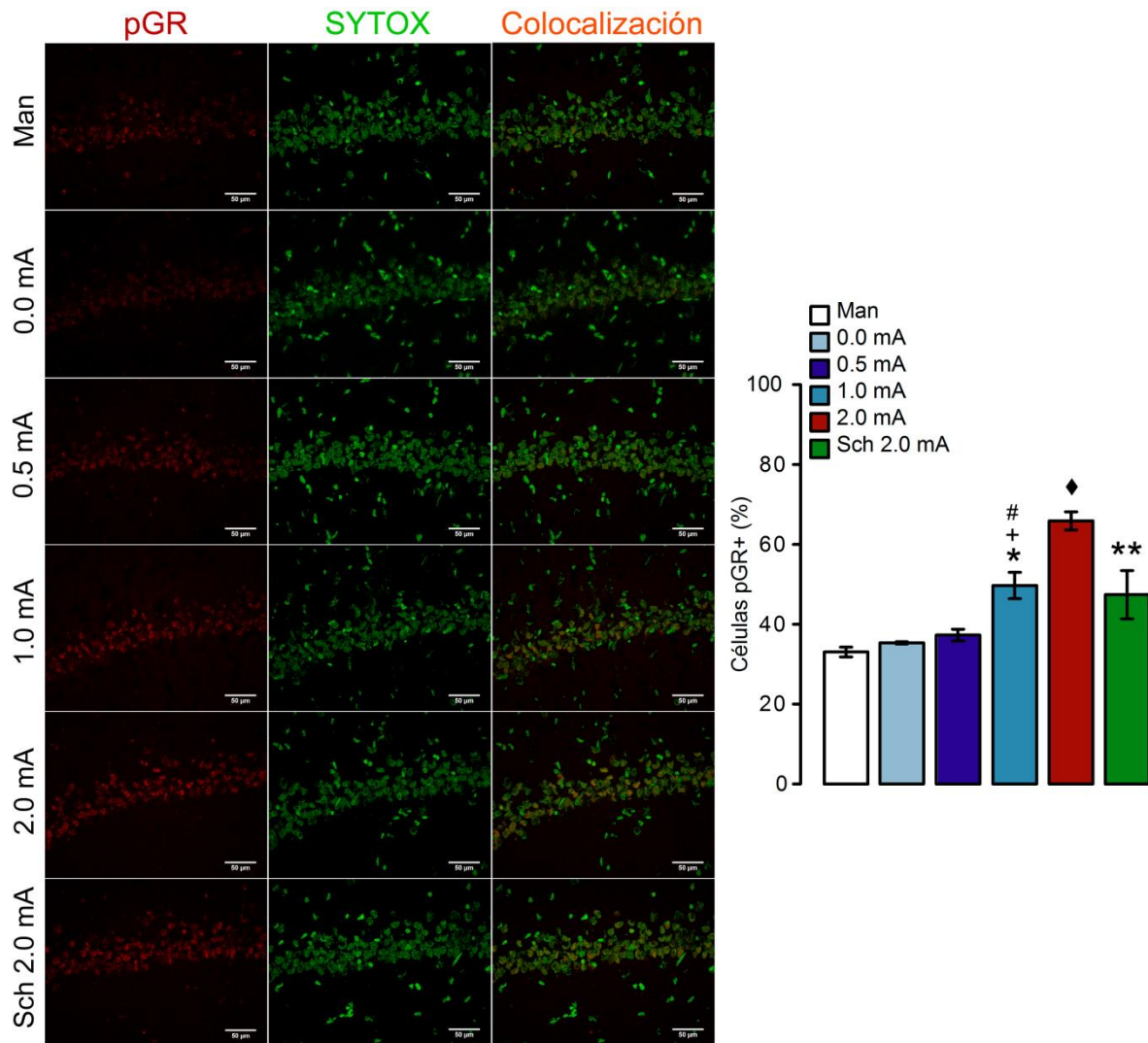


Figura 16. Neuronas pGR+ en CA1. Del lado izquierdo se muestran las imágenes representativas tomadas con el microscopio Apotome con objetivo de 40x de la región de CA1 para cada uno de los grupos, en la primera columna se muestra en rojo al GR fosforilado en la serina 211, en la segunda columna se observan en el verde los núcleos contrañeidos con SYTOX Green y en la tercera columna la colocalización de ambas imágenes. Del lado derecho se muestran los porcentajes de las células pGR+ para cada uno de los grupos. \* Diferencias con respecto al grupo Man (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ). + Con respecto al grupo de 0.0 mA. # Con respecto al grupo de 0.5 mA. ♦ con respecto a todos los demás grupos. Se utilizó la prueba de ANDEVA ( $F_{(5,17)} = 22.70$ ;  $p < 0.001$ ) y la prueba post-hoc de Tukey. Escala 50  $\mu\text{m}$ . Man manipulados, Sch solo choque. Las barras blancas indican 50  $\mu\text{m}$ .

### 7.2.2 NeuronaspGR+ en el cuerno de Ammón 3(CA3)

Al analizar estadísticamente la proporción de neuronas pGR+ en la región de CA3 del hipocampo entre todos los grupos no se observaron diferencias estadísticamente significativas( $F_{(5,18)} = 0.6674$  ;  $p > 0.05$ ).

En la Figura 17 se muestra el porcentaje de las células pGR+ de CA3 en cada grupo.

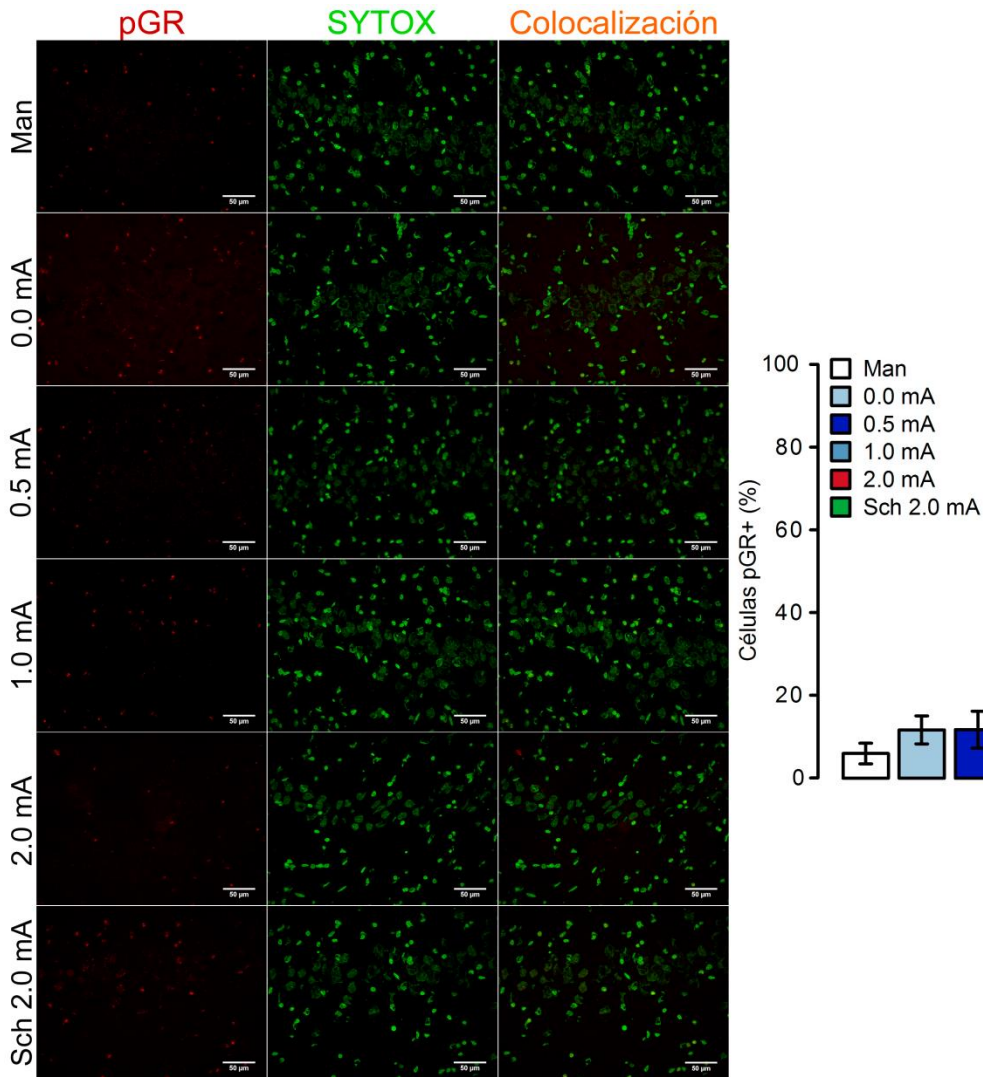


Figura 17. Neuronas pGR+ en CA3. Del lado izquierdo se muestran las imágenes representativas tomadas con el microscopio Apotome con objetivo de 40x de la región de CA3 para cada uno de los grupos, en la primera columna se muestra en rojo al GR fosforilado en la serina 211, en la segunda columna se observan en el verde los núcleos contrañeidos con SYTOX Green y en la tercera columna la colocalización de ambas imágenes. Del lado derecho se muestran los porcentajes de las células pGR+ en la región de CA3 del hipocampo en cada uno de los grupos (Man, 0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mA; y Sch 2.0 mA). No hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Se utilizó la prueba de ANDEVA ( $F_{(5,18)}=0.6674$ ;  $p > 0.05$ ). Escala 50  $\mu$ m. Man manipulados, Sch solo choque. Las barras blancas indican 50  $\mu$ m.

### 7.2.3 NeuronaspGR+ en el giro dentado (GD)

En la región del GD del hipocampo, la proporción de núcleos pGR+ no difiere entre los grupos ( $F_{(5,18)} = 0.5099$  ;  $p > 0.05$ ).

En la Figura 18 se muestran los datos de las células pGR+ en porcentajes, que corresponden a la región del GD del hipocampo para cada uno de los grupos.

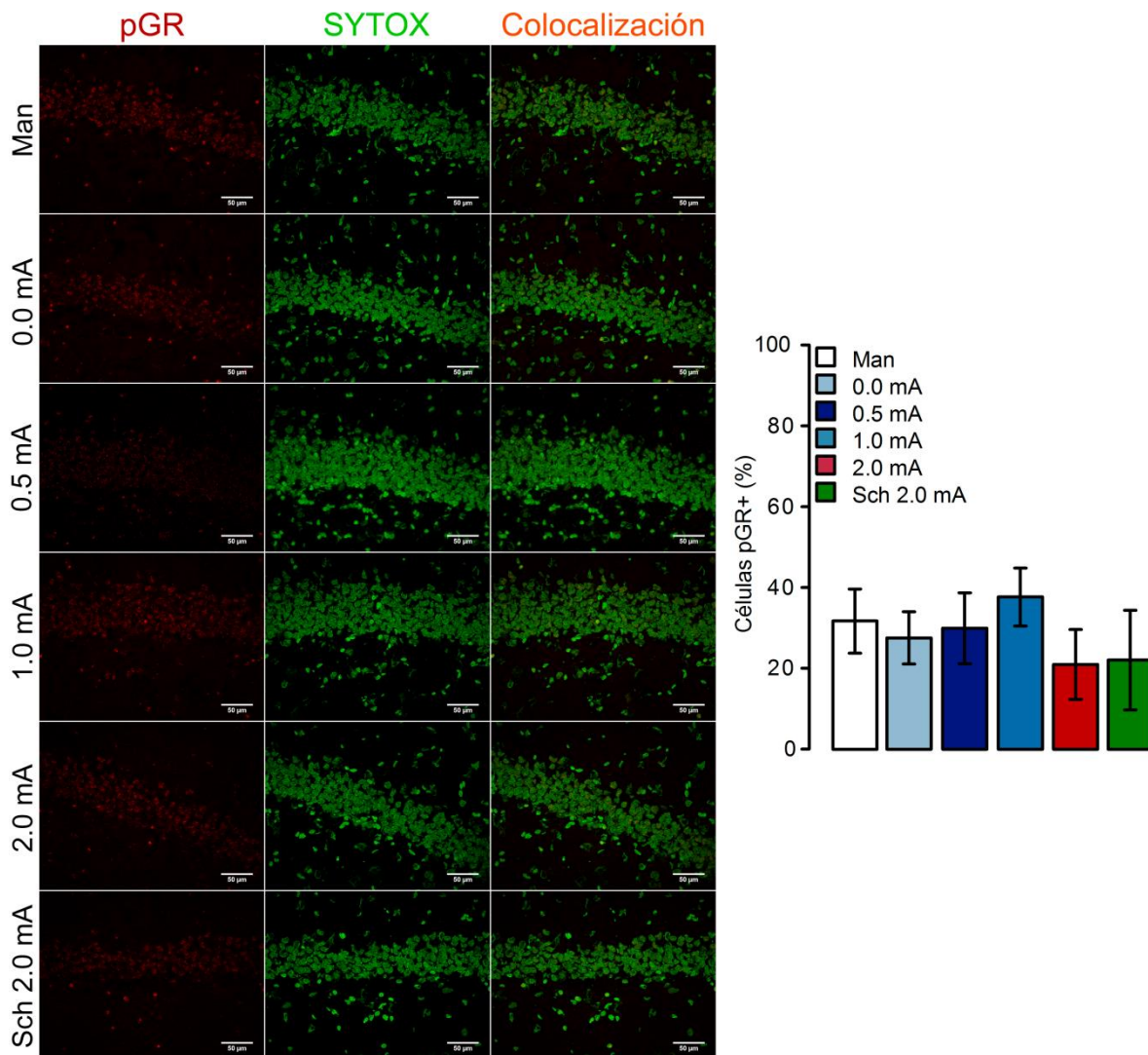


Figura 18. Neuronas pGR+ en GD. Del lado izquierdo se muestran las imágenes representativas tomadas con el microscopio Apotome con objetivo de 40x de la región de GD para cada uno de los grupos, en la primera columna se muestra en rojo al GR fosforilado en la serina 211, en la segunda columna se observan en el verde los núcleos contrateñidos con SYTOX Green y en la tercera columna la colocalización de ambas imágenes. Del lado derecho se muestran los porcentajes de las células pGR+ en la región de GD del hipocampo en cada uno de los grupos (Man, 0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mA; y Sch 2.0 mA). El ANDEVA no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $F_{(5,18)}=0.5099$ ;  $p>0.05$ ). Escala 50  $\mu$ m. Man manipulados, Sch solo choque. Las barras blancas indican 50  $\mu$ m.

## 8. DISCUSIÓN

Los datos conductuales de los grupos entrenados en la tarea de evitación inhibitoria con diferentes intensidades de choque eléctrico, muestran que las latencias de entrada no difirieron estadísticamente, esto indica que las ratas de cada grupo presentaron las mismas condiciones motoras para poder adquirir la tarea. En contraste las latencias de escape fueron diferentes entre los grupos; aquellos que recibieron el choque eléctrico escaparon en menor tiempo que el grupo que no recibió descarga eléctrica; esto puede explicarse en términos de la respuesta de lucha o huida, desencadenada ante la presencia de un estímulo que pone en riesgo la integridad y la homeostasis del organismo (Sandi et al., 2001).

Al evaluar la retención de la tarea de evitación inhibitoria a lo largo de las 6 sesiones de prueba se observó que las ratas entrenadas con el choque eléctrico más alto (2.0 mA) mostraron las retenciones más altas, seguidas por las del grupo entrenado con 1.0 mA; estos datos ya han sido reportados antes en nuestro laboratorio (Garin-Aguilar et al., 2012). El hecho de que los grupos con intensidades más altas presenten una mejor memoria puede deberse a los niveles de corticosterona liberados después de la administración de la descarga eléctrica en los sujetos de cada grupo, ya que se ha reportado que el nivel circulante de estas hormonas aumenta en relación con la intensidad y fuerza del estresor, teniendo efecto facilitador o inhibitorio de la consolidación de la memoria, (Finsterwald & Alberini, 2014; Keller, Schreiber, Stanfield & Knox, 2015; Knox, Nault, Henderson & Liberzon, 2012; Medina et al., 2007; Sandi & Rose, 1997; Tronson, Corcoran, Jovasevic & Radulovic, 2012), con estos resultados podría suponer que hubo un efecto facilitador en la memoria en los grupos entrenados con intensidades altas de choque eléctrico.

En las regiones de CA3 y GD la proporción de neuronas pGR-Ser211+ no difirió entre los grupos en la tarea de evitación inhibitoria con diferentes intensidades de choque eléctrico, estos datos sugieren una baja participación del pGR-Ser211 en estas regiones ante este tipo de aprendizaje. En cambio, en la región CA1 la proporción de neuronas con pGR-Ser211 internalizado en el núcleo difirió entre los grupos, siendo mayor en el grupo entrenado con la intensidad de choque eléctrico más alto (2.0 mA)

esto puede deberse a la forma en que se organiza y procesa la información en cada región del hipocampo. Por un lado la funcionalidad del GD ha sido descrita a través de la teoría de separación de patrones que consiste en la transformación de las representaciones o recuerdos similares en representaciones muy diferentes que no se superponen, esta parte del proceso se le ha atribuido al giro dentado y sus proyecciones hacia CA3 (Leutgeb, Leutgeb, Moser & Moser, 2007). En cambio la funcionalidad de CA3 y sus proyecciones hacia CA1 han sido asociadas con el completamiento de patrones que es visto como una red de auto-asociación capaz de establecer patrones de activación almacenados previamente, basados en las señales parciales o similares de actividad provenientes del GD de tal manera que la información queda completa para proyectarse hacia CA1 (Bakker, Kirwan, Miller & Stark, 2008).

Otra diferencia entre las regiones y su funcionalidad se ha encontrado en la actividad eléctrica que presentan, a la región de CA3 se le ha atribuido una función de codificación rápida de nueva información (Leutgeb et al., 2007), y una mayor actividad eléctrica en presencia de objetos novedosos así como una actividad más rápida en el aprendizaje con respecto a CA1 que presenta una actividad eléctrica mayor en componentes de tipo espacial y una acción más retardada (Roth, Yu, Rao & Knierim, 2012).

Es importante mencionar que se ha observado que hay una mayor concentración de MR en comparación con la de GR en la región de CA3 (Han, Ozawa, Matsuda, Nishi, & Kawata, 2005; Sarabdjitsingh, Meijer, Schaaf & de Kloet, 2009), esto puede explicar la vulnerabilidad que presentan las neuronas CA3 a los efectos del estrés como la contracción dendrítica aparentemente reversible. Ante un estrés repetido los glucocorticoides y los aminoácidos excitatorios desencadenan una remodelación dendrítica en CA3, principalmente en las dendritas apicales (McEwen, 2016), éste efecto habla de la diferencia que presenta la región de CA3 ante el estrés.

En el caso del GD, es sabido que el estrés (crónico o agudo) y los glucocorticoides afectan la neurogénesis de esta región. Se ha propuesto también que las células granulares del GD responden menos que las de CA1 a la activación del GR (Joëls, 2006), este dato correlaciona con nuestros resultados encontrados en la proporción de neuronas pGR+ en las regiones de CA1 y GD.

Aunado a esto, la funcionalidad de cada región (CA1, CA3 y GD) difiere en aferencias y eferencias (Fanselow & Dong, 2010); plasticidad sináptica, liberación de BDNF y la regulación de los receptores de glutamato (Caudal, Jay & Godsil, 2014), de acuerdo a nuestros resultados, estas diferencias también quedan representadas en la activación del GR en cada región.

Por otra parte, se sabe que la corticosterona facilita la potenciación de largo plazo en la región CA1 inducida por la estimulación de alta frecuencia de las colaterales de Schaffer (Wiegert, Joëls & Krugers, 2006). CA1 además de recibir proyecciones de CA3 también recibe aferencias directas de la corteza entorrinal que proveen información espacial y de olor que contribuyen en el almacenamiento de la información (Igarashi, Ito, Moser, & Moser, 2014), es decir CA1 recibe más proyecciones lo que podría resultar en mayor actividad sináptica y diferente regulación molecular en situaciones de aprendizaje mediadas por un evento estresante que desencadenen una mayor activación del GR.

De manera particular el hecho de que los grupos entrenados en la tarea de evitación inhibitoria con diferentes intensidades de choque eléctrico difieran en la proporción de núcleos pGR+ en CA1 nos indica que esta región responde ante la variación del estímulo eléctrico a través de la modulación de la fosforilación del GR en la serina 211 (Ser211), esto puede deberse a la disponibilidad del GR en esta región y a la activación de las cinasas que fosforilan a la Ser211 en el dominio N terminal del GR (Adzic et al., 2009), como son la Cinasa dependiente de Ciclina 5 (CDK5) (Ismaili & Garabedian, 2004; Kino et al., 2007; Krstic, Rogatsky, Yamamoto & Garabedian, 1997) y la proteína cinasa activada por mitógeno p38 y p35 (MAPK p38) (Chen et al., 2008; Chrousos & Kino, 2009). De tal forma que ante una situación de aprendizaje mediada por un evento estresante estas dos cinasas son activadas por mecanismos de actividad neuronal y regulan la fosforilación del GR (Gallagher-Beckley & Cidlowski, 2009; Krstic et al., 1997; Su & Tsai, 2011).

Por una parte la CDK5 es una cinasa implicada en diversos procesos neuronales como la plasticidad sináptica (Odajima et al., 2011); señalización del dolor; migración neuronal; neurogénesis hipocámpal; desarrollo neuromuscular; señalización dopaminérgica; aprendizaje y memoria (Shah & Lahiri, 2014). En cambio la MAPK p38

es activada ante situaciones de estrés ambiental (Shen, Tsimberg, Salvadore, & Meller, 2004) y participa en la regulación de LTD (Finsterwald & Alberini, 2014); en la producción de citosinas (Bouazza et al., 2014; Manzoor & Koh, 2012); además se ha observado su participación en los procesos de memoria a corto y largo plazo en la tarea de evitación inhibitoria, específicamente en la región de CA1 (Alonso, Bevilacqua, Izquierdo, Medina & Cammarota, 2003; Donzis & Tronson, 2014; Zhen, Du, Romano, Friedman & Harvey, 2001); así como una función de control de energía que modula la acción de glucocorticoides en los tejidos diana (Nader et al., 2010).

Finalmente, a pesar de que el grupo de Sch 2.0 mA presenta un aumento en la proporción de neuronas pGR+ con respecto al grupo Man, esta proporción es menor que la observada en el grupo entrenado con la intensidad de choque eléctrico más alta (2.0 mA), este resultado nos indica que la activación del GR no se debe exclusivamente a la vía del dolor (Sch 2.0 mA), sino que el componente cognitivo (de aprendizaje) induce una mayor activación de GR en las neuronas de CA1 para la formación de un aprendizaje más fuerte con intensidades altas (2.0), en comparación con las condiciones normales de aprendizaje (0.0 y 0.5 mA) donde este incremento en la activación de GR no ocurre.

De tal manera que podríamos deducir que ante una experiencia con un estresor intenso, en el que el organismo se encuentra en riesgo, se lleva a cabo la activación de mecanismos de adaptación que permiten al individuo asegurar el almacenamiento de esta información y prepararlo para hacer frente a las demandas similares de manera efectiva cuando vuelvan a presentarse en el futuro, estos mecanismos pudieran estar mediados por la actividad de la vía del dolor y del sistema inmune dada la aplicación del choque eléctrico y la presencia de conductas como piloerección, defecación, hiperventilación que presentan las ratas después de la aplicación del choque eléctrico; dando como resultado una mayor actividad neuronal que incluyen mecanismos de señalización y comunicación celular (liberación de neurotransmisores, activación de receptores, cinasas, citosinas, entre otras) los cuales pueden aumentar conforme la intensidad del choque eléctrico es más alta en el entrenamiento, de tal manera que estas vías intervienen en la actividad de CA1, promoviendo una mayor fosforilación del

GR en la serina 211 en esta región conforme aumenta la intensidad del choque eléctrico.



## 9. CONCLUSIONES

La formación de la memoria es modulada por los estímulos presentes durante el momento de la experiencia aprendida, siendo aquellas experiencias estresantes las que presentan una mayor resistencia a la extinción.

El receptor a glucocorticoides, fosforilado en la serina 211 internalizado en los núcleos de las neuronas de la región CA1 del hipocampo participa en la consolidación del aprendizaje de la tarea de evitación inhibitoria mediada por intensidades de choque eléctrico alto (1.0 y 2.0 mA).

A pesar de que el grupo de Sch 2.0 mA presenta un incremento en la proporción de neuronas pGR+, el grupo entrenado con 2.0 mA presenta una proporción mayor, esto sugiere que las neuronas en la región CA1 del hipocampo responden a la asociación de la intensidad del estresor (choque eléctrico) y el contexto (evitación inhibitoria).

Por otra parte, la activación de GR en las regiones de CA3 y GD no responde ante los cambios de intensidades en el choque eléctrico.

## 10. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo han dado lugar a nuevas interrogantes sobre la participación de las cinasas sobre la regulación de la fosforilación del GR en la serina 211 en el hipocampo por lo tanto, se sugiere que bajo las mismas condiciones de entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria, utilizando las mismas intensidades de choque eléctrico de 0.5, 1.0 y 2.0 mA se lleven a cabo nuevas investigaciones que permitan:

Medir la actividad de la CDK5 y la MAP cinasa p38 en el hipocampo, en diferentes tiempos (antes de los 60 min) después del entrenamiento con el fin de observar la presencia de estas cinasas en cada una de las regiones del hipocampo (CA1, CA3 y GD)

Inhibir la CDK5 en el hipocampo y observar su efecto en la conducta y en la fosforilación del GR en la serina 211.

Inhibir la p38 en el hipocampo y observar su efecto en la conducta y en la fosforilación del GR en la serina 211.

Examinar la interacción funcional entre la CDK5, p38 y el GR en el hipocampo después del entrenamiento.

De igual manera seria interesante observar la fosforilación del GR en la serina 211 en núcleos gliales, bajo las mismas condiciones de entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria, utilizando las mismas intensidades de choque eléctrico (0.5, 1.0 y 2.0 mA) para poder cuantificar los núcleos de la glía que presentan el pGR-Ser211) internalizado, en las regiones CA1, CA3 y GD.

## 11. Referencias bibliográficas

- Adzic, M., Djordjevic, J., Djordjevic, A., Niciforovic, A., Demonacos, C., Radojicic, M., & Krstic-Demonacos, M. (2009). Acute or chronic stress induce cell compartment-specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alter its transcriptional activity in Wistar rat brain. *The Journal of Endocrinology*, *202*(1), 87-97. doi: 10.1677/JOE-08-0509
- Alonso, M., Bevilaqua, L. R. M., Izquierdo, I., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2003). Memory formation requires p38MAPK activity in the rat hippocampus. *Neuroreport*, *14*(15), 1989-1992. doi: 10.1097/01.wnr.0000091129.97039.f6
- Amaral, D., & Lavenex, P. (2007). Hippocampal neuroanatomy. En P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss & J. O'Keefe (Eds.), *The hippocampus book* (pp. 37-115). New York: Oxford University Press.
- Bakker, A., Kirwan, C. B., Miller, M., & Stark, C. E. (2008). Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus. *Science*, *319*(5870), 1640-1642. doi: 10.1126/science.1152882
- Bermúdez-Rattoni, F., & Prado-Alcalá, R. A. (2001). *Memoria ¿En dónde está y cómo se forma?* México, D.F.: Trillas.
- Bouazza, B., Debba-Pavard, M., Amrani, Y., Isaacs, L., O'Connell, D., Ahamed, S., . . . Tliba, O. (2014). Basal p38 mitogen-activated protein kinase regulates unliganded glucocorticoid receptor function in airway smooth muscle cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *50*(2), 301-315. doi: 10.1165/rcmb.2012-0522OC
- Bower, G. H., & Hilgard, E. R. (2011). *Teoría del aprendizaje* (5th ed.). México: Trillas.
- Cain, D. W., & Cidlowski, J. A. (2015). Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, *29*(4), 545-556. doi: 10.1016/j.beem.2015.04.007
- Carew, T. (1989). Developmental assembly of multiple components of learning and memory in *Aplysia*. En J. H. Byrne & W. Berry (Eds.), *Neural models of plasticity: Theoretical and empirical approaches* (pp. 22-45): Academic Press.
- Caudal, D., Jay, T. M., & Godsil, B. P. (2014). Behavioral stress induces regionally-distinct shifts of brain mineralocorticoid and glucocorticoid receptor levels. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *8*, 19. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00019
- Chang, S.-D., Chen, D.-Y., & Liang, K. C. (2008). Infusion of lidocaine into the dorsal hippocampus before or after the shock training phase impaired conditioned freezing in a two-phase training task of contextual fear conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory*, *89*(2), 95-105. doi: 10.1016/j.nlm.2007.07.012
- Chen, W., Dang, T., Blind, R. D., Wang, Z., Cavasotto, C. N., Hittelman, A. B., . . . Garabedian, M. J. (2008). Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *Molecular Endocrinology*, *22*(8), 1754-1766. doi: 10.1210/me.2007-0219
- Chrousos, G. P., & Kino, T. (2009). Glucocorticoid signaling in the cell. Expanding clinical implications to complex human behavioral and somatic disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1179*, 153-166. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04988.x

- De Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., & Joëls, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews*, *19*(3), 269-301. doi: 10.1210/edrv.19.3.0331
- Dillon, G. M., Qu, X., Marcus, J. N., & Dodart, J. C. (2008). Excitotoxic lesions restricted to the dorsal CA1 field of the hippocampus impair spatial memory and extinction learning in C57BL/6 mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, *90*(2), 426-433. doi: 10.1016/j.nlm.2008.05.008
- Donzis, E. J., & Tronson, N. C. (2014). Modulation of learning and memory by cytokines: Signaling mechanisms and long term consequences. *Neurobiology of Learning and Memory*, *115*, 68-77. doi: 10.1016/j.nlm.2014.08.008
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology*, *55*, 51-86. doi: 10.1146/annurev.psych.55.090902.142050
- Encio, I. J., & Detera-Wadleigh, S. D. (1991). The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, *266*(11), 7182-7188.
- Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, *65*(1), 7-19. doi: 10.1016/j.neuron.2009.11.031
- Finsterwald, C., & Alberini, C. M. (2014). Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: From adaptive responses to psychopathologies. *Neurobiology of Learning and Memory*, *112*, 17-29. doi: 10.1016/j.nlm.2013.09.017
- Gallagher-Beckley, A. J., & Cidlowski, J. A. (2009). Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB Life*, *61*(10), 979-986. doi: 10.1002/iub.245
- Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Cintra, S., Quirarte, G. L., Aguilar-Vázquez, A., Medina, A. C., & Prado-Alcalá, R. A. (2012). Extinction procedure induces pruning of dendritic spines in CA1 hippocampal field depending on strength of training in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *6*, 12. doi: 10.3389/fnbeh.2012.00012
- Garín-Aguilar, M. E., Medina, A. C., Quirarte, G. L., McGaugh, J. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2014). Intense aversive training protects memory from the amnesic effects of hippocampal inactivation. *Hippocampus*, *24*(1), 102-112. doi: 10.1002/hipo.22210
- Gehring, U. (1993). The structure of glucocorticoid receptors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *45*(1-3), 183-190. doi: 10.1016/0960-0760(93)90140-R
- González-Cabanach, R. (1995). Modelos de aprendizaje. En J. Beltrán & J. A. Bueno (Eds.), *Psicología de la educación* (pp. 287-306). Barcelona: Editorial Boixareu Universitaria - marcombo.
- Han, F., Ozawa, H., Matsuda, K.-i., Nishi, M., & Kawata, M. (2005). Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus. *Neuroscience Research*, *51*(4), 371-381. doi: 10.1016/j.neures.2004.12.013
- Herman, J. P., & Spencer, R. (1998). Regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene transcription and protein expression in vivo. *The Journal of Neuroscience*, *18*(18), 7462-7473.

- Igarashi, K. M., Ito, H. T., Moser, E. I., & Moser, M.-B. (2014). Functional diversity along the transverse axis of hippocampal area CA1. *FEBS Letters*, *588*(15), 2470-2476. doi: 10.1016/j.febslet.2014.06.004
- Ismaili, N., & Garabedian, M. J. (2004). Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1024*, 86-101. doi: 10.1196/annals.1321.007
- Jacobson, L., & Sapolsky, R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrine Reviews*, *12*(2), 118-134. doi: 10.1210/edrv-12-2-118
- Joëls, M. (2006). Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. *Trends in Pharmacological Sciences*, *27*(5), 244-250. doi: 10.1016/j.tips.2006.03.007
- Joseph-Bravo, P., & De Gortari, P. (2007). El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. *Biotecnología*, *14*, 65-76.
- Kadmiel, M., & Cidlowski, J. A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, *34*(9), 518-530. doi: 10.1016/j.tips.2013.07.003
- Keller, S. M., Schreiber, W. B., Stanfield, B. R., & Knox, D. (2015). Inhibiting corticosterone synthesis during fear memory formation exacerbates cued fear extinction memory deficits within the single prolonged stress model. *Behavioural Brain Research*, *287*, 182-186. doi: 10.1016/j.bbr.2015.03.043
- Kim, J. J., & Diamond, D. M. (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews Neuroscience*, *3*(6), 453-462. doi: 10.1038/nrn849
- Kino, T., Ichijo, T., Amin, N. D., Kesavapany, S., Wang, Y., Kim, N., . . . Chrousos, G. P. (2007). Cyclin-dependent kinase 5 differentially regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through phosphorylation: Clinical implications for the nervous system response to glucocorticoids and stress. *Molecular Endocrinology*, *21*(7), 1552-1568. doi: 10.1210/me.2006-0345
- Kjelstrup, K. G., Tuvnes, F. A., Steffenach, H. A., Murison, R., Moser, E. I., & Moser, M. B. (2002). Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(16), 10825-10830. doi: 10.1073/pnas.152112399
- Knox, D., Nault, T., Henderson, C., & Liberzon, I. (2012). Glucocorticoid receptors and extinction retention deficits in the single prolonged stress model. *Neuroscience*, *223*, 163-173. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.07.047
- Kolb, B., & Whishaw, I. Q. (2009). *Neuropsicología humana* (5ª ed.). España: Editorial Medica Panamericana.
- Koolman, J., & Röhm, K. (2004). *Bioquímica. Texto y Atlas* (3ra ed.). Argentina: Editorial Medica Panamericana.
- Korol, D. L., & Gold, P. E. (2007). Modulation of learning and memory by adrenal and ovarian hormones. En R. P. Kesner & J. L. Martinez (Eds.), *Neurobiology of learning and memory* (2nd ed., pp. 243-268). Burlington: Academic Press.
- Krstic, M. D., Rogatsky, I., Yamamoto, K. R., & Garabedian, M. J. (1997). Mitogen-activated and cyclin-dependent protein kinases selectively and differentially modulate transcriptional enhancement by the glucocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(7), 3947-3954. doi: 10.1128/MCB.17.7.3947

- Lechner, H. A., Squire, L. R., & Byrne, J. H. (1999). 100 years of consolidation - Remembering Muller and Pilzecker. *Learning & Memory*, 6(2), 77-87. doi: 10.1101/lm.6.2.77
- Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2007). Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science*, 315(5814), 961-966. doi: 10.1126/science.1135801
- Lu, N. Z., & Cidlowski, J. A. (2006). Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends in Cell Biology*, 16(6), 301-307. doi: 10.1016/j.tcb.2006.04.005
- Lupien, S. J., Maheu, F., Tu, M., Fiocco, A., & Schramek, T. E. (2007). The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain and Cognition*, 65(3), 209-237. doi: 10.1016/j.bandc.2007.02.007
- Manzoor, Z., & Koh, Y.-S. (2012). Mitogen-activated protein kinases in inflammation. *Journal of Bacteriology and Virology* 42(3), 189-195. doi: 10.4167/jbv.2012.42.3.189
- McCormick, C. M., McNamara, M., Mukhopadhyay, S., & Kelsey, J. E. (1997). Acute corticosterone replacement reinstates performance on spatial and nonspatial memory tasks 3 months after adrenalectomy despite degeneration in the dentate gyrus. *Behavioral Neuroscience*, 111(3), 518-531. doi: 10.1037/0735-7044.111.3.518
- McEwen, B. S. (2016). Stress-induced remodeling of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Research*, 1645, 50-54. doi: 10.1016/j.brainres.2015.12.043
- McEwen, B. S. (In Press). Stress-induced remodeling of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Research*. doi: 10.1016/j.brainres.2015.12.043
- McEwen, B. S., Sakai, R. R., & Spencer, R. L. (1993). Adrenal steroid effects on the brain: Versatile hormones with good and bad effects. En J. Schulkin (Ed.), *Hormonally induced changes to the mind and brain* (pp. 157-189). Oxford: Academic Press.
- McEwen, B. S., Weiss, J. M., & Schwartz, L. S. (1968). Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature*, 220(170), 911-912. doi: 10.1038/220911a0
- McGaugh, J. L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science*, 153(742), 1351-1358. doi: 10.1126/science.153.3742.1351
- McGaugh, J. L. (1973). *Learning and memory: An introduction*. San Francisco: Albion Publishing Company.
- Medina, A. C., Charles, J. R., Espinoza-González, V., Sánchez-Resendis, O., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B., & Quirarte, G. L. (2007). Glucocorticoid administration into the dorsal striatum facilitates memory consolidation of inhibitory avoidance training but not of the context or footshock components. *Learning & Memory*, 14(10), 673-677. doi: 10.1101/lm.654407
- Mendoza, G. M. (2002). Aprendizaje, atención. En L. A. Téllez (Ed.), *Aprendizaje y memoria: Aspectos psicobiológicos*. México: Trillas.
- Moser, E. I. (2011). The multi-laned hippocampus. *Nature Neuroscience*, 14(4), 407-408. doi: 10.1038/nn.2783
- Nader, N., Ng, S. S., Lambrou, G. I., Pervanidou, P., Wang, Y., Chrousos, G. P., & Kino, T. (2010). AMPK regulates metabolic actions of glucocorticoids by

- phosphorylating the glucocorticoid receptor through p38 MAPK. *Molecular Endocrinology*, 24(9), 1748-1764. doi: 10.1210/me.2010-0192
- National Research Council. (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals* (8th ed.). Washington DC: National Academy of Sciences.
- Nava, M. (2011). *Efecto del beta amiloide (25 -35) sobre la respuesta inhibitoria mediada por canales GIRK en la sinapsis fimbria-CA3 del hipocampo*. (Doctorado), Universidad de Salamanca, España.
- Necela, B. M., & Cidlowski, J. A. (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 1(3), 239-246. doi: 10.1513/pats.200402-005MS
- Odajima, J., Wills, Zachary P., Ndassa, Yasmine M., Terunuma, M., Kretschmannova, K., Deeb, Tarek Z., . . . Sicinski, P. (2011). Cyclin E constrains Cdk5 activity to regulate synaptic plasticity and memory formation. *Developmental Cell*, 21(4), 655-668. doi: 10.1016/j.devcel.2011.08.009
- Pavlov, I. P. (1927). *Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. London: Oxford University Press.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (6th ed.). Burlington, MA: Academic Press.
- Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 106(2), 274-285. doi: 10.1037/0735-7044.106.2.274
- Prado-Alcalá, R. A., Cobos-Zapalaín, G., Salado-Castillo, R., Quiroz Molina, C. R., Garín-Aguilar, M. E., Díaz, A., . . . Quirarte, G. (2006). El aprendizaje incrementado protege a la memoria contra tratamientos amnésicos. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, 32, 203-218. doi: 10.5514/rmac.v32.i2.23275
- Quiroz, C., Martínez, I., Quirarte, G. L., Morales, T., Díaz-Cintra, S., & Prado-Alcalá, R. A. (2003). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Experimental Brain Research*, 153(3), 400-402. doi: 10.1007/s00221-003-1704-1
- Roosendaal, B., & McGaugh, J. L. (2011). Memory modulation. *Behavioral Neuroscience*, 125(6), 797-824. doi: 10.1037/a0026187
- Roosendaal, B., Portillo-Marquez, G., & McGaugh, J. L. (1996). Basolateral amygdala lesions block glucocorticoid-induced modulation of memory for spatial learning. *Behavioral Neuroscience*, 110(5), 1074-1083. doi: 10.1037/0735-7044.110.5.1074
- Rosenzweig, M. R., & Leiman, A. I. (2003). *Psicología fisiológica*. Madrid, España: McGraw-Hill.
- Roth, E. D., Yu, X., Rao, G., & Knierim, J. J. (2012). Functional differences in the backward shifts of CA1 and CA3 place fields in novel and familiar environments. *Plos One*, 7(4), e36035. doi: 10.1371/journal.pone.0036035
- Sandi, C. (2004). Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(12), 917-930. doi: 10.1038/nrn1555
- Sandi, C., & Rose, S. P. (1997). Training-dependent biphasic effects of corticosterone in memory formation for a passive avoidance task in chicks. *Psychopharmacology*, 133(2), 152-160. doi: 10.1007/s002130050385

- Sandi, C., Venero, C., & Cordero, M. (2001). *Estres, memoria y trastornos asociados. Implicaciones en el daño cerebral y el envejecimiento*. España: Editorial Ariel.
- Sarabdjitsingh, R. A., Meijer, O. C., Schaaf, M. J. M., & de Kloet, E. R. (2009). Subregion-specific differences in translocation patterns of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in rat hippocampus. *Brain Research*, *1249*, 43-53. doi: 10.1016/j.brainres.2008.10.048
- Shah, K., & Lahiri, D. K. (2014). Cdk5 activity in the brain - multiple paths of regulation. *Journal of Cell Science*, *127*(Pt 11), 2391-2400. doi: 10.1242/jcs.147553
- Shen, C. P., Tsimberg, Y., Salvadore, C., & Meller, E. (2004). Activation of Erk and JNK MAPK pathways by acute swim stress in rat brain regions. *BMC Neuroscience*, *5*, 36. doi: 10.1186/1471-2202-5-36
- Sherwood, L. (2001). *Human physiology: From cells to systems*: Brooks/Cole.
- Skinner, B. F. (1994). *Sobre el conductismo*. Buenos Aires: Editorial Planeta Argentina, S.A.I.C.
- Squire, L. R. (1987). The organization and neural substrates of human memory. *International Journal of Neurology*, *21-22*, 218-222.
- Squire, L. R., & Zola, S. M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(24), 13515-13522. doi: 10.1073/pnas.93.24.13515
- Su, S. C., & Tsai, L. H. (2011). Cyclin-dependent kinases in brain development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *27*, 465-491. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154023
- Swanson, L. W., & Cowan, W. M. (1975). Hippocampo-hypothalamic connections: Origin in subicular cortex, not ammon's horn. *Science*, *189*(4199), 303-304. doi: 10.1126/science.49928
- Sweatt, J. D., & McKnight, E. (2010). *Mechanisms of memory*. San Diego: Academic Press.
- Téllez, A. (2005). La memoria. En L. A. Téllez (Ed.), *Aprendizaje y memoria: Aspectos psicobiológicos* (pp. 69-104). México: Trillas.
- Tronson, N. C., Corcoran, K. A., Jovasevic, V., & Radulovic, J. (2012). Fear conditioning and extinction: emotional states encoded by distinct signaling pathways. *Trends in Neurosciences*, *35*(3), 145-155. doi: 10.1016/j.tins.2011.10.003
- Vandevyver, S., Dejager, L., & Libert, C. (2012). On the trail of the glucocorticoid receptor: Into the nucleus and back. *Traffic*, *13*(3), 364-374. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01288.x
- Wang, Z., Frederick, J., & Garabedian, M. J. (2002). Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(29), 26573-26580. doi: 10.1074/jbc.M110530200
- Wiegert, O., Joëls, M., & Krugers, H. (2006). Timing is essential for rapid effects of corticosterone on synaptic potentiation in the mouse hippocampus. *Learning & Memory*, *13*(2), 110-113. doi: 10.1101/lm.87706
- Yamada, J., & Jinno, S. (2014). Age-related differences in oligodendrogenesis across the dorsal-ventral axis of the mouse hippocampus. *Hippocampus*, *24*(8), 1017-1029. doi: 10.1002/hipo.22287



Zhen, X., Du, W., Romano, A. G., Friedman, E., & Harvey, J. A. (2001). The p38 mitogen-activated protein kinase is involved in associative learning in rabbits. *The Journal of Neuroscience*, 21(15), 5513-5519.

## Lista de figuras

	Página
Figura 1. Modelo estándar de la consolidación de la memoria.	4
Figura 2. Clasificación de la memoria y las estructuras cerebrales implicadas.	6
Figura 3. Circuitos neuronales del hipocampo.	8
Figura 4. Eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal.	11
Figura 5. Efectos de los niveles circundantes de glucocorticoides en la memoria.	13
Figura 6. Localización del ARNm del GR en las áreas de CA1, CA3 y GD del hipocampo.	14
Figura 7. Dominios funcionales del Receptor a Glucocorticoides.	14
Figura 8. Mecanismos generales de acción del GR.	16
Figura 9. Localización subcelular de la Ser203 y Ser211 fosforiladas.	16
Figura 10. Caja de evitación inhibitoria.	20
Figura 11. Imágenes de la señal pGR-Ser211 y SYTOXGreen	23
Figura 12. Imagen de los núcleos pGR+	24
Figura 13. Diagrama general del protocolo experimental.	25
Figura 14. Latencias de entrada, escape y retención.	27
Figura 15. Extinción de la conducta.	29
Figura 16. NeuronaspGR+ en CA1.	31
Figura 17. NeuronaspGR+ en CA3.	32
Figura 18. NeuronaspGR+ en GD.	33

## Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Gruposexperimentales.	20