



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

TRANSLOCACIÓN DEL RECEPTOR A GLUCOCORTICOIDES EN LAS  
MITOCONDRIAS Y SU RELACIÓN FUNCIONAL CON LA CONSOLIDACIÓN  
DE LA MEMORIA

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:  
BIÓL. ROGELIO PEGUEROS MALDONADO

TUTORA PRINCIPAL

DRA. GINA LORENA QUIRARTE  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

CAMPUS UNAM JURQUILLA, QUERÉTARO, QRO. MÉXICO OCTUBRE, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **Agradecimientos**

Agradezco a mi tutora, Dra. Gina Lorena Quirarte y al Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y darme un lugar en su laboratorio.

A los integrantes de mi comité tutor, el Dr. Mauricio Díaz Muñoz y la Dra. Maricela Luna Muñoz, por sus contribuciones a este proyecto y por su siempre amable colaboración.

A Martha Carranza, Renata Ponce Lina y Héctor Valente, por enseñarme y contribuir en mis experimentos.

A la M.V.Z. Norma Serafín López, por su siempre amable apoyo técnico y su buena disposición.

A la Sra. Bertha Islas Rivas por su impecable trabajo en el cuidado de los sujetos experimentales.

Al personal del Bioterio, particularmente al M. V. Z José Martín García Servín y a la Dra. Gloria Alejandra Castillo León por facilitar los sujetos experimentales para el desarrollo de este trabajo.

A la M. en C. Leonor Casanova Rico, por su guía y excelente asesoría en todos los aspectos administrativos.

A la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos, encargada de la Unidad de Microscopía, por el constante apoyo y disponibilidad durante el proceso de análisis de imágenes del presente trabajo.

A la Dra. Deysi Gasca Martínez, por su amable atención en el uso de las instalaciones de la unidad de conducta.

A la Dra. Cristina Medina Fragoso por su amable apoyo en la disposición del material de laboratorio necesario.

A los Ings. Ramón Martínez Olvera, Omar González Hernández, Sandra Hernández García y al M. en C. Alberto Lara Rubalcava, responsables de la unidad de cómputo.

A la Lic. Ma. de Lourdes Lara Ayala por su valiosa ayuda en las videoconferencias.

A Francisco J. Valles y Soledad Medina encargados de la biblioteca.

Al Instituto de Neurobiología, por ser mi sitio de aprendizaje durante todos estos años.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por su calidad y la oportunidad que me ha brindado de mejorar en lo profesional y personal.

Al CONACyT por la beca otorgada en pos de mi desarrollo profesional y humano.

# Índice

I. Resumen	4
II. Abstract	5
1. Introducción	6
2. Antecedentes	7
2.1. El aprendizaje y la memoria	7
2.1.1. Aprendizaje	7
2.1.2. Memoria	7
2.1.2.1. Memoria de procedimiento	9
2.2. El estriado	9
2.2.1. Localización	9
2.2.2. Neuroquímica	10
2.2.3. Anatomía	11
2.2.4. Conectividad	12
2.2.5. Funciones	13
2.3. El estrés y la memoria	14
2.4. Mecanismo de liberación de los glucocorticoides	16
2.5. Receptor a glucocorticoides (GR)	18
2.5.1. Estructura	18
2.5.2. Activación	19
2.5.3. Funciones	19
2.6. Las mitocondrias	20
2.6.1. Morfología	20
2.6.2. Dinámica	21
2.6.3. Actividad mitocondrial	21
2.6.3.1. Apoptosis	21
2.6.3.2. Dinámica del Calcio	22
2.6.3.3. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)	23
2.6.3.4. Producción de ATP	24
2.6.4. Actividad mitocondrial y plasticidad neuronal	24
2.6.5. Modificaciones conductuales relacionadas con las funciones mitocondriales	25
2.6.6. Translocación del receptor a glucocorticoides en mitocondria	27
2.6.7. Influencia de los glucocorticoides en la actividad mitocondrial	29
3. Justificación	30
4. Objetivos	31
5. Hipótesis	31
6. Método	32
6.1. Sujetos	32
6.2. Manipulación	32
6.3. Aparato	32
6.4. Entrenamiento	33
6.5. Prueba de retención	34
6.6. Sacrificio y extracción de tejidos	34
6.7. Obtención de la fracción mitocondrial	34
6.8. Western Blot	35
6.9. MitoTracker	35

6.10. Análisis estadístico	36
6.10.1. Análisis	36
6.10.2. Análisis Western Blot y MitoTracker	36
6.11. Diseño experimental	37
6.11.1. Experimento 1	37
6.11.2. Experimento 2	37
6.11.3. Experimento 3	39
7. Resultados	41
7.1. Experimento 1	41
7.2. Experimento 2	42
7.3. Experimento 3	45
8. Discusión	53
9. Conclusiones	59
10. Perspectivas	59
11. Anexo-Figuras	61
12. Referencias	62

## I. Resumen

Los glucocorticoides facilitan la consolidación de la memoria (Medina et al., 2007; Quirarte et al., 2009), mediante la activación de los receptores a glucocorticoides (GR), los cuales actúan como un factor de transcripción para la expresión de proteínas *de novo* y la activación de vías de señalización (Kumar & Calhoun, 2008). Si bien se conocen los efectos de los GR en la plasticidad neuronal y en los procesos de consolidación, el espectro total de su función aún está lejos de ser comprendido. Se ha reportado que los GR tiene la capacidad de translocarse en las mitocondrias del cerebro (Moutsatsou et al., 2001), en las cuales actúa como un factor de transcripción y potencia su actividad (Du, McEwen, & Manji, 2009a), siendo la actividad mitocondrial un factor primordial para la plasticidad neuronal y la memoria, es importante estudiar la relación de la translocación del GR y la actividad mitocondrial en un contexto de aprendizaje. En este trabajo estudiamos la relación de la translocación de los receptores a glucocorticoides en las mitocondrias y el potencial de membrana mitocondrial con el proceso de consolidación de la memoria, en el estriado dorsal de ratas entrenadas en el laberinto acuático con clave, también se estudió un grupo de nado que se expuso al laberinto acuático sin las plataforma ni la pista y un grupo intacto que se mantuvo en su caja-habitación hasta el momento del sacrificio. Los resultados mostraron que la translocación de los receptores a glucocorticoides y el potencial de membrana mitocondrial del estriado presentan un pico alto en la temporalidad de 1.5 horas asociada al entrenamiento en la tarea del laberinto acuático con clave, esto sugiere que la translocación de los GR tiene una convergencia funcional con el potencial de membrana mitocondrial durante el proceso de consolidación de la memoria.

## II. Abstract

Glucocorticoids enhance memory consolidation (Medina et al., 2007; Quirarte et al., 2009), through the activation of the glucocorticoid receptors (GRs), which act as transcription factors that induce *de novo* protein expression and the activation of diverse signaling pathways (Kumar & Calhoun, 2008). The role of GR in neural plasticity and memory consolidation are well known, however the whole spectrum of its functions is far from understood. It has been shown that GR can translocate into the mitochondrion of the brain (Moutsatsou et al., 2001), in which act as a transcription factor and enhance its activity (Du, McEwen, & Manji, 2009a); giving the fact that mitochondrial activity is a primary factor for neural plasticity and memory, is important to study the relation between GR translocation and mitochondrial activity in a learning context. We studied the relation between the translocation of the glucocorticoid receptor into mitochondria and the mitochondrial membrane potential of the dorsal striatum of rats trained in the cued-water maze task, adding swim groups that were exposed to the water maze apparatus without the platform or the cue, and an intact group that stayed in its home box until the time of sacrifice. The results showed that both GR translocation into mitochondria and mitochondrial membrane potential have high peak at the 1.5 hours temporality related with the cued-water maze training, this suggests that the translocation of GR into mitochondria and the mitochondrial membrane potential have a functional convergence during memory consolidation.

## 1. Introducción

La memoria es el proceso de almacenaje de información posterior a un aprendizaje. Dentro de los distintos tipos de memoria se encuentra la memoria de procedimiento, que hace referencia al aprendizaje de habilidades (del “cómo realizar tareas”) (Arciniegas, Wortzel, & Frey, 2013). Un sustrato cerebral importante para la memoria de procedimiento es el estriado, estructura perteneciente a los ganglios basales, que también participa en la actividad motora.

Un aspecto que influye de manera importante a la formación de la memoria es el estrés, particularmente la liberación de glucocorticoides y la posterior activación del receptor a glucocorticoides (GR), que se ha reportado como un factor importante para la consolidación de la memoria. Se sabe que la activación de los GR en el estriado facilita la formación de la memoria (Medina et al., 2007; Quirarte et al., 2009).

Se ha establecido que durante la consolidación de la memoria se requiere de una gran cantidad de energía para que se lleven a cabo mecanismos de plasticidad neuronal. Dicha energía se obtiene en mayor medida por la actividad del mitocondrial (Li, Okamoto, Hayashi, & Sheng, 2004).

Evidencia reciente ha demostrado que la actividad de la mitocondria, un organelo ligado principalmente al metabolismo celular tiene una influencia en los procesos cognitivos y conductuales, al contribuir con la producción de energía que estaría implicada en los procesos moleculares que permiten los cambios plásticos necesarios para el almacenaje de información y la neurotransmisión. Esta actividad se ve afectada por la acción de hormonas, particularmente los glucocorticoides, ya que estos inducen cambios funcionales y de expresión de genes mitocondriales (Du et al., 2009a; Psarra & Sekeris, 2011).



## **2. Antecedentes**

### **2.1. El aprendizaje y la memoria**

#### **2.1.1. Aprendizaje**

El aprendizaje puede definirse como un cambio relativamente permanente en la conducta, derivado de la experiencia y que no es resultado de la maduración, fatiga o algún efecto producido por drogas (Hilgard & Bower, 1987).

Existen dos tipos fundamentales de aprendizaje. El aprendizaje *no asociativo* y el aprendizaje *asociativo*. El primero se considera la forma más básica del aprendizaje, y hace referencia a la dinámica de respuesta ante la presencia, ausencia o repetición de un estímulo. Ejemplos claros son la habituación, la sensibilización y la deshabituación.

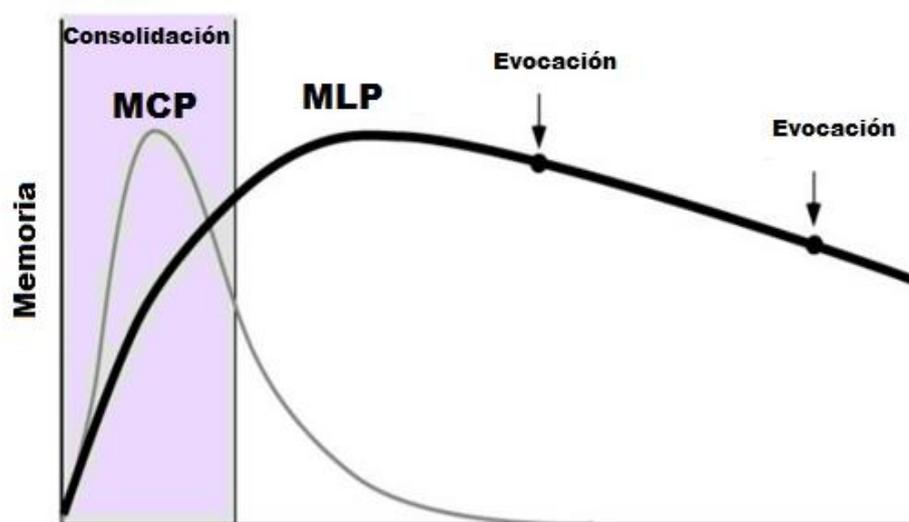
El aprendizaje asociativo a su vez representa un proceso de mayor complejidad. Es una forma de modificación conductual que implica la asociación con un suceso, cómo cuando la presentación repetida del estímulo conduce a la alteración de la velocidad y frecuencia de la respuesta. Los dos ejemplos más comunes son el condicionamiento clásico y el condicionamiento operante (Goshen-Gottstein, 2003).

#### **2.1.2. Memoria**

La memoria constituye un proceso de almacenamiento de la información, es decir, la persistencia del aprendizaje en un estado en el que puede ser recuperado un tiempo después (Squire, 1987).

El estudio de los procesos de memoria ha permitido establecer distintas clasificaciones, una de ellas se expresa en relación con el tiempo, dividiéndose en memoria de corto plazo (MCP) y memoria de largo plazo (MLP). La MCP nos permite almacenar una cantidad limitada de información durante un corto período de tiempo, se considera una memoria relativamente frágil y vulnerable a cualquier tipo de interferencia. Por el contrario, la MLP nos permite almacenar una gran cantidad de información durante un tiempo ilimitado, siendo una memoria más estable y duradera (Redolar-Ripoll, 2012). En este contexto, se ha descrito que los procesos de memoria pueden fraccionarse en fases (Figura 1). El paso inicial de estas fases se define como adquisición, momento en que se codifica el estímulo

percibido o la memoria de un evento, luego ocurre la consolidación, proceso por el cual una MCP pasa a ser una MLP, lo que permite que dicha información pueda recuperarse, fase que se conoce como evocación. Es preciso hacer hincapié en el proceso de consolidación, concepto que hace referencia a la estabilización progresiva de la memoria (Dudai, 2002), es decir, el período de transición desde un estado fisiológico inicial lábil hasta el establecimiento de una memoria duradera (Izquierdo et al., 1998), en el cual, se establecen los cambios plásticos necesarios (expresión de receptores, número de espinas dendríticas, conexiones sinápticas, etc.) así como el desencadenamiento de cascadas moleculares que permiten que dichos cambios se vuelvan duraderos (Squire & Alvarez, 1995).



**Figura 2.** Etapas de la memoria. Una memoria de corto plazo (MCP) se convierte en memoria de largo plazo (MLP) por un proceso de consolidación, para poder ser después evocada. Modificada de Dudai (2004)

El estudio de la memoria tanto en pacientes amnésicos (pacientes con un deterioro en la capacidad de almacenar información) como en modelos animales, ha demostrado que ésta no se trata de una sola entidad, sino que se compone de sistemas múltiples (Schacter & Tulving, 1994). Afirmación que implica una diferenciación basada en el tipo de información que se almacena, dividiéndose en memoria declarativa (explícita) y memoria no declarativa (implícita).

La memoria declarativa se refiere a la memoria de hechos o eventos, mientras que la memoria no declarativa se refiere a la generación de habilidades o asociaciones que pueden derivar en un aprendizaje (Squire & Knowlton, 1995).

### **2.1.2.1. Memoria de procedimiento**

Dentro de la clasificación de la memoria no declarativa se encuentra la memoria de procedimiento, que se refiere al aprendizaje, almacenamiento y evocación de secuencias motoras (“cómo” llevar a cabo tareas), conceptualmente se relaciona con la acción de realizar un movimiento intencional en respuesta a la demanda del ambiente (Arciniegas et al., 2013), además de ser una memoria relativamente duradera, al ser menos susceptible al decaimiento por el paso del tiempo (Cohen & Bacdayan, 1994).

Este tipo de memoria es dependiente de la práctica o la repetición, que mejora claramente la ejecución motora. Los estudios de las bases neurobiológicas de la memoria de procedimiento han demostrado que las ejecuciones repetidas de una respuesta motora producen una reorganización de la actividad entre las cortezas motoras y las áreas de planeación motora (Reber, 2013).

Estos cambios han inspirado un modelo de aprendizaje motor basado en dos componentes, el aprendizaje de habilidades motoras rápido (inmediato) y el lento (consolidado), en los cuáles hay diferentes contribuciones de los circuitos cortico-estriatal y cortico-cerebeloso (Doyon, 2008).

Una estructura que se ha asociado fuertemente con la consolidación de la memoria de procedimiento es el estriado (Barnes, Kubota, Hu, Jin, & Graybiel, 2005). Estructura perteneciente a los ganglios basales que forma parte de los circuitos involucrados en la planeación del movimiento, que se caracteriza por ser centro de integración para conexiones provenientes de la corteza cerebral (McGeorge & Faull, 1989).

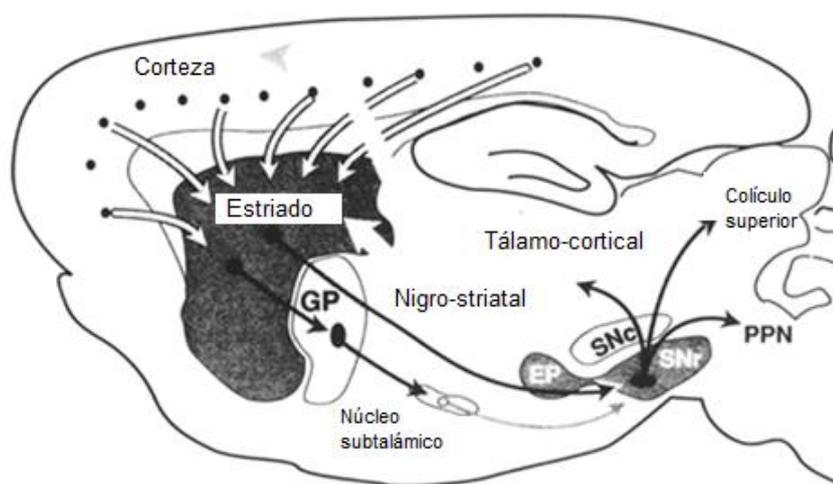
## **2.2. El estriado**

### **2.2.1. Localización**

El estriado (también conocido como caudado-putamen) (Paxinos & Watson, 2005), es una estructura cerebral que en conjunto con la sustancia nigra, el globo pálido, el área ventral

tegmental y el núcleo subtalámico conforman a los ganglios basales (Rye et al., 1996) (Figura 2).

Los ganglios basales son una región evolutivamente conservada en el prosencéfalo, que consiste en núcleos motores que forman circuitos recurrentes, críticos para las funciones de motivación y planeación motora (Kreitzer, 2009). El componente principal de los ganglios basales es el estriado, ya que recibe información de todas las cortezas mediante entradas glutamatérgicas (especialmente de la corteza motora primaria), integrando la información y proporcionando salidas GABAérgicas que terminan principalmente en el tálamo (Figura 2). Dos de las principales vías de salida del estriado se dirigen al globo pálido (GP) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr) (Gerfen, 1992).



**Figura 2.** Representación de la localización del estriado. El estriado recibe información proveniente de la corteza y manda conexiones que por una vía directa pasa a la sustancia nigra reticulata (SNr) y por una vía indirecta pasa por el globo pálido (GP) y el núcleo subtalámico para llegar al SNr que a su vez envía información al tálamo, al núcleo penduculopontino (PPN) y la eminencia pretalámica (EP). Modificada de Gerfen (1992).

### 2.2.2. Neuroquímica

Si bien el estriado parece estructuralmente uniforme, tiene una composición química bien diferenciada, hecho que ha sido corroborado mediante el uso de marcadores neuroquímicos. Ciertos marcadores han evidenciado secciones diferenciadas denominadas parches, mientras que otros marcadores expresan una matriz que se encuentra rodeando a los parches (Herkenham & Pert, 1981).

Los parches también denominados estriosomas, representan el ~10% del volumen estriatal, y se distinguen por una unión densa del receptor  $\mu$ -opioide, una actividad resaltable para marcadores de sustancia P y una actividad escasa para marcadores colinérgicos como acetilcolinesterasa (Bolam, Izzo, & Graybiel, 1988; Graybiel & Ragsdale, 1978; Herkenham & Pert, 1981).

Por su parte, la matriz es relativamente abundante en marcadores colinérgicos, particularmente, acetilcolinesterasa y colina acetiltransferasa (ChAT), así como la presencia de una alta inmunoreactividad para calbindina y somatostatina (Gerfen, 1984, 1985; Graybiel, Baughman, & Eckenstein, 1986; Graybiel & Ragsdale, 1978).

La organización en mosaico de los parches y la matriz permite a su vez una diferenciación en la conectividad del estriado, ya que si bien las neuronas tanto del parche como la matriz proyectan a la sustancia nigra, las neuronas de los parches proporcionan entradas a células dopaminérgicas, particularmente al nivel ventral de la pars compacta y las islas de células dopaminérgicas en la pars reticulata, mientras que las neuronas de la matriz proporcionan entradas a la ubicación de las neuronas GABAérgicas en la sustancia negra pars reticulata (Gerfen, 1992).

En cuanto a su neuromodulación se sabe que su actividad es controlada por los sistemas de neurotransmisión de dopamina y acetilcolina, provenientes de las entradas del área ventral-tegmental y los circuitos locales, respectivamente. Ambos sistemas de neurotransmisión se han asociado primariamente con la función normal de los ganglios basales, la actividad motora, los procesos emotivos y la memoria (Schultz, 2007; Zhou, Wilson, & Dani, 2002).

### **2.2.3. Anatomía**

En cuanto a su anatomía, las células estriatales pueden dividirse en dos tipos principales: las neuronas medianas espinosas (MSNs por sus siglas en inglés) y las interneuronas sin espinas (Kreitzer, 2009). Las MSNs representan la vasta mayoría de las células estriatales, son GABAérgicas y se pueden diferenciar en dos tipos: estriatonigrales (vía directa) y estriatopalidales (vía indirecta) (Smith, Bevan, Shink, & Bolam, 1998).

Por su parte las interneuronas sin espinas se distribuyen en una cantidad mucho menor y pueden clasificarse en interneuronas medianas GABAérgicas e interneuronas grandes colinérgicas (Kawaguchi, Wilson, Augood, & Emson, 1995).

Las interneuronas medianas GABAérgicas pueden diferenciarse histoquímicamente en 3 subtipos que son: (1) parvalbúmina-positivas, (2) somatostatina-positivas, Neuropeptido Y, sintetasa de óxido nítrico-positivas, y (3) calretinina-positivas.

En una categoría fisiológica, estos tipos de células también pueden clasificarse en cuanto a sus patrones de disparo de potenciales de acción. Las células parvalbumina-positivas presentan tasas de disparo rápido de manera sostenida, por lo que también pueden ser nombradas como interneuronas de disparo rápido, “fast spiking” (FS, por sus siglas en inglés). Mientras que las somatostatina-positivas y las calretinina-positivas, tienen tasas menores de disparo, por lo que son conocidas como interneuronas de umbral bajo (LTS) (Tepper & Bolam, 2004).

#### **2.2.4. Conectividad**

El estriado es un punto de convergencia para entradas glutamatérgicas de la corteza cerebral y el tálamo así como para aferencias dopaminérgicas del tallo cerebral (Bolam, Hanley, Booth, & Bevan, 2000).

Las MSNs del parche reciben entradas principalmente de las regiones frontal y límbica, mientras que las MSNs de la matriz reciben entradas de la corteza y el tálamo (Fujiyama, Unzai, Nakamura, Nomura, & Kaneko, 2006; Kincaid & Wilson, 1996)

Por su parte, las interneuronas también reciben aferencias glutamatérgicas de la corteza y el tálamo, sin embargo sus salidas son únicamente hacia las MSNs y otras interneuronas, lo que les permite formar microcircuitos que se encargan de modular las salidas estriatales (Tepper & Bolam, 2004).

El estriado puede también dividirse en regiones funcionalmente diferenciadas por las regiones que conecta: el estriado dorsal, que se divide en estriado dorsomedial que recibe las entradas de las cortezas asociativas, el estriado dorsolateral que recibe entradas de la corteza sensitivo-motora, y el estriado ventral que recibe entradas glutamatérgicas de la corteza frontal y las regiones límbicas (Brog, Salyapongse, Deutch, & Zahm, 1993; Nicola, 2007). Por su parte, las conexiones de salida del estriado pueden clasificarse en una vía directa y una vía indirecta en función de sus relevos. La vía directa, el estriado proyecta al globo pálido interno, el cual, envía proyecciones directas al tálamo. Por su parte, en la vía indirecta proyecta al globo pálido externo que manda conexiones al núcleo subtalámico, que se conecta a su vez con globo pálido interno, que finalmente se conecta con el tálamo (Soriano-Mas & Guillazo-Blanch, 2007).

### 2.2.5. Funciones

Debido a la capacidad del estriado para integrar y modular información proveniente de diferentes áreas de la corteza se le ha asociado con las funciones de planeación en actividad motora, así como el aprendizaje motor o memoria de procedimiento, así como aspectos motivacionales. También se la ha relacionado con los tipos de memoria que requieren la adquisición de una respuesta motora, o la capacidad de constituir asociaciones entre una respuesta instrumental y una recompensa (Balleine, Delgado, & Hikosaka, 2007). Su activación es vital para que se dé una mejora en la ejecución de una tarea después de la repetición de ensayos (Reber, 2013). Se ha reportado además, que esta estructura representa un sistema de memoria independiente, que se encarga de procesar el aprendizaje de hábitos estímulo-respuesta (E-R) (Packard & McGaugh, 1992; White, 1989). Esta afirmación ha sido corroborada mediante herramientas farmacológicas y de registro *in vivo* de la actividad neuronal. En los cuales, se ha reportado que la administración local de un antagonista al receptor NMDA inhibe el aprendizaje dirigido a un objetivo, mientras que lesiones excitotóxicas producen deterioro en el aprendizaje de hábitos (Hilario, Clouse, Yin, & Costa, 2007; Yin, Knowlton, & Balleine, 2004). Asimismo, se han observado cambios en los patrones de disparo neuronal en ratas, durante el aprendizaje relacionado a una tarea dirigida a un objetivo y en tareas de condicionamiento clásico (Day et al., 2006; Tan et al., 2007).

Se ha demostrado el papel del estriado en formas complejas de aprendizaje, así como en la memoria que requiere del uso flexible de la información. En experimentos en los que se ha comprometido esta estructura, se encontró un deterioro importante en las tareas de memoria que requieren el procesamiento de la información espacial (Yin & Knowlton, 2004). Mediante el uso de herramientas farmacológicas, se ha reportado deterioro en la ejecución de tareas como el laberinto acuático de Morris y el laberinto radial (Ploeger, Spruijt, & Cools, 1994; Roullet, Sargolini, Oliverio, & Mele, 2001).

Existe también evidencia de una diferenciación funcional de las propias regiones del estriado. Se ha propuesto que el estriado dorsal desempeña un papel importante en la consolidación de la memoria espacial (De Leonibus, Oliverio, & Mele, 2005). A su vez, se ha descrito que las lesiones en el estriado dorsolateral y dorsomedial deterioran la adquisición de memoria de tipo no asociativo, como memoria de procedimiento, y el aprendizaje dirigido a un objetivo (Yin et al., 2004; Yin, Knowlton, & Balleine, 2005).

Mientras que el estriado ventral participa en el procesamiento del aprendizaje asociativo de condicionamiento clásico (Day, Roitman, Wightman, & Carelli, 2007).

### **2.3. El estrés y la memoria**

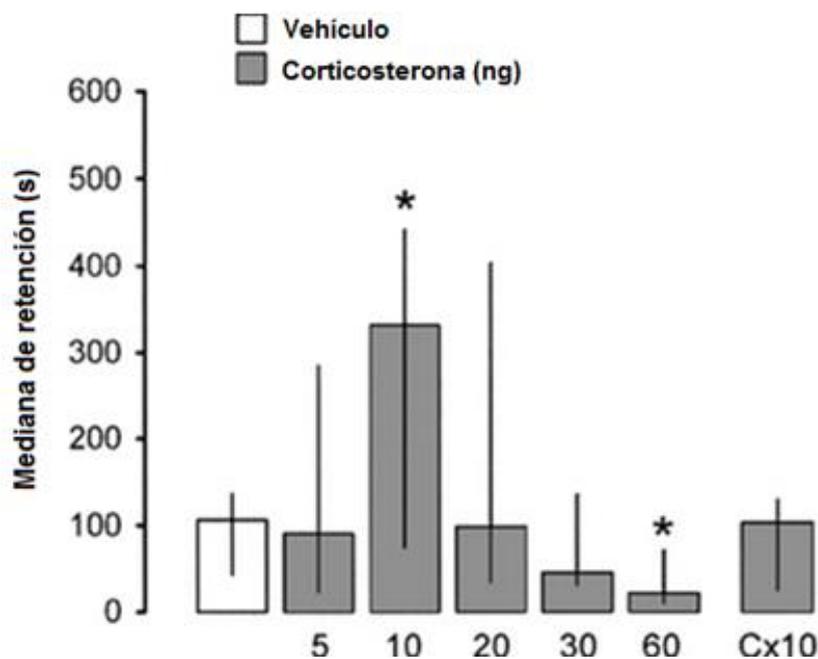
Un aspecto de gran influencia en la consolidación de la memoria es el estrés. El estrés se define como un estado en el cuál un estímulo produce una alteración en la homeostasis corporal, lo que conlleva una cascada de eventos fisiológicos que influyen en procesos cognitivos, como el aprendizaje y la memoria (Chrousos & Gold, 1992). Existen evidencias experimentales que indican que las experiencias emocionales suelen recordarse con una viveza e intensidad particular y que pueden mantenerse en la memoria por largos periodos (McGaugh & Roozendaal, 2002). McGaugh (1983) propuso que los procesos endógenos activados por la experiencia pueden servir para regular la consolidación de las mismas, influenciado por hormonas liberadas desde la corteza adrenal (catecolaminas y glucocorticoides) (Roozendaal & McGaugh, 2011; Sandi, 2003).

Los efectos moduladores del estrés han sido descritos en distintas regiones del cerebro como el hipocampo y la amígdala, en los que la administración de corticosterona o agonistas al receptor a glucocorticoides (GR) como RU 28362 facilitan la consolidación de la memoria en la tareas con un fuerte componente contextual (Roozendaal & McGaugh, 1997).

Una prueba de ello es el trabajo de Jefferys, Copolov, Irby y Funder (1983) quienes describieron un papel primordial de los glucocorticoides en la tarea de nado forzado al remover las glándulas adrenales. Los resultados, mostraron un deterioro en la conducta de inmovilidad en las ratas sin la corteza adrenal. De manera interesante, esta conducta se recuperaba con la administración de agonistas a glucocorticoides como la dexametasona o la misma corticosterona.

Otra estructura relacionada con en este proceso es el estriado, al ser una de las estructuras diana de los glucocorticoides durante la modulación de la memoria. Medina et al. (2007) reportaron que la administración de corticosterona (10 ng) directamente en el estriado dorsal inmediatamente después del aprendizaje, provocaba un efecto facilitador en la consolidación de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria (Figura 3), demostrando además la importancia del GR en la consolidación de la memoria, ya que al administrar el antagonista (RU 486) no se observó una facilitación en la consolidación de la tarea.

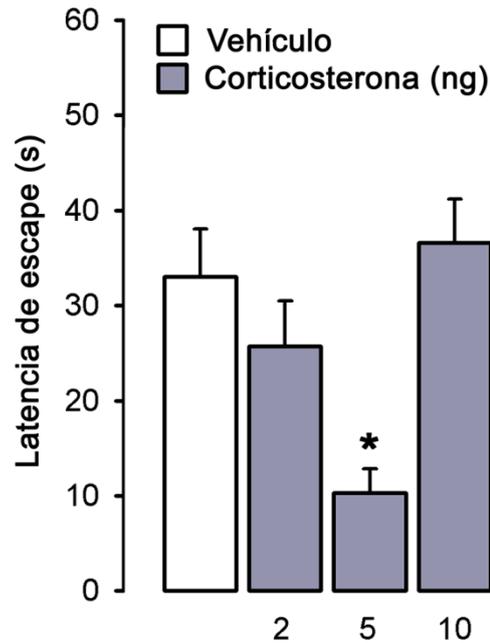




**Figura 3.** Medianas de retención de ratas entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria de los grupos a lo que se les administró corticosterona (5, 10, 20, 30, 60 ng) directamente en el estriado dorsal inmediatamente después del entrenamiento. Las ratas a las que se les administró la dosis de 10 ng mostraron una facilitación en la consolidación de la tarea, presentaron latencias de retención altas en comparación con el grupo vehículo. Cx10 es un grupo control al que se le administró corticosterona (10ng) en la corteza parietal. Modificada de Medina et al. (2007).

La influencia del estrés en la consolidación de la memoria también se ha observado en paradigmas conductuales en los que se estudia la memoria de procedimiento. Quirarte et al. (2009) reportaron que la administración de corticosterona (5 ng) en el estriado dorsal inmediatamente después del entrenamiento en el laberinto acuático de Morris en su versión de procedimiento (laberinto acuático con clave), resultaba en una facilitación en la consolidación de la memoria de esta tarea (Figura 4).

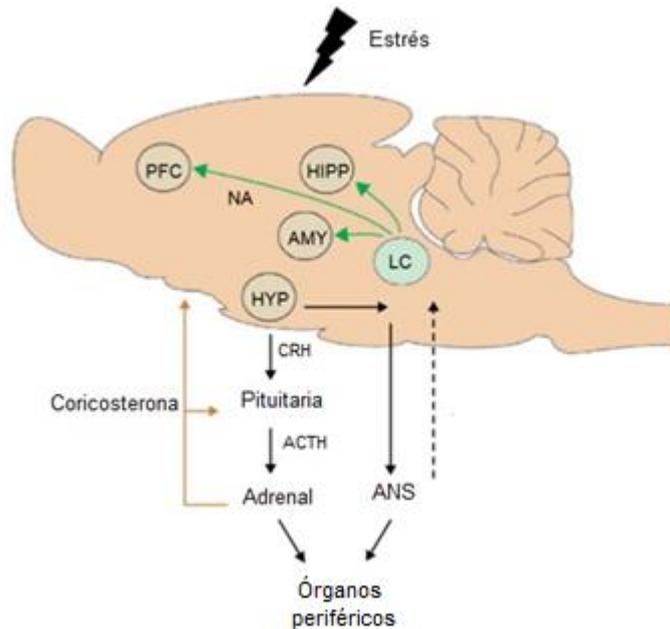
Posteriormente, Lozano, Serafín, Prado-Alcalá, Roozendaal y Quirarte (2013) utilizaron la tarea de laberinto de Morris en su versión espacial y el laberinto acuático con clave (de procedimiento) para estudiar el efecto de diferentes concentraciones de corticosterona (5, 10, 20 ng/kg) administrada en el estriado dorsomedial inmediatamente después del entrenamiento. Reportaron un efecto de facilitación en la consolidación de esta tarea, confirmando así la importancia de esta estructura para la consolidación de la memoria de procedimiento.



**Figura 4.** Promedio de las latencias de escape de ratas entrenadas en el laberinto acuático con clave, a las que se les administró corticosterona (2, 5 y 10 ng) en el estriado dorsal inmediatamente después del entrenamiento. Los animales a los que se les administró la dosis de 5 ng mostraron una facilitación en la consolidación de la memoria de esta tarea al mostrar latencias de escape menores al grupo vehículo. Modificada de Quirarte et al. (2009).

#### 2.4. Mecanismo de liberación de los glucocorticoides

La exposición ante un evento estresante activa un circuito neuroendocrino altamente conservado en los animales, el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) (de Kloet, Joels, & Holsboer, 2005) (Figura 5). El hipotálamo, específicamente el núcleo paraventricular, cuyas neuronas constituyen un centro de integración de influencias procedentes de diversos sistemas de neurotransmisión provenientes de diversas áreas cerebrales como la corteza prefrontal y el hipocampo, se encarga de producir la hormona liberadora de corticotropina (CRH) cuya función es estimular la región de la pituitaria anterior (Sandi, 2003). Ante esta influencia, la pituitaria anterior libera la hormona adrenocorticotropina (ACTH), que es transportada en la circulación hacia la corteza de las glándulas adrenales. En la zona fascicular se sintetizan y liberan los glucocorticoides a la sangre, donde participan en la respuesta al estrés y en la conservación de la homeostasis, mediante respuestas internas como la regulación de niveles de glucosa, presión sanguínea, respuesta inmunológica, y la inducción de un gran cantidad de respuestas moduladoras en el cerebro (Olson, Marc, Grude, McManus, & Kellermann, 2011; Sandi, 2003).



**Figura 5.** Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal de ratona. El sistema comienza con la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) del hipotálamo, que dará lugar a la liberación de corticotropina (ACTH) en la pituitaria, asimismo ACTH provocará la liberación de glucocorticoides en la corteza de la glándula adrenal. Por sus siglas en inglés: PFC (corteza prefrontal), HIPP (hipocampo), AMY (amígdala), HYP (hipotálamo), LC (locus coeruleus), ANS (sistema nervioso autónomo). Modificada de Joëls, Pu, Wiegert, Oitzl y Krugers (2006).

Los glucocorticoides (cortisol en humanos, corticosterona en ratas) tienen propiedades que les permiten ser una influencia central en la consolidación de las experiencias estresantes, una de ellas es su naturaleza altamente lipofílica, que les permite difundirse a todo el cerebro al atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica (Kroll et al., 2009).

Una vez en el cerebro se unen a receptores específicos. Los glucocorticoides se unen particularmente a dos tipos de receptores: los receptores mineralocorticoides (MRs) y los receptores a glucocorticoides (GRs) (de Kloet, 1991).

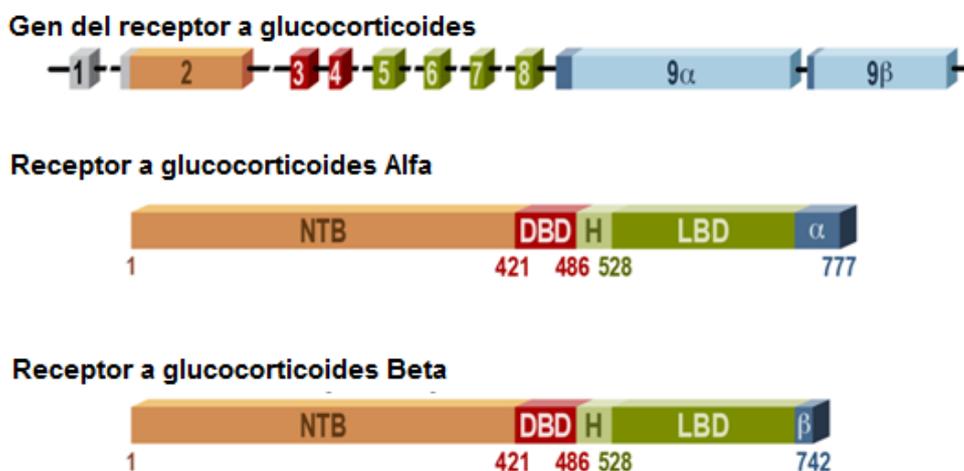
Los MR y los GR difieren principalmente en su afinidad y distribución. La afinidad de la corticosterona a los MR es aproximadamente 10 veces más alta que los GR. Esta diferencia causa que los MR se encuentren ocupados o saturados (entre 70 y 80%) por los glucocorticoides liberados bajo condiciones basales, mientras que la ocupación de los GR no suele pasar del 10%. Sin embargo, en presencia de un estresor y al elevarse la concentración de glucocorticoides, la activación del GR aumenta considerablemente y ha mostrado ser clave para la respuesta ante eventos estresantes (Sandi, 2003).

## 2.5. Receptor a glucocorticoides (GR)

### 2.5.1. Estructura

El GR es una fosfoproteína que forma parte de la familia de los NRHs (receptores nucleares hormonales, por sus siglas en inglés) de la cual dependen la mayoría de los efectos biológicos de los glucocorticoides (Popoli, Yan, McEwen, & Sanacora, 2012). El GR consta de un arreglo estructural de dominio común en los NRHs, el cual consiste en la división de la secuencia primaria en un dominio N-terminal (NTD), un dominio central de dedos de zinc de unión a DNA (DBD) y un dominio C-terminal de unión a ligando (LBD), que contiene un subdominio de función de activación (AF2) que se encarga de regular la transcripción (Bledsoe et al., 2002) (Figura 6).

La unión de un ligando al dominio LBD promueve un cambio conformacional del subdominio AF2 (regularmente en la hélice 12) que resulta en la exposición de la superficie de la proteína para interactuar con otras proteínas de correulación (Heck et al., 1994).



**Figura 6.** Representación de la estructura del receptor a glucocorticoides (GR) en sus isoformas alfa y beta. Su estructura se divide en los dominios N-terminal (NTB), unión al DNA (DBD) y unión a ligando (LBD), además de una región de bisagra (H). Se muestra además el gen que codifica para el GR. Modificada de Gruver-Yates y Cidlowski (2013).

### 2.5.2. Activación

El GR se encuentra en su forma inactiva en el citoplasma, unido a un complejo heteromérico formado por una variedad de proteínas como HSP90, HSP70, FKBP, entre

otras (Davies, Ning, & Sanchez, 2002). La unión de la hormona provoca un cambio conformacional del GR, que tendrá como resultado un desensamble del complejo.

El receptor entonces puede participar en diferentes zonas celulares al entrar en comunicación con diversas cascadas de señalización; siendo una de sus características más importantes su capacidad para translocarse en el núcleo, dónde interactúa con puntos críticos de regulación de la transcripción conocidos como elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) (Kumar & Calhoun, 2008).

### **2.5.3. Funciones**

El GR se expresa prácticamente en todas las regiones del cerebro, mostrando a su vez una clara diferenciación en cuanto a su concentración. Así se mostró en el trabajo realizado por Morimoto, Morita, Ozawa, Yokoyama, y Kawata (1996), por medio de hibridación *in situ*, la presencia del receptor del GR en casi todas las estructuras cerebrales. Regiones como CA1, CA2 y el giro dentado del hipocampo, el núcleo paraventricular del hipotálamo y el núcleo central de la amígdala, destacan por una presencia elevada del receptor. Por su parte, el estriado mostró una densidad moderada pero constante en sus distintas subregiones.

Se ha reportado que el GR regula una amplia variedad de procesos celulares, mediante efectos no genómicos, al activar cascadas de señalización o modificando la acción de otros neuromoduladores como el glutamato (Popoli et al., 2012) y por medio de efectos genómicos, al unirse directamente al DNA o con interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción (Heck et al., 1994; Yamamoto, 1985).

Como ya se ha mencionado, la actividad de los glucocorticoides tiene efectos en todo el cuerpo. Una de las funciones más estudiadas del GR, es su aportación en la respuesta de inflamación, teniendo un efecto antiinflamatorio que se basa en la inhibición de la transcripción de numerosos genes que codifican proteínas proinflamatorias, entre las que se incluyen numerosas citosinas como las interleucinas (IL), y el factor de necrosis tumoral, entre otros (Adcock, 2000). También se ha reportado que participa en la apoptosis, ya que puede activar la muerte celular a través de la inducción de los miembros de la familia Bcl-2, tales como Bim, Bid y Bad (Lu, Collins, Grissom, & Cidlowski, 2007), así como también la represión de los miembros anti-apoptóticos, tales como Bcl-2, MCL-1 y Bcl-xL (Chauhan, Leach, Kunz, Bloom, & Miesfeld, 2003).

Otra función particularmente relevante es su participación en la dinámica celular durante la consolidación de la memoria, ya que además de funcionar como un factor de transcripción se encarga de reclutar otras maquinarias transcripcionales como co-activadores y co-represores para modular positiva o negativamente la transcripción de genes de gran relevancia para este proceso, como la proteína cinasa serina/treonina *sgk1*, el receptor adrenérgico  $\beta 2$  y el receptor neuronal de serotonina (5-HT<sub>1A</sub>) (Cornett, Hiller, Jacobi, Cao, & McGraw, 1998; Itani, Liu, Cornish, Campbell, & Thomas, 2002; Nakabayashi et al., 2001; Rogatsky et al., 2003).

## **2.6. Las mitocondrias**

Un componente esencial de la célula son las mitocondrias, al ser la fuente de energía para la mayoría de las funciones celulares y un centro de señalización metabólica. En cada célula existe una gran cantidad de mitocondrias (de 100 a 10000) (Taanman, 1999).

### **2.6.1. Morfología**

Las mitocondrias se encuentran en el citoplasma celular y se caracterizan por tener un sistema de doble membrana, compuesto de una membrana externa y una interna, que separan tres espacios bien definidos: el citosol, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. Además, una de sus características principales es que cuentan con varias repeticiones de su propio genoma, que es circular y contiene una cadena pesada y una ligera, en éstas se produce una expresión abundante de genes que codifican para 13 proteínas (Robin & Wong, 1988), la mayoría asociadas a la fosforilación oxidativa, proceso fundamental para la síntesis de ATP (Taanman, 1999).

Las funciones de la mitocondria suelen asociarse mayormente a los procesos de respiración celular, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), apoptosis, almacén de  $\text{Ca}^{2+}$  asociado a la actividad neuronal y plasticidad neuronal.

### **2.6.2. Dinámica**

Las mitocondrias pueden localizarse en cualquier parte de la célula ya que no se encuentran estáticas, por lo que pueden transportarse hacia las zonas celulares que

requieran potenciar su actividad metabólica. Además, las mitocondrias pueden fusionarse con otras mitocondrias para formar redes reticulares (Karbowski & Youle, 2003). De esta manera, constituyen un sistema dinámico en continua adaptación a las necesidades celulares. Sin embargo, estas no pueden ser generadas de nuevo, sino que proliferan por el crecimiento y la división de los organelos preexistentes. Esto se logra mediante los cambios en la forma y posición, que se dan a través de los procesos de fisión y fusión (Liesa, Palacín, & Zorzano, 2009).

El proceso de fusión permite el intercambio en el contenido de ambas mitocondrias. De este modo, si una mitocondria ha sufrido mutaciones en su material genético o ha acumulado demasiados radicales libres de oxígeno (uno de los principales causantes del envejecimiento celular), estas características negativas se aminoran. Otra función de la fusión es la disipación del incremento del potencial de membrana mitocondrial durante la producción de ATP, permitiendo a la mitocondria volver a estados basales (Suen, Norris, & Youle, 2008). Por su parte la fisión, es el proceso por el cual se dividen las mitocondrias, creando copias de sí mismas que incluso pueden tener tamaños y características diferentes, lo que facilita en gran medida su transporte. La separación permite a la célula distribuir y reorganizar su compleja red de mitocondrias para adaptarla a las necesidades celulares que varían constantemente (Knott, Perkins, Schwarzenbacher, & Bossy-Wetzler, 2008).

### **2.6.3. Actividad mitocondrial**

#### **2.6.3.1. Apoptosis**

La apoptosis es un mecanismo regulador esencial que interviene en la homeostasis tisular y en el desarrollo normal, al eliminar las células innecesarias. La mayoría de estímulos que conducen a la apoptosis convergen en la mitocondria y provocan una permeabilización de su membrana externa. Con la permeabilización se liberan una serie de proteínas que activan enzimas efectoras denominadas caspasas (Hengartner, 2000). Se ha propuesto que la regulación de la apoptosis por parte de la mitocondria se puede dar por dos vías. Una vía extrínseca hace referencia a la comunicación de las mitocondrias con el medio citoplasmático, en el cuál, la unión de ligandos a receptores como TNF-R1 y DR3 desencadena la activación de las caspasas y una cascada de reacciones que finalizan con la muerte celular. La otra vía, es la vía intrínseca en la cual un proceso latente de

transporte de la mitocondria conocido como permeabilidad transicional mitocondrial se traduce en la permeabilización de la membrana mitocondrial a iones que incluyen el calcio. Se ha propuesto que esta permeabilidad mitocondrial aumentada permite la salida del citocromo C de la mitocondria para que éste actúe como un agente pro-apoptótico (Verhagen et al., 2000).

### **2.6.3.2. Dinámica del calcio**

Existe amplia evidencia de la capacidad de las mitocondrias para captar iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) del medio citoplasmático. El mecanismo que permite el paso de estos cationes por la membrana mitocondrial externa ocurre a través de los canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC, por sus siglas en inglés) (Simamura, Shimada, Hatta, & Hirai, 2008). VDAC es un canal de gran conductancia activado por voltaje, con alta probabilidad de apertura y poco selectivo por aniones en bajos potenciales transmembrana, pero que cambian su selectividad por cationes cuando aumentan los potenciales transmembrana (Colombini). En cuanto al tráfico de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana mitocondrial interna, se puede dar por dos procesos, uno electroforético, por uniporte, que transporta  $\text{Ca}^{2+}$  por el gradiente eléctrico establecido por la cadena respiratoria y uno de intercambio sodio-calcio ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ) que ocurre principalmente en células musculares y neuronales (Rizzuto, Bernardi, & Pozzan, 2000). Otra función importante del  $\text{Ca}^{2+}$  en las mitocondrias es la modulación del ciclo de ácidos tricarboxílicos. Cambios en sus concentraciones producen la activación de las enzimas piruvato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  y oxoglutarato deshidrogenasa, esenciales para el ciclo y que conllevan a la producción de ATP, este proceso activado por calcio representa una de las respuestas de las mitocondrias ante situaciones de demanda metabólica (McCormack, Halestrap, & Denton, 1990).

Las funciones y los mecanismos de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria siguen siendo un tema de debate, sin embargo, se ha asociado su entrada con el mantenimiento de los niveles basales del catión en el citoplasma, y en el caso de las células neuronales se ha demostrado que la entrada de calcio en las mitocondrias de las sinapsis influye en el restablecimiento del potencial de membrana una vez ocurrido un potencial de acción (Billups & Forsythe, 2002).



### **2.6.3.3. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

El término especies reactivas de oxígeno (ROS por si siglas en inglés) es usado para describir una variedad de moléculas, algunas son radicales libres (especies químicas con un electrón desapareado), derivadas de oxígeno molecular (Turrens, 1997).

Las ROS regulan una gran variedad de procesos celulares, como la secreción y acción de la insulina, la producción de hormona de crecimiento, la activación de citocinas (participan en la comunicación entre células), la unión de las proteínas G a sus receptores, la regulación de la transcripción, la regulación de los transportadores inter e intracelulares, además de que influyen en la acción de canales iónicos (Bartosz, 2009). Debe mencionarse que el desequilibrio en la cantidad de ROS causa un efecto llamado estrés oxidativo, que resulta nocivo para los organismos, dañando los constituyentes celulares e incluso favoreciendo la muerte celular.

La mitocondria es el principal productor de especies reactivas de oxígeno (ion superóxido) durante los procesos normales oxidativos del metabolismo, principalmente a través de las reacciones de óxido-reducción que ocurren en los complejos de transferencia de electrones y que tienen al oxígeno como el último aceptor de electrones (Macedo-Marquez, 2012).

### **2.6.3.4. Producción de ATP**

En las mitocondrias se desarrollan distintas reacciones bioquímicas catabólicas que liberan importantes cantidades de energía, la cual se almacena en moléculas ATP (adenosin-trifosfato); en los organismos aeróbicos más del 90% del ATP proviene de la acción de las mitocondrias (Rodríguez, 2006). El ATP es una molécula relativamente simple, formada por una ribosa, una adenina y tres fosfatos. Su producción proviene principalmente de la oxidación de la glucosa, la cual se produce en dos etapas. La primera se conoce como glicólisis la cual ocurre en el citoplasma y se refiere a la oxidación de la glucosa para formar ácido pirúvico y una pequeña cantidad de ATP (Nelson & Cox, 2004). La segunda fase, tiene lugar en la mitocondria y se divide en dos partes, el ciclo de Krebs y el transporte de electrones o fosforilación oxidativa.

La fosforilación oxidativa es la culminación del metabolismo productor de energía en los organismos aeróbicos. Todos los pasos oxidativos en la degradación de glúcidos, grasas y

aminoácidos convergen en esta etapa de la respiración celular en la que la energía de oxidación impulsa la síntesis de ATP (Arboleda & Sánchez, 2008).

El sistema dedicado al transporte de los electrones está compuesto por 4 complejos enzimáticos fijos y dos transportadores de electrones móviles: el complejo I o NADH deshidrogenasa que contiene flavina mononucleótido (FMN), el complejo II o succinato deshidrogenasa, el complejo III o citocromo bc1 y el complejo IV o citocromo c oxidasa.

La oxidación del piruvato en el ciclo de Krebs genera NADH y FADH<sub>2</sub>. De estas coenzimas reducidas se transfieren los electrones al oxígeno a través de los cuatro complejos transportadores de electrones y al mismo tiempo se transportan iones de hidrógeno desde la matriz al espacio intermembranal, con la cual se genera un potencial electro-químico conocido como fuerza protón-motriz. Finalmente, el complejo F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> dirige la fuerza protón motriz para culminar con la acción de la ATP-sintasa, un complejo enzimático que se encarga de la síntesis de ATP (Lodish, 2006).

#### **2.6.4. Actividad mitocondrial y plasticidad neuronal**

Existe numerosa evidencia de que las mitocondrias tienen funciones primordiales en la plasticidad neuronal (Li et al., 2004) ya que, además de cumplir funciones energéticas en el soma, también se encuentran en terminales presinápticas y en menor medida en espinas dendríticas (Rowland, Irby, & Spirou, 2000).

Las mitocondrias juegan un papel activo en la regulación del crecimiento de axones y dendritas, en el proceso de sinaptogénesis y en las respuestas morfológicas y funcionales derivadas por actividad sináptica (Bindokas, Lee, Colmers, & Miller, 1998). La función de las mitocondrias en la plasticidad neuronal tiene diversos mecanismos dependientes de la zona de la neurona en la que se encuentre (Cheng, Hou, & Mattson, 2010). En las terminales presinápticas se encarga de proporcionar la energía para el mantenimiento y la restauración del potencial de membrana, mediante funciones como el secuestro de calcio, actividad que se ha reportado como factor para que se establezca un potencial a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés). La LTP es un cambio funcional en la conectividad neuronal ocasionado por el aumento de la fuerza sináptica, lo que permite una comunicación constante y más robusta entre ciertos circuitos y es, una de las características más palpables de los procesos de aprendizaje y memoria (Calabresi et al., 2001). Las mitocondrias también son capaces de modular el empaquetamiento y liberación de neurotransmisores, lo cual contribuye al aumento en la fuerza sináptica.

Las mitocondrias se encuentran también en las superficies de contacto de las neuronas postsinápticas, tanto en el cuerpo de las dendritas y en menor medida en las espinas dendríticas y pueden activar o regular respuestas estructurales y funcionales en estos compartimentos (Popov, Medvedev, Davies, & Stewart, 2005), así como proporcionar energía para el surgimiento de nuevos contactos sinápticos. En cuanto a las mitocondrias del soma, éstas se encargan de proporcionar la energía necesaria para numerosos procesos bioquímicos, y también sirven como plataformas que participan en la transferencia de información dentro de la neurona (Cheng et al., 2010). Por último, las mitocondrias de los axones son esenciales para el transporte intracelular, ya que proporcionan la energía para el transporte anterógrado y retrogrado de diversas proteínas y organelos de la terminal del axón hacia el soma y viceversa (Miller & Sheetz, 2004).

En este contexto, Li et al. (2004) reportaron que al agregar creatina (un ácido orgánico nitrogenado que activa la respiración mitocondrial), a cultivos de células hipocámpales, se aumentaba cuantiosamente la energización de las mitocondrias de estas neuronas y esto influía en la densidad de espinas dendríticas, encontrando que los cultivos con creatina tenían una mayor densidad de espinas que los cultivos control.

Otro trabajo particularmente relevante en este aspecto es el realizado por Hara et al. (2014), quienes mediante reconstrucción en 3D de microscopía electrónica caracterizaron morfológicamente las mitocondrias presentes en la corteza prefrontal (estructura asociada al proceso de información de la memoria de trabajo) de monos hembra tanto jóvenes como adultas, encontrando en las adultas una mayor cantidad de mitocondrias en forma de dona, un tipo de mitocondria que se asocia a la degradación por estrés y la edad al ser funcionalmente deficiente. Lo anterior correlaciona con una ejecución deficiente en la memoria de trabajo y la presencia de un deterioro sináptico en monas viejas. Interesantemente, el deterioro cognitivo podía recuperarse con la administración de hormonas, específicamente, los estrógenos, ya que al administrar estas hormonas a las monas se les mejoraba la ejecución en la tarea de memoria de trabajo y aumentaba el número de vesículas ancladas a la membrana de su sinapsis.

### **2.6.5. Modificaciones conductuales relacionadas con las funciones mitocondriales**

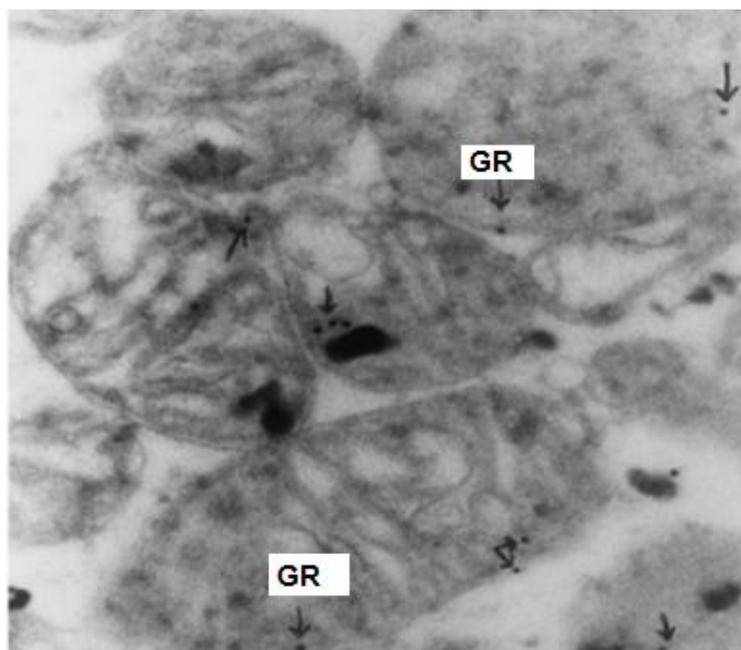
La actividad mitocondrial se ha asociado también a la consolidación de la memoria. Usando la tarea del laberinto acuático de Morris, se ha reportado que la manipulación del

genoma mitocondrial, al generar copias cuya expresión sea ineficiente, deteriora la memoria (Roubertoux et al., 2003). Además, se ha reportado que la aplicación de sustancias que alteren la actividad mitocondrial influye en el proceso de la consolidación de la memoria en la tarea de laberinto acuático. La administración de L-carnitina (favorece  $\beta$  oxidación) y el  $\alpha$  ácido lipoico (cofactor de la piruvato deshidrogenasa), factores que contribuyen a las funciones mitocondriales, provocó una facilitación en la consolidación de la memoria (Liu et al., 2002). Por su parte la administración de azida sódica, un bloqueador selectivo del complejo III de la cadena de fosforilación oxidativa, causó un deterioro en la consolidación de la memoria (Bennett & Rose, 1992).

Otra línea importante de investigación en la modulación de la conducta por medio de la actividad mitocondrial es la que se asocia a la influencia del estrés. Hollis et al. (2015) estudiaron ratas machos que mostraban baja ansiedad y alta ansiedad en la prueba de laberinto de cruz elevado. Las ratas de ambos grupos fueron sometidas a una prueba de jerarquías de dominancia, al ser puestas con otras ratas macho en la lucha por un territorio. Se encontró que las ratas de alta ansiedad disminuían considerablemente la conducta agresiva, y por lo tanto eran subordinadas. Esta diferencia conductual tiene un correlato interesante con la actividad mitocondrial, ya que los animales de alta ansiedad mostraron un deterioro en la cantidad de ATP producido, en el consumo de niveles de oxígeno y en la expresión de proteínas de la fosforilación oxidativa en las neuronas del núcleo accumbens (también llamado estriado ventral (Voorn, Vanderschuren, Groenewegen, Robbins, & Pennartz, 2004), comprobando la participación de esta estructura en el procesamiento de este tipo de información y la influencia que tiene la actividad mitocondrial en la modificación de la conducta. Siguiendo esta línea de ideas, se ha propuesto incluso un modelo de depresión, en el cual se sugiere que cierto porcentaje de la población humana puede llegar a mostrar una actividad mitocondrial subóptima, que vuelve al tejido nervioso susceptible a los efectos del estrés crónico, particularmente a la acción de los glucocorticoides. En este caso, la célula no es capaz de responder energéticamente a las exigencias de la situación de estrés, lo que conlleva a una plasticidad neuronal ineficiente e incluso patológica, característica de la depresión. Sin embargo, la influencia de los glucocorticoides es también un factor positivo; este modelo propone que, en animales con funciones mitocondriales óptimas, los glucocorticoides son un factor necesario para responder ante las demandas que representa una situación de estrés, al elevar las funciones mitocondriales y así favorecer cambios plásticos (Morava & Kozicz, 2013; Picard, Juster, & McEwen, 2014).

### 2.6.6. Translocación del receptor a glucocorticoides en mitocondria

Moutsatsou et al. (2001) reportaron la presencia del receptor a glucocorticoides en las mitocondrias del hipocampo y corteza prefrontal (Figura 7), lo cual sugiere que la activación del receptor a glucocorticoides influye en la actividad mitocondrial de estructuras del SNC relacionadas con la consolidación de la memoria.

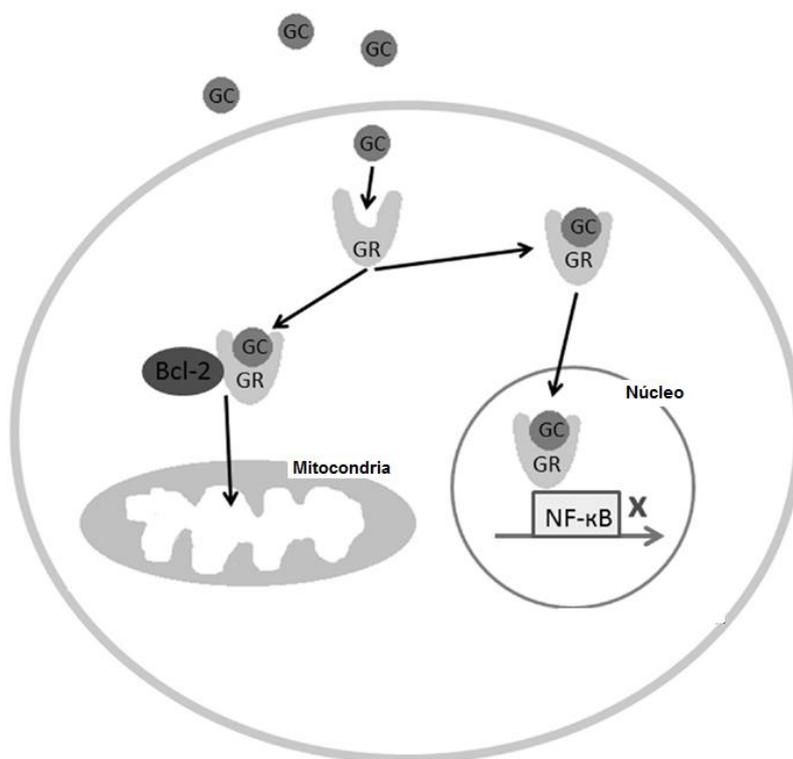


**Figura 7.** Tinción del receptor a glucocorticoides por medio de la técnica de inmunogold en el sinaptosoma de células hipocampales. Las flechas indican la presencia el GR marcado. Modificada de Moutsatsou et al. (2001).

Estos resultados son relevantes, ya que iniciaron un tema de estudio sobre el mecanismo de acción que permite la translocación del GR en las mitocondrias y cómo influye en la actividad mitocondrial de células de tejido nervioso.

Como se mencionó antes, el GR forma complejos con proteínas de choque térmico como HSP70/ 90, además de la proteína anti-apoptótica Bag-1 (Filipović, Gavrilović, Dronjak, & Radojčić, 2005). Se ha establecido que las proteínas que tienen como destino el translocarse en las mitocondrias requieren de proteínas chaperonas, siendo HSP70/90 la parte del complejo que comparte esta característica (Čvoro, Dundjerski, Trajković, & Matić, 1998). El GR se encuentra de manera inactiva formando un heterodímero con diferentes proteínas, en las cuales se encuentra HSP 70/90, la asociación con esta proteína entonces

permite al GR formar un complejo con Bcl-2 que es una molécula anclada en la membrana externa mitocondrial, que permitiría entonces el ingreso de GR a la matriz mitocondrial en donde funcionaría como un factor transcripcional del genoma mitocondrial (Figura 8). Por su parte el transporte por medio de Bag-1 atenúa la translocación del GR al núcleo, activando otras vías como ERK-1 y potenciando la función anti-apoptótica de Bcl-2 (Cato & Mink, 2001). Este proceso quedó demostrado en cultivos de células corticales, en las cuáles se encontró una inmunoprecipitación conjunta de Bcl-2 y GR, además de que la aplicación de corticosterona en los cultivos aumentaba los niveles de Bcl-2 en la mitocondria (Du et al., 2009a).



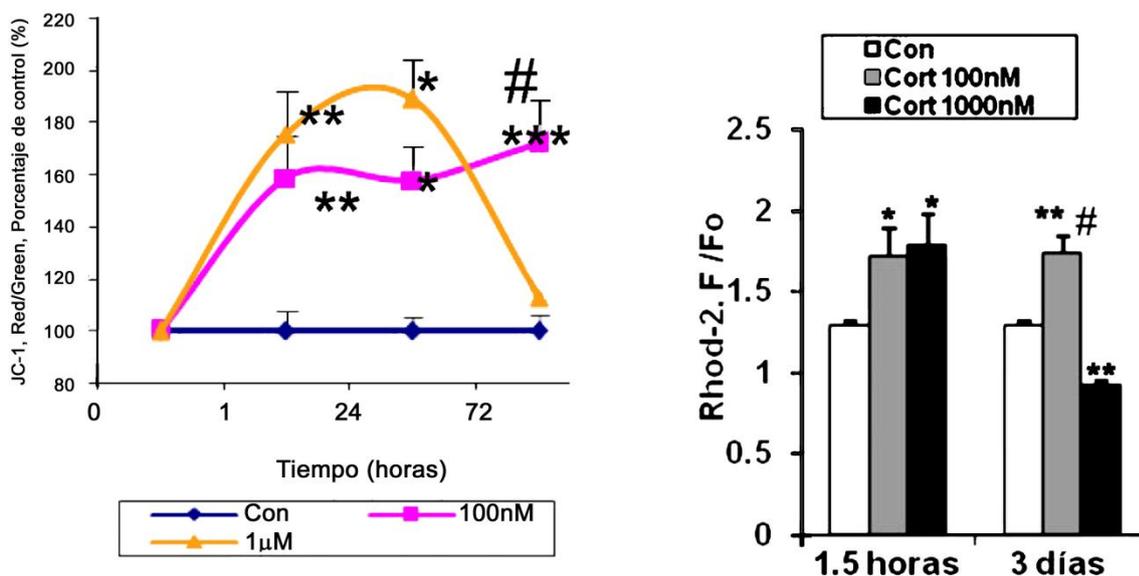
**Figura 8.** Representación del mecanismo de translocación del GR en mitocondria. Una vez que el receptor fue activado por la corticosterona, este es transportado por HSP70/90 hasta mitocondria donde se une a Bcl-2 para llegar a la matriz mitocondrial. Modificada de Maldonado Bouchard y Hook (2014).

Una vez que el GR se transloca en las mitocondrias se une al genoma mitocondrial, en sitios de unión denominados GRE putativos (secuencias de nucleótidos análogas a los elementos de respuesta a glucocorticoides del núcleo) (Demonacos et al., 1996), influyendo en la transcripción de diversos genes. Un trabajo que contribuye a esta aseveración es el realizado por Psarra y Sekeris (2011), quienes encontraron que la administración de dexametasona (agonista sintético al receptor a glucocorticoides) en un

cultivo de células Hep del hígado, inducía la transcripción de la mayoría de los genes mitocondriales, principalmente subunidades del complejo I y IV de la cadena de fosforilación oxidativa, además, este efecto se veía deteriorado cuando se le administraba el RU 486 que es un antagonista del receptor a glucocorticoides.

### 2.6.7. Influencia de los glucocorticoides en la actividad mitocondrial

Se conoce que la actividad mitocondrial está fuertemente asociada a la influencia de los glucocorticoides. Prueba de esto es el trabajo realizado por Du et al. (2009a), quienes estudiaron los efectos de diferentes cantidades y temporalidades en la aplicación de corticosterona en cultivos de neuronas corticales. Reportaron que las dosis teorizadas como fisiológicas (100 nM) es decir las concentraciones normales en un evento estresante, potenciaban diferentes funciones mitocondriales, como el potencial de membrana y el secuestro de calcio (Figura 9), encontrando que tanto la translocación del GR a las mitocondrias como la potenciación de la actividad mitocondrial se presentaba inicialmente a las 1.5 horas. También se ha reportado que en células Hep del hígado la activación GR es capaz de aumentar la producción de ATP (Psarra & Sekeris, 2011).



**Figura 9.** A la izquierda, el efecto de la administración de corticosterona en el potencial de membrana mitocondrial de neuronas a lo largo del tiempo (horas) cuando se le administra dosis pequeñas y altas de corticosterona. A la derecha, efecto de la administración de corticosterona en la capacidad para captar calcio. Modificada de Du et al. (2009b).

Considerando la evidencia de que la actividad mitocondrial es un factor importante en la modulación de la plasticidad y que ha sido reportada como un aspecto influyente en diversos tipos de conducta como el comportamiento social, la depresión y la memoria, y el hecho de que el receptor a glucocorticoides sea capaz de translocarse en mitocondria y potenciar sus funciones, este mecanismo podría estar involucrado en la influencia de los glucocorticoides en la consolidación de la memoria.

### **3. Justificación**

Se ha demostrado de manera contundente la relación entre el estrés y la consolidación de la memoria. Particularmente por la administración de corticosterona, ya sea de forma sistémica, o directamente en una estructura como el estriado dorsal, que provoca facilitación en la consolidación de la memoria (Medina et al., 2007; Quirarte et al., 2009). Esta acción se debe a la activación del receptor a glucocorticoides, que funciona como un factor de transcripción e induce la expresión de genes de *novo* (Kumar & Calhoun, 2008). Sin embargo, aún no se conoce por completo la dinámica de acción de este receptor. Se ha reportado que el receptor a glucocorticoides puede también translocarse a las mitocondrias, donde potencia su actividad (Du et al., 2009a). Esto es importante, ya que la actividad mitocondrial es clave para los procesos de plasticidad neuronal, por lo que este mecanismo es un blanco idóneo de estudio para entender la influencia de los glucocorticoides en la consolidación de la memoria. Cabe señalar que a la fecha no se han realizado experimentos *ex vivo* que estudien la dinámica de translocación del receptor a glucocorticoides en las mitocondrias de una estructura cerebral asociada a la consolidación de la memoria, aunque si se ha reportado su presencia en una fracción mitocondrial del hipocampo (Moutsatsou et al., 2001). Considerando esto, es necesario indagar el curso temporal de la translocación del receptor a glucocorticoides (GR) en las mitocondrias de diferentes estructuras cerebrales cuya actividad es necesaria para la consolidación de la memoria, tales como el hipocampo, la amígdala o el estriado y si dicho proceso, está relacionado funcionalmente con la actividad mitocondrial. En el presente trabajo planteamos abordar una posible relación entre la actividad del GR y la actividad mitocondrial al estudiar el curso temporal de la translocación del receptor a glucocorticoides en las mitocondrias y el potencial de membrana mitocondrial del estriado



dorsal de ratas que fueron entrenadas en la tarea de laberinto acuático en su versión de procedimiento (con clave).

Lo que nos lleva a plantearnos las siguientes preguntas de investigación:

¿El aprendizaje de la tarea de laberinto acuático con clave inducirá cambios en el curso temporal de la translocación del receptor a glucocorticoides en las mitocondrias del estriado dorsal?

¿El aprendizaje de la tarea de laberinto acuático con clave inducirá cambios en el curso temporal del potencial de membrana mitocondrial del estriado dorsal?

## **4. Objetivos**

### **General**

Estudiar una posible relación temporal entre la translocación del receptor a glucocorticoides en las mitocondrias del estriado dorsal y el potencial de membrana mitocondrial durante la consolidación.

### **Particulares**

1. Estudiar la correlación entre la translocación del GR a las mitocondrias a lo largo del tiempo (0.5, 1.5 y 6.0 h) y el proceso de consolidación de la memoria.
2. Comparar un posible curso temporal (0.5, 1.5 y 6.0 h) en el potencial de membrana mitocondrial del estriado dorsal durante la consolidación de la memoria.

## **5. Hipótesis**

H1: La translocación del receptor a glucocorticoides en las mitocondrias del estriado dorsal mostrará un curso temporal, teniendo un pico a las 1.5 horas después del entrenamiento.

H2: El potencial de membrana mitocondrial del estriado dorsal mostrará un curso temporal, teniendo un pico a las 1.5 horas después del entrenamiento.

## **6. Método**

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos bioéticos del Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México para el uso de animales experimentales y estuvieron acorde con la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (2001) y a las normas estipuladas en la “Guide for the care and use of Laboratory Animals” (National Research Council, 2011).

### **6.1. Sujetos**

Se utilizaron 89 ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 250 y 300 g. Se alojaron en cajas individuales con acceso a agua y comida *ad libitum* con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (inicio a las 07:00 h.) y con temperatura ambiental de  $21\pm 1$  °C.

### **6.2. Manipulación**

Las ratas fueron sometidas a 3 sesiones de manipulación en días consecutivos. Cada sesión consiste en tomar y acariciar a cada rata durante 5 minutos, para que puedan adaptarse a las manos del experimentador y así, reducir el estrés durante los experimentos.

### **6.3. Aparato**

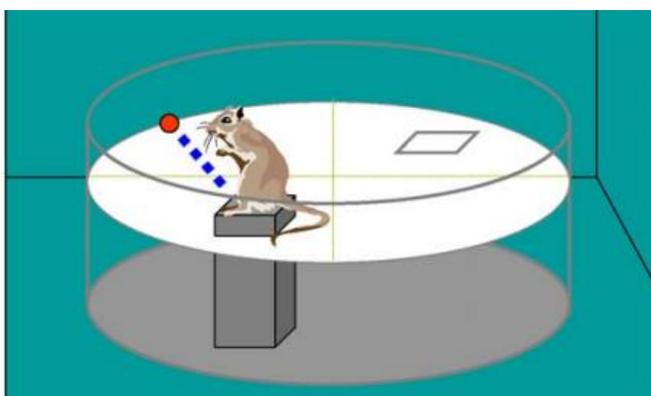
El laberinto acuático de Morris consta de un tanque circular de plástico negro de 154 cm de ancho y 60 cm de altura, que se encuentra elevado a una altura de 58 cm sobre el nivel del suelo; rodeado por una cortina negra corrediza que se eleva 150 cm por encima del tanque. El tanque se llena con agua a una temperatura de  $25\pm 2$  °C, hasta una altura de 1.5 cm por arriba de la plataforma cuadrada de acrílico transparente de 11.8 cm<sup>2</sup> por 22 cm de alto, sobre la cual se ubica una clave visible de 12 cm de altura con franjas de cinta adhesiva verde y blanco que contrasta con el fondo negro del tanque. Además, el tanque

está dividido imaginariamente en 4 cuadrantes empleando como referencia los puntos cardinales.

El cuarto en el que se encuentra el tanque tiene una dimensión de 236 cm x 225 cm x 242 cm, es sonoamortiguado con las paredes blancas y el techo negro. La iluminación del cuarto de experimentación es provista por lámparas con un foco de 60 W. En el techo se ubica una cámara que registra la trayectoria de nado de los sujetos, dicha cámara está conectada a una computadora y mediante el software AnyMaze se registran los parámetros de latencia de escape y distancia recorrida, durante las sesiones de entrenamiento y prueba de retención.

#### 6.4. Entrenamiento

Durante el entrenamiento en el laberinto acuático con clave (de procedimiento), cada rata fue colocada en el laberinto del cual podían escapar al localizar una plataforma oculta (Figura 10). Se realizaron 8 ensayos, en cada uno, se cambió la posición de la plataforma por los 4 cuadrantes del laberinto, así como la posición de salida de los sujetos, que siempre fue contraria a la posición de la plataforma. Cada ensayo duró un máximo de 60 s, sí en el primer ensayo la rata no encontraba la plataforma se le guiaba hasta ella, y se le mantenía ahí por 10 s, continuando posteriormente con el resto de los ensayos. Se midió entonces, el tiempo que les tomó a las ratas el llegar hasta la plataforma o la latencia de escape por cada uno de los ensayos. Se consideró como un buen aprendizaje si el último ensayo tiene una menor latencia que el primer ensayo.



**Figura 10.** Entrenamiento en el laberinto acuático con clave. Los sujetos se colocan en una posición opuesta a la plataforma que tiene una clave visible y medida que avanzan los ensayos disminuye su tiempo de llegada a la plataforma. Modificado de McDonald, Hong y Devan (2004).

## **6.5. Prueba de retención**

La prueba de retención de la tarea de laberinto acuático con clave se llevó a cabo 48 h después del entrenamiento, en ésta, los sujetos entrenados son expuestos nuevamente al laberinto, con la plataforma oculta y la clave visible. En este caso se realizó un solo ensayo en el que se midió la latencia de escape. Se consideró que los animales tuvieron una buena retención de la memoria si la latencia de escape de la prueba era igual o menor que el último ensayo del entrenamiento.

## **6.6. Sacrificio y extracción de tejidos**

Los animales fueron sacrificados por decapitación a las 0.5, 1.5, ó 6 h después del entrenamiento. Los tiempos de sacrificio fueron elegidos basados en los antecedentes de la translocación del GR en mitocondrias encontrado inicialmente en mitocondrias aisladas de hígado de rata a las 0.5 horas (Demonacos et al., 1996), a las 1.5 horas en cultivos de neuronas de corteza (Du et al., 2009a), agregando la temporalidad de 6.0 horas, la cual se ha reportado como la última ventana de consolidación de una memoria de procedimiento (Balas, Netser, Giladi, & Karni, 2007). Una vez obtenidos los cerebros se extrajo el estriado dorsal de ambos hemisferios (Roosendaal et al., 2009; Sekiguchi et al., 2012), colocándolos en tubos Eppendorf y congelándolos inmediatamente con hielo seco (CO<sub>2</sub>), para después ser almacenados a una temperatura de -70°C.

## **6.7. Obtención de la fracción mitocondrial**

Para obtener la fracción mitocondrial se homogenizaron los tejidos adicionados con 50 µl de RIPA + COMPLETE en un sonicador, haciendo 10 repeticiones. El homogenado resultante fue centrifugado a 1,000 g por 10 min; posteriormente, el sobrenadante fue centrifugado a 12,000 g por 20 min, para obtener el pellet crudo de mitocondrias (Moutsatsou et al., 2001) al que se le agregó 70 µl de RIPA + COMPLETE, para su posterior uso.

## 6.8. Western blot

La concentración proteica en la fracción mitocondrial cruda fue determinada con el método de Bradford (Bradford, 1976). Se tomaron porciones iguales de proteína (50 µg) para cada una de las muestras, a las que después se les agregó buffer de muestra para proceder a hervirlas por 5 min. Se cargaron las muestras en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%, para llevar a cabo la electroforesis. Las proteínas fueron posteriormente transferidas a membranas de nitrocelulosa que fueron bloqueadas con leche al 5% por 2 h, para después ser incubadas con el anticuerpo primario para receptor a glucocorticoides total GR H300 (Santa Cruz Biotech). Se realizaron entonces 6 lavados con TBS y TTBS, para después incubar con el anticuerpo secundario correspondiente. Finalmente se colocaron las membranas en el agente quimioluminiscente (ECL, Pierce) para el revelado. Posteriormente se realizó un stripping de las membranas, incubándolas con anticuerpo contra porinas mitocondriales anti-VDAC (abcam) como control de carga.

Para analizar los resultados del Western blot se utilizó el software Image Lab. Con el cuál se midió la densitometría tanto de las bandas representativas del receptor a glucocorticoides como de las de porina (VDAC). Se establecieron unidades arbitrarias dividiendo la densidad de las bandas de receptor a glucocorticoides entre la densidad de las bandas del control de carga de porinas (VDAC). A su vez, las bandas de señal del GR fueron normalizadas contra un grupo intacto de cada gel en el Western blot.

## 6.9. MitoTracker

Las ratas se entrenaron en el laberinto acuático con clave de acuerdo al protocolo descrito en las secciones 6.1.2, 6.1.3, 6.1.4. Se extrajo el estriado dorsal de ratas entrenadas y no entrenadas de acuerdo al apartado 6.1.6. Los tejidos se colocaron inmediatamente después del sacrificio en una solución RINGER + MitoTracker red en constante oxigenación y en oscuridad, esto con la finalidad de que las mitocondrias se mantuvieran vivas y fuera posible detectar su actividad. Una vez pasados 15 minutos, los tejidos fueron fijados en paraformaldehído al 4% por 4 días. Los tejidos fueron posteriormente procesados en un tren de sacarosa al 10%, 20% y 30 %, por 24 horas a cada concentración. Los tejidos fueron después seccionados en cortes de 10 µm y adheridos a portaobjetos superfrost para su posterior observación en el microscopio de fluorescencia. Se tomaron 12 micrografías por cada rata, tomando en cuenta ambos hemisferios.

Las micrografías fueron analizadas utilizando el software ImageJ, por medio del cual se midió la intensidad integral de la señal; de estos datos se hizo una suma de ambos hemisferios y se hizo un promedio de los 6 pares de micrografías, para su posterior análisis estadístico.

## **6.10. Análisis estadístico**

### **6.10.1. Análisis conductual**

Con la finalidad de corroborar la normalidad y homogeneidad de varianzas, todos los datos fueron analizados con la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Se usó una prueba de ANOVA de una vía para comparar las latencias de escape entre los 8 ensayos de la sesión de entrenamiento en el laberinto acuático con clave y un post hoc de Tukey para analizar las diferencias entre cada ensayo. En cuanto a la sesión de retención de la tarea de laberinto acuático con clave, se utilizó una t de student para comparar un solo ensayo de la latencia de retención contra la latencia de escape del octavo ensayo del entrenamiento. Se usó además una t de Student para comparar la distancia recorrida.

### **6.10.2. Análisis Western blot y MitoTracker**

Con la finalidad de corroborar normalidad y homogeneidad de varianzas, todos los datos fueron analizados con la prueba de Kolmogorov-Smirnov

Los datos de las unidades arbitrarias de la translocación del receptor a glucocorticoides, tanto de los grupos entrenados como los de nado fueron normalizados al grupo intacto que fue tomado como un 100%. Se utilizó una prueba de ANOVA de una vía y una post-hoc de Tukey para comparar entre grupos.

Se usó una ANOVA de 2 vías para comparar las unidades arbitrarias normalizadas entre los grupos entrenados en el laberinto acuático con clave y los grupos de nado, haciendo una post-hoc de Bonferroni para comparar los grupos.

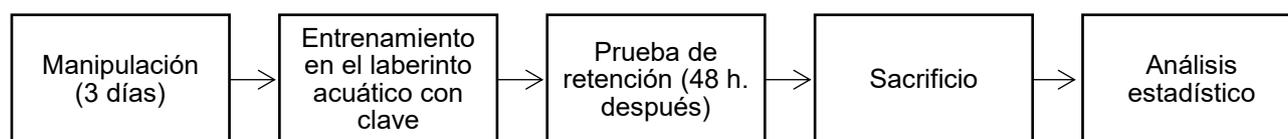
En cuanto a la técnica del MitoTracker, los datos de la señal del potencial de membrana mitocondrial del estriado dorsal de los diferentes grupos se analizaron con una prueba de ANOVA de una vía y se utilizó una post-hoc de Tukey.

Se usó una ANOVA de 2 vías para comparar la señal del potencial de membrana mitocondrial de los grupos entrenados en el laberinto acuático con clave y los grupos de nado, se usó una post-hoc de Bonferroni para comparar los grupos.

## 6.11. Diseño experimental

### 6.11.1. Experimento 1

Con la finalidad de establecer las condiciones de entrenamiento y corroborar que las ratas eran capaces de consolidar la experiencia de la tarea de laberinto acuático con clave, se entrenó un grupo de 7 ratas con 8 ensayos. Cada ensayo duró como máximo 60 s. Cuarenta y ocho horas después se llevó a cabo la prueba de retención, en la cual se volvió a colocar a los sujetos en el laberinto y se midió la latencia de escape en un solo ensayo. Una vez terminada la prueba los animales fueron sacrificados (Figura 11).



**Figura 11.** Temporalidad del experimento de la prueba de retención del entrenamiento en el laberinto acuático con clave.

### 6.11.2. Experimento 2

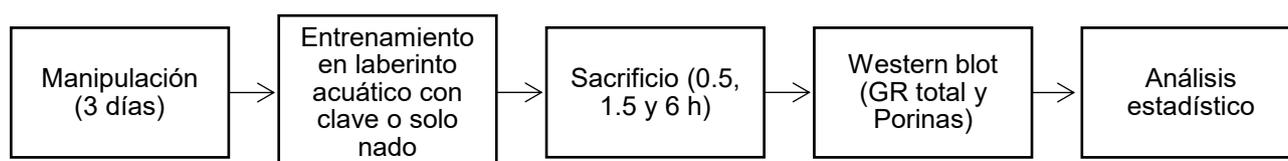
El objetivo de este experimento fue medir los niveles de GR en mitocondrias del estriado dorsal de ratas que aprendieron la tarea de laberinto acuático con clave. Con esta finalidad se formaron tres grupos independientes de ratas que fueron entrenadas en la tarea de laberinto acuático con clave en una sesión de 8 ensayos. Al finalizar el entrenamiento, las ratas fueron sacrificadas a las 0.5, 1.5 ó 6 h. Se eligieron los cerebros de aquellas ratas que tuvieron una ejecución eficiente en la tarea, las ratas que mostraron una latencia de escape igual o mayor al promedio del octavo ensayo en el entrenamiento del experimento 1 fueron excluidas del análisis. Adicionalmente se realizaron tres grupos de nado en los que cada rata se colocó en el tanque sin la plataforma ni la pista, durante el tiempo

promedio que nadaron los grupos que fueron entrenados. Dichos grupos fueron sacrificados a las 0.5, 1.5 o 6 h. En este experimento también se incluyó un grupo llamado intacto que no fue removido de su caja habitación hasta el momento del sacrificio. En la Tabla 1 se muestra la n de los grupos experimentales del Experimento 2.

**Tabla 1.** Diseño experimental de la medición de los niveles de GR en mitocondrias del estriado dorsal.

Tiempos de sacrificio	n Conductual		
	Intacto	Laberinto acuático con clave	Nado
0.5 h	-	9	4
1.5 h	-	7	4
6 h	-	8	4
	n Western blot		
	4		
0.5 h	-	4	4
1.5 h	-	4	4
6 h	-	4	4

En cuanto la temporalidad del experimento (Figura 12) las ratas de los grupos entrenados fueron manipuladas por 5 min durante 3 sesiones en días diferentes antes del día del entrenamiento en el laberinto acuático con clave. Después del sacrificio, se obtuvo el estriado dorsal de ambos hemisferios. Los tejidos fueron homogenizados para obtener la fracción mitocondrial que fue posteriormente analizada con la técnica de Western blot, incubando las membranas contra el anticuerpo para GR, y con el anticuerpo específico a porinas (anti-VDAC) para la confirmación de la obtención de la fracción mitocondrial. Los resultados fueron analizados por densitometría por medio del software ImageLab.



**Figura 12.** Temporalidad del experimento en la medición de los niveles de GR en mitocondrias del estriado dorsal.



### 6.11.3. Experimento 3

La finalidad de este experimento fue medir el potencial de membrana mitocondrial del estriado dorsal de ratas que aprendieron la tarea de laberinto acuático con clave. Se formaron tres grupos independientes de ratas que fueron entrenadas en la tarea de laberinto acuático con clave en una sesión de 8 ensayos. Al finalizar el entrenamiento, las ratas fueron sacrificadas a las 0.5, 1.5 ó 6 h. Se eligieron los cerebros de aquellas ratas que tuvieron una ejecución eficiente en la tarea, las ratas que mostraron una latencia de escape igual o mayor al promedio del octavo ensayo en el entrenamiento del experimento 1 fueron excluidas del análisis. Adicionalmente se realizaron tres grupos de nado en los que cada rata se colocó en el tanque sin la plataforma ni la pista, durante el tiempo promedio que nadaron los grupos que fueron entrenados. Dichos grupos fueron sacrificados a las 0.5, 1.5 ó 6 h. En este experimento también se incluyó un grupo llamado intacto que no fue removido de su caja habitación hasta el momento del sacrificio. En la Tabla 2 se muestran las n de los grupos

**Tabla 2.** Diseño experimental de la medición del potencial mitocondrial del estriado dorsal.

Tiempos de sacrificio	n Conductual		
	Intacto	Laberinto acuático con clave	Nado
0.5 h	-	7	4
1.5 h	-	9	4
6 h	-	7	4
	n MitoTracker		
	4		
0.5 h	-	4	4
1.5 h	-	4	4
6 h	-	4	4

En cuanto a la temporalidad del experimento (Figura 13) las ratas de los grupos entrenados fueron manipuladas por 5 min durante 3 sesiones en días diferentes antes del

entrenamiento. Después del entrenamiento fueron sacrificadas y se obtuvo el estriado dorsal de ambos hemisferios. Inmediatamente después de extraerse, los tejidos fueron puestos en una solución RINGER + MitoTracker en constante oxigenación y en oscuridad por 15 minutos, para después dejarse en fijación con paraformaldehído al 4% por 4 días. Después pasaron por un tren de sacarosa al 10, 20 y 30% por 24 h por cada concentración, para finalmente ser seccionados en cortes de 10  $\mu\text{m}$  de los cuales se tomaron micrografías en un microscopio de fluorescencia. Los resultados del Mitotracker fueron analizados mediante el software Image J.



**Figura 13.** Temporalidad de la medición del potencial de membrana mitocondrial del estriado dorsal.

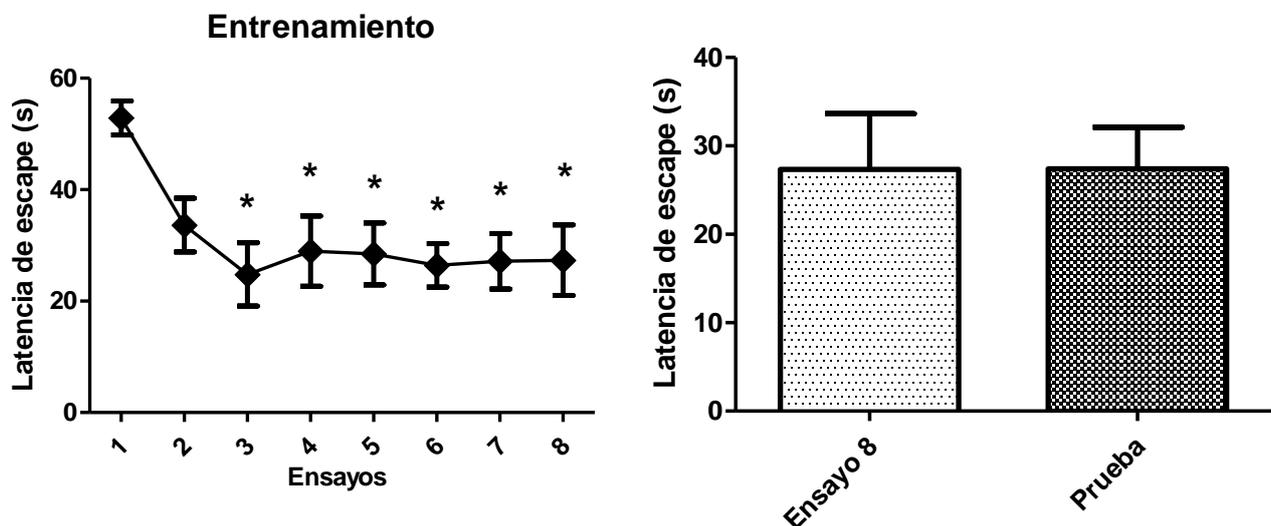
## 7. Resultados

Todos los resultados fueron expresados como promedio  $\pm$  error estándar.

### 7.1. Experimento 1

Los datos obtenidos de entrenamiento fueron estadísticamente normales, por lo que se procedió a realizar el análisis estadístico apropiado.

Se encontraron diferencias significativas entre las latencias de escape por ensayo en la sesión de entrenamiento ( $F(7,95)= 3.102$ ,  $p=0.0057$ ), mientras que la prueba post-hoc de Tukey arrojó diferencias significativas entre el Ensayo 1 con el Ensayo 3 ( $p<0.05$ ), el Ensayo 4 ( $p<0.05$ ), el Ensayo 5 ( $p<0.05$ ), el Ensayo 6 ( $p<0.05$ ), el Ensayo 7 ( $p<0.05$ ) y el Ensayo 8 ( $p<0.05$ ), (Figura 14). Por su parte, la latencia de escape del ensayo 8 en comparación con el ensayo de prueba no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $t(22) = 0.01059$ ,  $p=0.9916$ ), lo que representa una retención adecuada en la ejecución de la tarea.

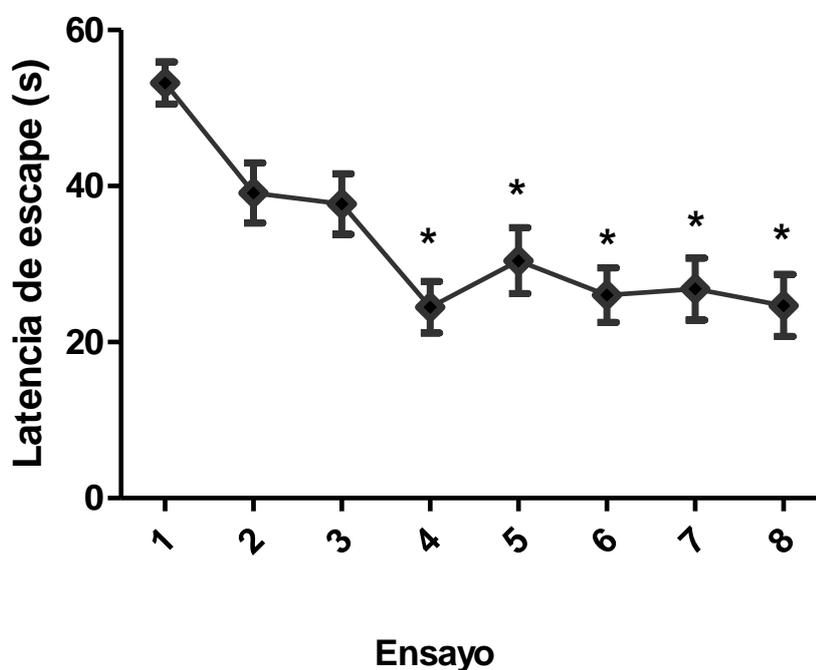


**Figura 14.** A la izquierda se muestra la curva de aprendizaje del entrenamiento ( $n=12$ ). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $F(7,95) = 3.102$ ,  $p= 0.0057$ ). El símbolo \* indica diferencias significativas en comparación con el primer ensayo. A la derecha, se muestra la comparación de las latencias de escape del último ensayo del entrenamiento y del ensayo de la prueba de retención a las 48 horas, no se encontraron diferencias significativas ( $t(22)= 01059$ ,  $p= 9916$ ).

## 7.2. Experimento 2

Los datos de las latencias de escape del entrenamiento en el laberinto acuático con clave fueron normales, por lo que se procedió con el análisis estadístico establecido.

Se encontraron diferencias significativas entre las latencias de escape por ensayo ( $F(7,191)= 7.353$ ,  $p<0.0001$ ) (Figura 15), mientras que la prueba post-hoc de Tukey arrojó diferencias significativas entre el Ensayo 1 con el Ensayo 4 ( $p<0.05$ ), el Ensayo 5 ( $p<0.05$ ), el Ensayo 6 ( $p<0.05$ ), el Ensayo 7 ( $p<0.05$ ) y el Ensayo 8 ( $p<0.05$ ), lo que indica una mejoría en la ejecución de la tarea a lo largo de los ensayos y por lo tanto un aprendizaje.

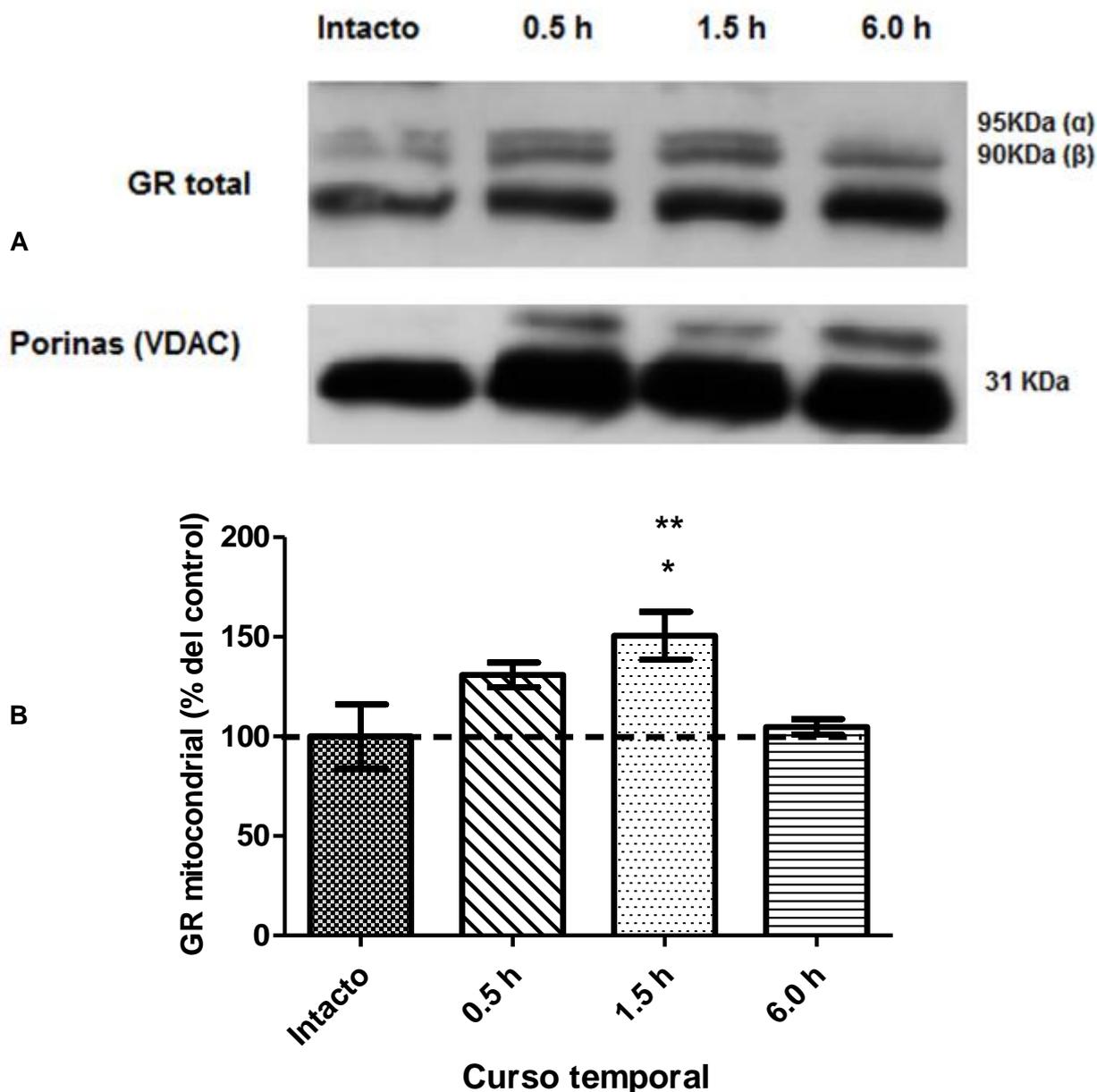


**Figura 15.** Curva de aprendizaje de ratas entrenadas en el laberinto acuático con clave ( $n= 24$ ). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $F(7,191) = 8.456$ ,  $p<0.0001$ ) en las latencias de escape entre los ensayos. El símbolo \* indica diferencias significativas en comparación con el primer ensayo.

Los datos del Western Blot fueron estadísticamente normales, por lo cual se procedió con el análisis estadístico establecido.

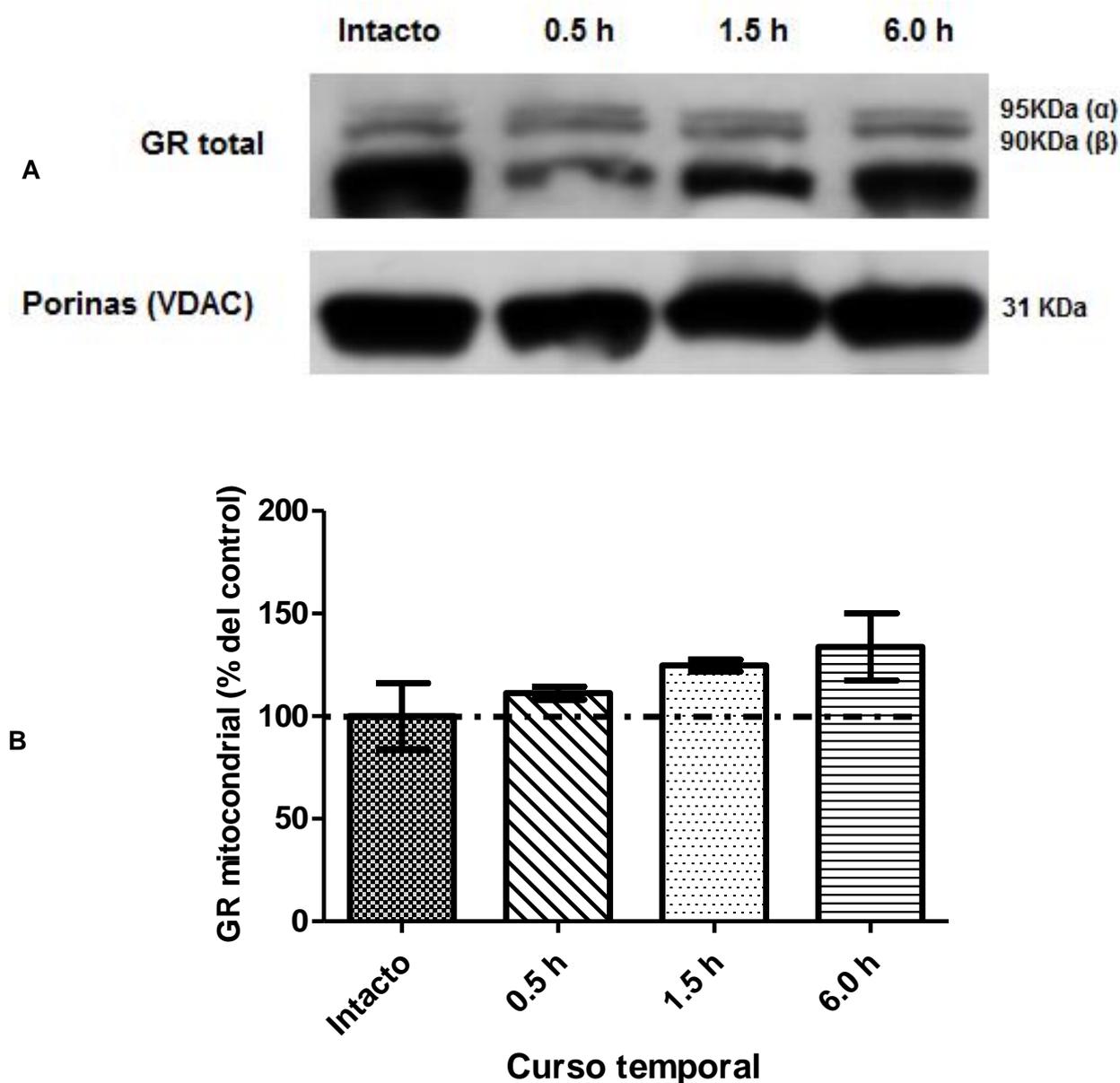
Los niveles de GR en las mitocondrias de las ratas entrenados en el laberinto acuático con clave mostraron un curso temporal. Se encontraron diferencias significativas ( $F(3,15) = 4.908$ ,  $p=0.0188$ ), mostrando un aumento del 50.53% en la señal del grupo sacrificado a

las 1.5 h en comparación al grupo intacto ( $p < 0.05$ ) y un aumento del 45.71% en comparación al grupo sacrificado a las 6.0 h ( $p < 0.05$ ) (Figura 16).



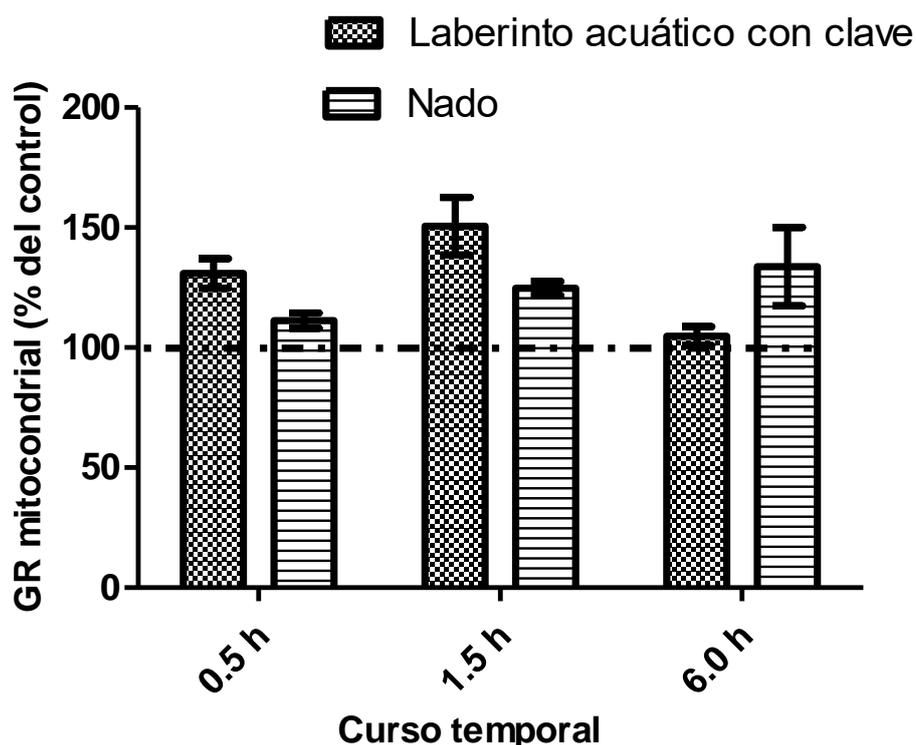
**Figura 16.** A) Bandas representativas del Western blot de una rata del grupo Intacto y de una rata de cada grupo entrenada en la tarea de laberinto acuático con clave y sacrificada a las 0.5 h, 1.5 h ó 6.0 h. Se muestra la banda que indica la presencia del receptor a glucocorticoides y la banda del control de carga de porinas (VDAC), en el estriado dorsal. B) Se muestra el promedio (n=4) de los niveles de GR en las mitocondrias del estriado dorsal de los diferentes grupos. El símbolo \* indica diferencias significativas contra el grupo intacto; (\*\*) indica diferencias significativas contra el grupo sacrificado a las 6.0 horas. (F (3,15) = 4.908,  $p = 0.0188$ ).

En el caso de los grupos que fueron sometidos a nado, no se encontró un curso temporal, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $F(3,15) = 1.617$ ,  $p=0.2373$ ) (Figura 17).



**Figura 17.** A) Bandas representativas del Western blot de una rata del grupo Intacto y de una rata de cada grupo sometida a nado y sacrificada a las 0.5 h, 1.5 h o 6.0 h. Se muestra la banda que indica la presencia del receptor a glucocorticoides y la banda de su control de carga de porinas (VDAC) en el estriado dorsal. B) Se muestra el promedio ( $n=4$ ) de los niveles de GR en las mitocondrias del estriado dorsal de los diferentes grupos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.  $F(3,15) = 1.617$ ,  $p=0.2373$ ).

Al comparar los diferentes grupos entrenados en el laberinto acuático con clave y los grupos sometidos a nado no se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto en el factor entrenamiento ( $F(1,18) = 0.5665$ ,  $p = 0.4614$ ), como en el factor temporalidad ( $F(2,18) = 2.526$ ,  $p = 0.1079$ ). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la interacción de ambos factores ( $F(2,18) = 5.579$ ,  $p = 0.0130$ ) (Figura 18). La prueba post-hoc de Bonferroni no mostró diferencias estadísticamente significativas.



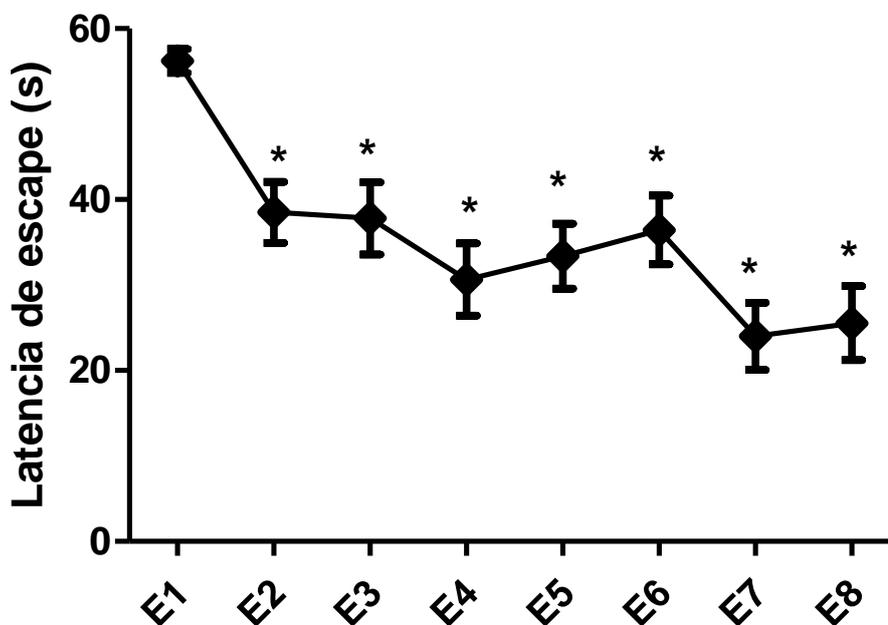
**Figura 18.** Promedio del nivel de GR en mitocondrias del estriado dorsal de los grupos entrenados en el laberinto acuático con clave y los grupos sometidos a nado ( $n=4$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto en el factor entrenamiento ( $F(1,18) = 0.5665$ ,  $p = 0.4614$ ), como en el factor temporalidad ( $F(2,18) = 2.526$ ,  $p = 0.1079$ ), pero sí en la interacción ( $F(2,18) = 5.579$ ,  $p = 0.0130$ ).

### 7.3. Experimento 3

Los datos obtenidos del entrenamiento en el laberinto acuático con clave fueron estadísticamente normales, por lo que se procedió con el análisis estadístico establecido.

Al realizar la prueba de ANOVA se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las latencias de escape por ensayo ( $F(7,175) = 6.981$ ,  $p < 0.0001$ ), mientras que la prueba post-hoc de Tukey arrojó diferencias significativas entre el Ensayo 1 y el Ensayo 2

( $p < 0.05$ ), el Ensayo 3 ( $p < 0.05$ ), el Ensayo 4 ( $p < 0.05$ ), el Ensayo 5 ( $p < 0.05$ ), el Ensayo 6 ( $p < 0.05$ ), el Ensayo 7 ( $p < 0.05$ ) y el Ensayo 8 ( $p < 0.05$ ), lo que indica una mejoría en la ejecución de la tarea a lo largo de los ensayos y por lo tanto un aprendizaje (Figura 19).

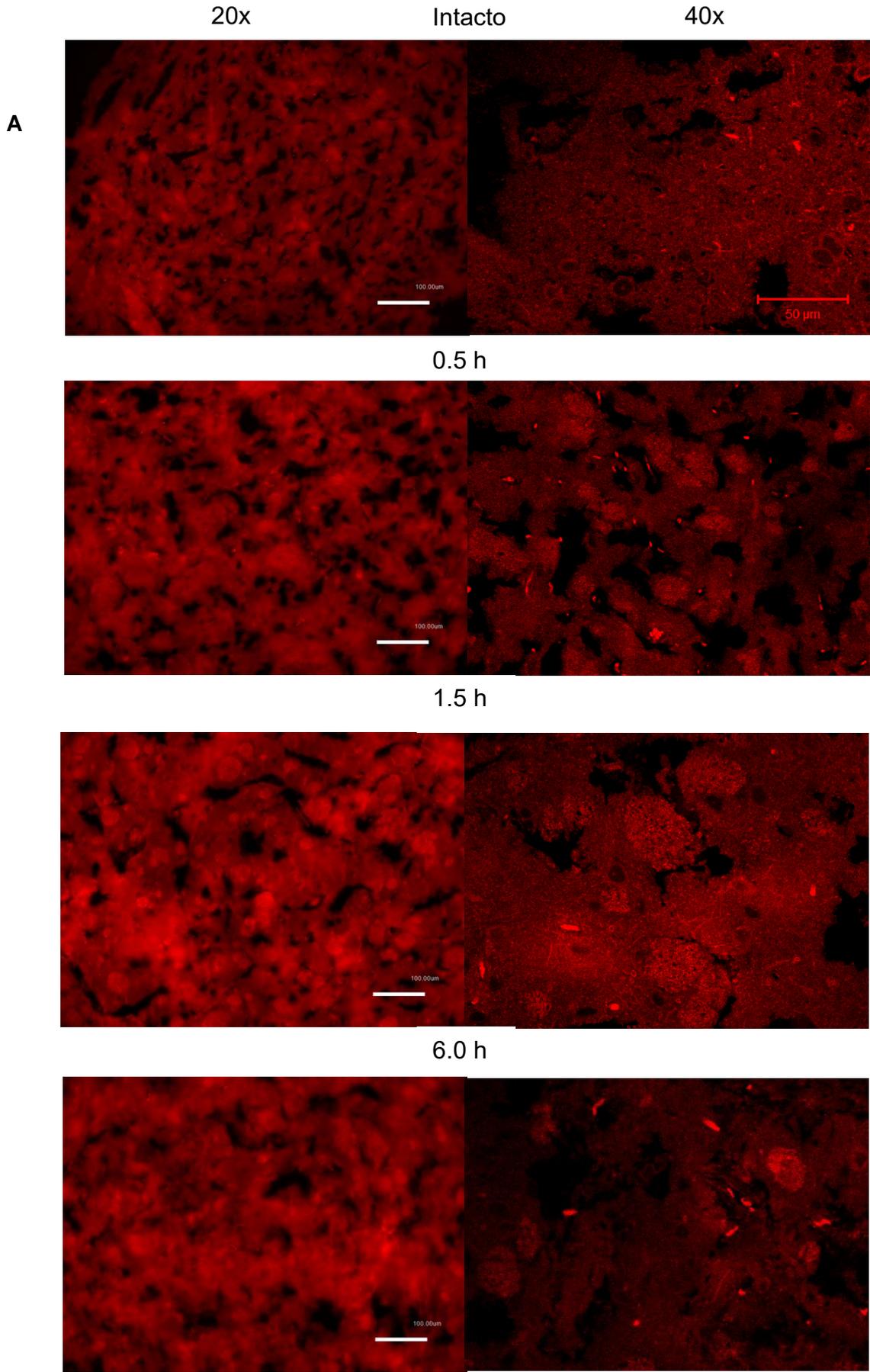


**Figura 19.** Curva de aprendizaje de ratas entrenadas en el laberinto acuático con clave en los 8 ensayos ( $n=22$ ). Se encontraron diferencias significativas ( $F(7,175) = 6.981, p < 0.0001$ ) en las latencias de escape entre los ensayos. El símbolo \* indica diferencias significativas en comparación con el primer ensayo.

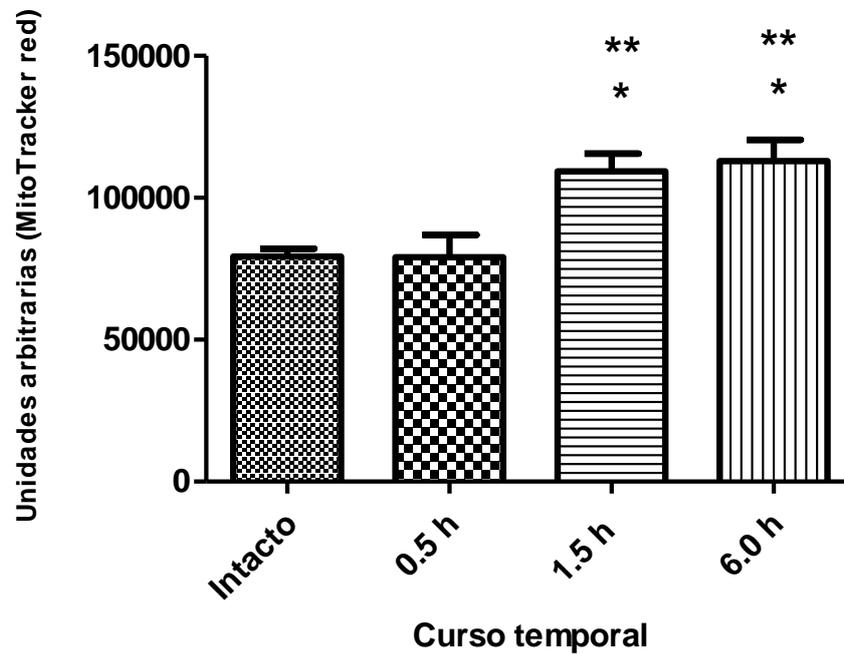
Los resultados del MitoTracker fueron estadísticamente normales, por lo que se procedió con el análisis estadístico apropiado.

La señal del MitoTracker de los grupos entrenados en el laberinto acuático con clave mostró un curso temporal. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $F(3,15) = 8.294, p = 0.0030$ ), mostrando un aumento del 37.86% en la señal del grupo sacrificado a las 1.5 h en comparación con el grupo intacto ( $p < 0.05$ ) y un aumento del 38.28% en comparación al grupo sacrificado a las 0.5 horas ( $p < 0.05$ ); también se encontró un aumento del 42.54% en la señal del grupo sacrificado a las 6.0 horas en comparación con el grupo intacto ( $p < 0.05$ ) y un aumento del 42.97 en comparación con el grupo sacrificado a las 0.5 horas ( $p < 0.05$ ) (Figura 20).



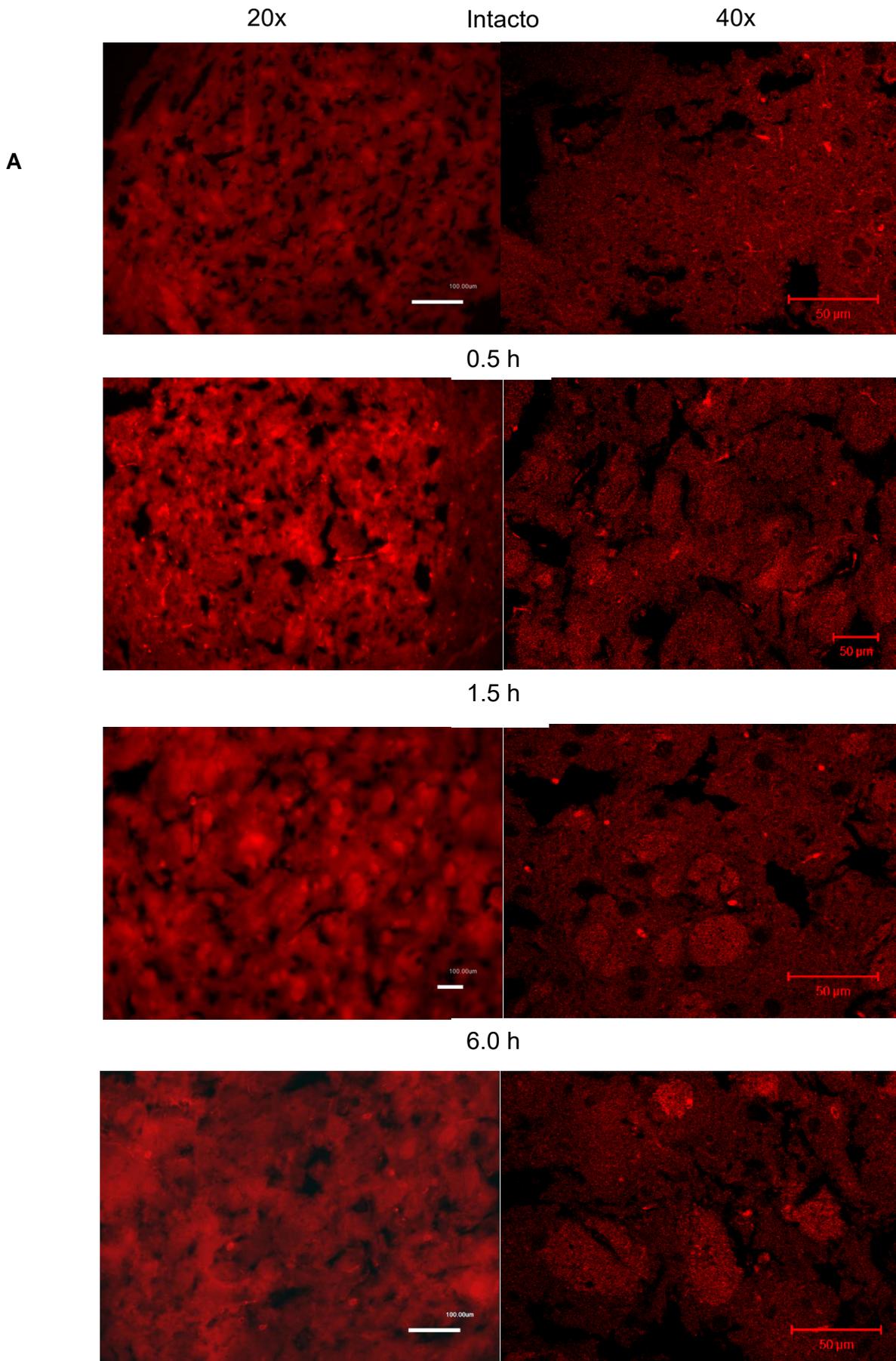


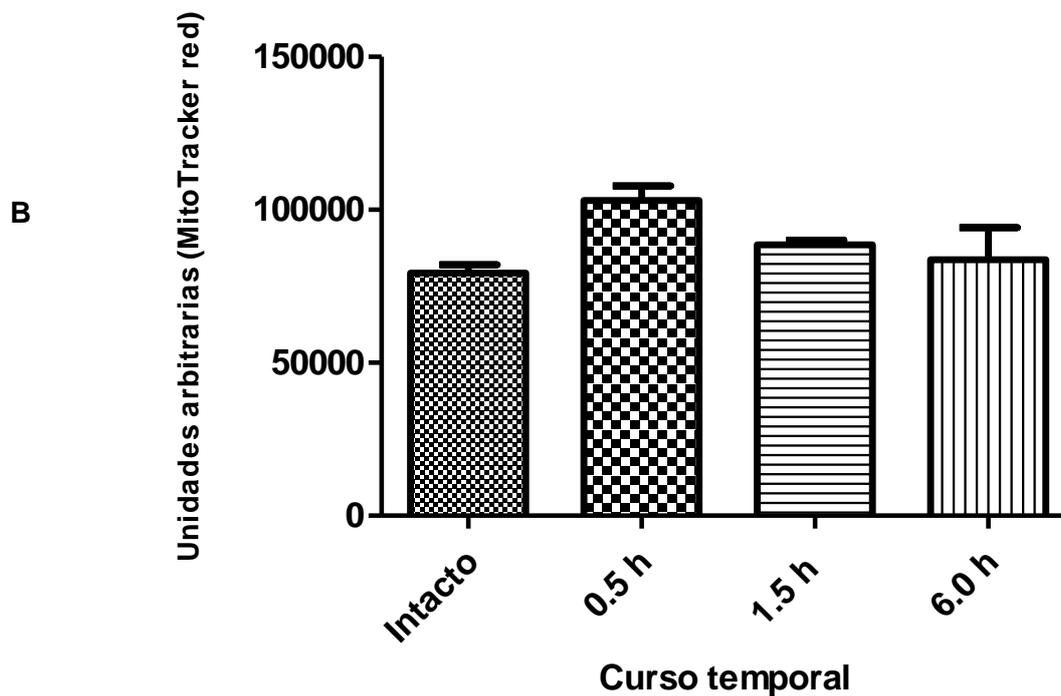
**B**



**Figura 20.** (A) Micrograffias representativas de la señal de MitoTracker en secciones del estriado dorsal de las ratas entrenadas en el laberinto acuático con clave. (B) Se muestra el promedio de la fluorescencia del MitoTracker de los grupos experimentales (n=4). El \* indica diferencias estadísticamente significativas contra el grupo intacto; \*\* indica diferencias significativas contra el grupo sacrificado a las 0.5 horas. (F (3,15) = 8.294, p=0.0030).

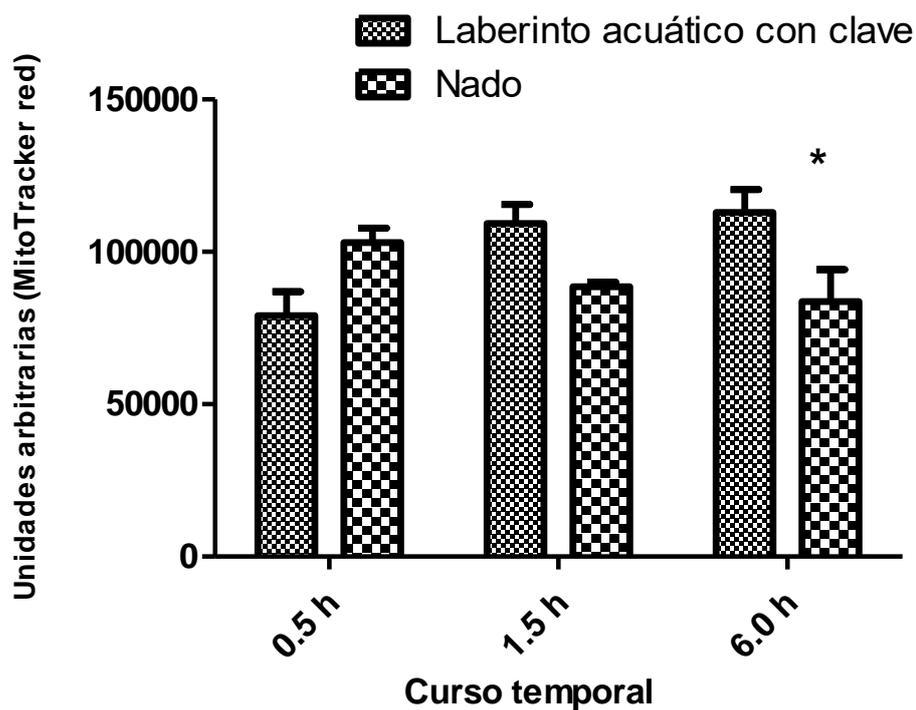
En el caso de los grupos experimentales que fueron sometidos a nado, no se encontró un curso temporal, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (F (3,15) = 2.967, p=0.0747) (Figura 21).





**Figura 21.** (A) Micrografías representativas de la señal de MitoTracker en secciones del estriado dorsal de las ratas entrenadas sometidas solo a nado. (B) Se muestra el promedio de la fluorescencia del MitoTracker de los diferentes grupos (n=4). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $F(3,15) = 2.967$ ,  $p=0.0747$ ).

Al comparar la señal del MitoTracker de todos los grupos entrenados en el laberinto acuático con clave y todos los grupos sometidos a nado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto en el factor entrenamiento ( $F(1,18) = 2.306$ ,  $p=0.1462$ ) como en el factor temporalidad ( $F(2,18) = 0.7913$ ,  $p=0.4684$ ) (Figura 22). Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la interacción de ambos factores ( $F(2,18) = 8.372$ ,  $p=0.0027$ ). La prueba post-hoc de Bonferroni mostró diferencias estadísticamente significativas en el factor temporalidad entre los grupos sacrificados a las 6.0 horas ( $t=2.958$ ,  $p<0.05$ ).



**Figura 22.** Unidades arbitrarias de la fluorescencia del MitoTracker de los grupos experimentales entrenados en el laberinto acuático con clave y los sometidos a nado. El \* indica diferencias significativas (n=4). no se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto en el factor entrenamiento ( $F(1,18) = 2.306$ ,  $p = 0.1462$ ) como en el factor temporalidad ( $F(2,18) = 0.7913$ ,  $p = 0.4684$ ). Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la interacción de ambos factores ( $F(2,18) = 8.372$ ,  $p = 0.0027$ ). La post-hoc de Bonferroni mostró diferencias estadísticamente significativas en el factor temporalidad entre los grupos sacrificados a las 6.0 horas ( $t = 2.958$ ,  $p < 0.05$ ).

Adicionalmente, se comparó la distancia recorrida en metros de ratas entrenadas en el laberinto acuático en comparación con ratas sometidas solo a nado (Figura 23), con la finalidad de comprobar que ambos grupos tuvieran la misma actividad. La t de student no arrojó diferencias estadísticamente significativas ( $t(14) = 0.3839$ ,  $p = 0.7046$ ) por lo cual, todas las ratas de los grupos experimentales nadaron la misma distancia.

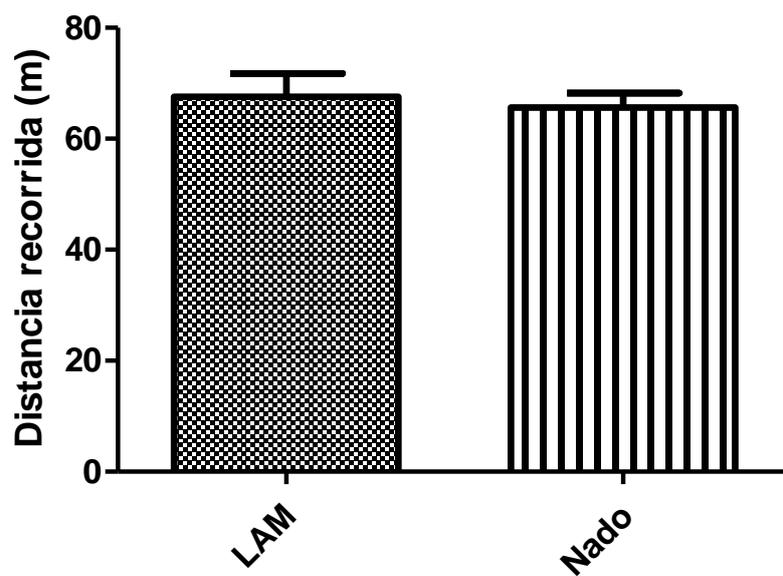


Figura 23. Distancia recorrida promedio de las ratas entrenadas en el laberinto acuático con clave (LAM) y de las ratas sometidas solo a nado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $t(14) = 0.3839$ ,  $p=0.7046$ ).

## 8. Discusión

Los resultados conductuales del entrenamiento demostraron que la consecución de ensayos mejora la ejecución de las ratas en el laberinto acuático con clave; operacionalmente, la adquisición de habilidades motoras se observa en una reducción del tiempo de reacción o el cambio sinérgico en los movimientos (Doyon & Ungerleider, 2002; Reber, 2013), siendo en este caso la disminución de la latencia de escape debido a la consecución de los 8 ensayos realizados.

La prueba de retención 48 horas después del entrenamiento, mostró una latencia de escape igual a la del octavo ensayo del día del entrenamiento (Figura 13), esto demuestra que ocurrió un proceso de consolidación de la memoria, ya que las ratas mostraron un ahorro en el aprendizaje en la latencia de escape, funcionalmente, esto se debe a que en el día de la prueba de retención estaría en proceso la segunda etapa de la consolidación de la memoria de procedimiento o aprendizaje motor, en la cual, después de una fase rápida de adquisición (día del entrenamiento) se llega a una fase lenta en la cual la mejora en la ejecución de la tarea se vuelve más lenta (ensayo de prueba) pero que ya no vuelve a ser igual que la ejecución del primer ensayo (Doyon & Ungerleider, 2002). En este procesamiento de información, el estriado, en conjunto con las cortezas motoras, juegan un papel esencial, ya que se ha demostrado una activación conjunta durante el aprendizaje de secuencias motoras (Rauch et al., 1997; Shadmehr & Holcomb, 1997). También se ha reportado que contrario a otras estructuras, el estriado sigue estando activo incluso cuándo los sujetos experimentales han alcanzado una asíntota en la ejecución de una tarea motora como el laberinto acuático con clave (Doyon, Owen, Petrides, Sziklas, & Evans, 1996) es decir, su activación está presente en todo el proceso de consolidación de una memoria de procedimiento.

Uno de los aspectos a considerar en nuestros resultados es la influencia fisiológica del ejercicio físico, ya que se ha reportado que el ejercicio influye en la liberación de hormonas, siendo una de las más comunes los glucocorticoides (Tharp, 1975); por lo cual se comparó la distancia recorrida por las ratas entrenadas en el laberinto acuático con clave y las de nado, la cual no mostró diferencias estadísticamente significativas (Figura 21), descartando una influencia del ejercicio en los resultados obtenidos del Western blot.

Otro factor que considerar en la validación de los resultados fue la pureza de la fracción mitocondrial. Esta pudo corroborarse primeramente mediante el método de

fraccionamiento utilizado, el cual fue modificado del trabajo de Moutsatsou et al. (2001). Siguiendo el mismo protocolo de fraccionamiento, Du et al. (2009a) corroboraron la pureza de la fracción mitocondrial, al procesar la fracción mitocondrial con diferentes marcadores, en los que no encontraron marcaje de la proteína del poro nuclear, muy poco marcaje del marcador citosólico GADPH y un aumento de 900% en el marcaje de la proteína COX-1 en comparación al homogenado total.

Una segunda corroboración se realizó en el presente trabajo, ya que se tomaron micrografías de la fracción mitocondrial en el microscopio electrónico (Figura 22), en las cuáles se encontraron mitocondrias que fueron reconocidas por sus características de tamaño (1µm), la presencia de doble membrana y la forma globular que se ha encontrado en neuronas (Li et al., 2004; Nunnari & Suomalainen, 2012). Por lo cual se puede aseverar que la pureza de la fracción usada para el análisis de Western blot fue correcta.

En cuanto a los resultados del Western blot, se encontró un incremento significativo en la translocación del receptor a glucocorticoides en las mitocondrias del estriado a las 1.5 h después del entrenamiento en el laberinto acuático con clave, siendo diferentes en comparación contra el grupo intacto y el grupo de 6.0 h.

Estos resultados no coinciden con lo reportado por Demonacos et al. (1996), quienes encontraron que la translocación del GR en mitocondrias de células hepáticas se llevaba a cabo casi inmediatamente, teniendo un pico a los 5 min y disminuyendo a los 45 min. Sin embargo, si hay concordancia con resultados obtenidos por Du et al. (2009a), quienes estudiaron la dinámica de la translocación del GR en las mitocondrias de célula de cultivos de corteza cerebral a las 1.5, 24 y 72 horas después de la administración de corticosterona, encontrando que la expresión del GR en mitocondrias aumenta a las 1.5 horas y regresa a las concentraciones basales a las 24 horas, una disminución similar a lo que encontramos en el grupo sacrificado 6.0 horas después del entrenamiento en el presente trabajo.

Ahora bien, debe mencionarse que los resultados de Du et al. (2009a) fueron encontrados en cultivos celulares, en cambio, Moutsatsou et al. (2001) estudiaron la translocación del GR en mitocondrias de tejido ex vivo de hipocampo y corteza, encontrando también una temporalidad, al observar que a los 0 min después del sacrificio prácticamente no había presencia del GR en mitocondrias, contrario al grupo que se sacrificó a los 15 min, en dónde ya se encontraba una presencia considerable (Figura 18) dichos resultados apoyan la idea de que las neuronas tienen una dinámica temporal en cuanto al tiempo de translocación del GR en mitocondrias, cabe señalar que estos autores estudiaron la



translocación del receptor en ratas adrenalectomizadas a las cuáles se les administró corticosterona para emular la liberación basal de CORT, por lo cual sus resultados serían más comparables a nuestro grupo intacto, que no fue expuesto a ningún estrés y en el cual se encontraron niveles considerables de GR en mitocondrias. No puede ignorarse entonces la posibilidad de que la translocación del receptor está también asociada a procesos basales en la actividad celular y no solo a la respuesta ante el estrés y el entrenamiento en la tarea, además debe señalarse que el presente trabajo es el primero en que se mide la translocación del GR en mitocondrias de tejido *ex vivo* en un contexto de aprendizaje, por lo que las comparaciones previas deben considerarse con cierta moderación.

Por otro lado, las ratas del grupo de nado no presentaron un curso temporal en la translocación del GR en mitocondrias. De manera similar, no se encontraron diferencias significativas al comparar los niveles de GR en mitocondria del estriado de ratas del grupo entrenado en el laberinto acuático con clave en comparación con los del grupo de nado. Esto quiere decir que el entrenamiento en el laberinto acuático con clave no induce un aumento en los niveles de GR en mitocondrias del estriado en comparación al grupo de nado. Sin embargo, solamente los grupos entrenados en el laberinto acuático con clave tuvieron un curso temporal, lo que permite sugerir que, si bien no hay una mayor translocación del GR en mitocondrias del estriado durante ambos tratamientos, claramente el entrenamiento induce una temporalidad en el proceso, lo cual podría asociarlo a la dinámica celular durante la consolidación de una memoria de procedimiento.

Se ha demostrado que la actividad del GR se ve influenciada por modificaciones postraduccionales como la fosforilación (Ismaili & Garabedian, 2004; Wang, Frederick, & Garabedian, 2002), siendo la fosforilación en la serina 232 (serina 211 en humano) una de las modificaciones más relevantes en cuanto a la actividad del GR se refiere (Rogatsky, Waase, & Garabedian, 1998), la cual además ha demostrado ser dependiente del tiempo, al necesitar cerca de 1 h para inducir la translocación del GR en núcleos celulares (Wang et al., 2002). Esto fue corroborado en el contexto de los procesos de consolidación de la memoria (Pegueros Maldonado, 2015), en el que, mediante la técnica de inmunohistoquímica de fluorescencia, estudiamos la translocación del GR fosforilado en la serina 232 en núcleos de neuronas del estriado dorsal de ratas entrenadas bajo diferentes intensidades de choque en la tarea de evitación inhibitoria. Encontramos un aumento significativo en las células positivas al receptor fosforilado en las ratas que fueron entrenadas bajo la intensidad alta de choque, 1 hora después del entrenamiento. Esta

temporalidad es ciertamente similar al aumento a las 1.5 horas de los niveles de GR en mitocondrias que se encontró en este estudio, por lo que la fosforilación en la serina 232 podría estar relacionada con la translocación del GR en las mitocondrias.

En este contexto, Adzic, Djordjevic, Demonacos, Krstic-Demonacos y Radojicic (2009), estudiaron al GR fosforilado en diferentes sitios (Serina 232 y 246 así como treonina 171) en fracciones mitocondriales de hipocampo y corteza prefrontal después de someter a ratas un estrés crónico, agudo o combinado, encontrando la presencia de las tres formas fosforiladas del GR en ambos tipos neuronales, siendo el GR con la fosforilación en la serina 232 la que mostró mayores niveles. Considerando que el anticuerpo usado en este trabajo es para el GR total (H-300) y reconoce los aminoácidos 121-400 del receptor, sus formas fosforiladas también estarían siendo reconocidas en los Western blot de nuestros resultados, lo cual podría complementar el entendimiento del mecanismo de translocación del GR en mitocondrias, ya que la fosforilación en la serina 232 podría ser la señal que permite que el GR pase de su manera inactiva a formar un heterodímero con la proteína Bcl-2 para poder translocarse en las mitocondrias (Du et al., 2009a). Ahora bien, debe señalarse, que en el trabajo de Adzic et al. (2009) los animales fueron sacrificados inmediatamente después de someterlos a estrés, por lo que es posible que, en la respuesta ante el estrés, la translocación del GR en mitocondrias tanto de hipocampo como de corteza prefrontal se presente de manera más inmediata que en el estriado. Esto se ha observado en el contexto de consolidación de la memoria de tipo estímulo-respuesta y procedimiento en las que participa el estriado. Se ha reportado una activación temprana de distintas cortezas y el hipocampo, mientras que a medida que avanza el tiempo y la repetición de ensayos se denota una actividad mayor en el estriado (Chang & Gold, 2003; Doyon et al., 2009).

Por su parte, los resultados de la medición del potencial de membrana mediante la tinción con MitoTracker indicaron que el entrenamiento en el laberinto acuático con clave induce un curso temporal en el potencial de membrana mitocondrial, al tener un pico a las 1.5 horas que se mantiene incluso hasta 6 horas después del entrenamiento. Esto coincide con el trabajo realizado por Du et al. (2009a) en el cual también midieron el potencial de membrana mitocondrial en los cultivos de corteza cerebral que fueron tratados con corticosterona, encontrando que esta se potenciaba incluso a las 24 h del tratamiento.

El MitoTracker es un marcador del potencial de membrana mitocondrial, es decir se une a las mitocondrias que están energizadas. Durante la fosforilación oxidativa, los electrones se combinan con el oxígeno para permitir el flujo de energía a través de la mitocondria que

al estar energizadas permiten la producción de ATP, molécula crucial en las reacciones intracelulares dependientes de energía, como el transporte de electrones, la biosíntesis de neurotransmisores como el glutamato, el crecimiento de dendritas y la espinogénesis, además de las funciones de la actividad mitocondrial que se asocian a la activación de diferentes vías de señalización y el restablecimiento del potencial de membrana plasmática mediante el buffering de calcio, todos estos, factores esenciales en los cambios plásticos que ocurren en las neuronas y que se asocian a la consolidación de la memoria (Billups & Forsythe, 2002; Li et al., 2004; Picard & McEwen, 2014; Wallace, 2010). La señal del MitoTracker en los grupos de nado no mostró un curso temporal, lo que es similar a nuestros resultados del Western blot, en los cuales los niveles del GR tampoco se vieron afectados por el nado y las temporalidades de sacrificio, lo cual ciertamente no se podría atribuir a que las ratas de nado no están aprendiendo, pero si a la posibilidad de que estén procesando otro tipo de información y por lo cual la actividad neuronal en el estriado tenga demandas metabólicas diferentes.

En la comparación del potencial de membrana de los grupos entrenados en el laberinto acuático con clave y los de nado se encontraron diferencias significativas en la interacción de los tratamientos, siendo diferentes los grupos de la temporalidad de 6.0 horas después del entrenamiento, lo cual implica mayores niveles de potencial de membrana en las ratas entrenadas en el laberinto acuático con clave.

De manera interesante, solo los grupos entrenados en el laberinto acuático con clave mostraron un curso temporal tanto en los niveles de GR en mitocondria como en los de potencial de membrana mitocondrial, lo que asocia claramente a ambos procesos con la consolidación de esta tarea. Sin embargo, hay una diferencia clara en cuanto a la comparación entre la temporalidad de 1.5 horas y 6.0 horas después del entrenamiento de ambos experimentos, siendo los niveles de GR en mitocondria muy bajos a las 6.0 horas en comparación a los de 1.5 horas, lo cual no sucede con el potencial de membrana mitocondrial, el cual es igual a las 6.0 y 1.5 horas, siendo ambos diferentes de los grupos intacto y 0.5 horas. Esto sugiere que la potenciación de la actividad mitocondrial podría no deberse únicamente a la translocación del GR en las mitocondrias y que posiblemente dependa de otros factores.

Se ha demostrado conductualmente que la actividad mitocondrial no es solamente una activación cooperativa en la respuesta celular ante los procesos de aprendizaje, sino que es un factor primordial para que se lleve a cabo la formación de distintos tipos de memoria (Bennett & Rose, 1992; Liu et al., 2002; Roubertoux et al., 2003). Existen evidencias que

demuestran claramente que la administración de glucocorticoides provoca una facilitación, es decir una mejora sustancial en la consolidación de la memoria en diferentes tareas de memoria como el laberinto acuático con clave y la evitación inhibitoria (Medina et al., 2007; Quirarte et al., 2009) y se sabe que este efecto se debe en gran medida a la actividad del receptor a glucocorticoides que participa en la regulación de distintos aspectos de plasticidad neuronal (Nakabayashi et al., 2001; Itani et al., 2002; Rogatsky et al., 2003). Considerando esta evidencia, y los resultados discordantes en el curso temporal de la translocación del GR en mitocondrias y el potencial de membrana mitocondrial, es importante abordar la posibilidad de que la relación entre la actividad mitocondrial y los glucocorticoides no se debe solamente a la translocación del GR a la matriz mitocondrial, sino que es más bien un mecanismo de amplio espectro que concierne la interacción de diversas vías de señalización que tienen como resultado una influencia en la plasticidad neuronal y por tanto en la consolidación de la memoria. Visto de esta manera, la potenciación de la actividad mitocondrial producida por la administración de glucocorticoides en cultivos de corteza cerebral demostrada por Du y colaboradores en 2009 puede deberse a una conjunción de diversas vías de señalización que provienen de los efectos genómicas y no genómicos de los glucocorticoides (Stahn & Buttgereit, 2008) y de la actividad de las mitocondrias como vías de señalización (Chandel, 2014). Jeanneteau y Arango-Lievano (2016) proponen un modelo que conjunta algunas de estas interacciones y su importancia para la plasticidad sináptica. Estos autores consideran que uno de los procesos influenciados por la señalización cruzada entre las mitocondrias y el GR es la eliminación de sinapsis o pruning neuronal, este proceso es modulado en gran parte por la activación de enzimas denominadas caspasas, particularmente la caspasa 3, cuya activación es dependiente de las mitocondrias, que al aumentar su potencial de membrana mitocondrial liberan el transportador electrónico citocromo c, quien una vez en el citosol induce la activación de las caspasas (Colman, Costa, Chaves, & Tórtora, 2015; Li et al., 2010). A su vez el proceso de pruning es restringido a zonas particulares mediante la inhibición provocada por las proteínas de inhibición de la apoptosis (IAP, por sus siglas en inglés) cuya transcripción nuclear es influenciada por la activación del GR al translocarse al núcleo (Wu et al., 2004). Considerando que tanto los niveles del receptor a glucocorticoides en mitocondria como el potencial de membrana mitocondrial tuvieron un pico alto a las 1.5 horas, es posible que su convergencia funcional induzca el proceso plástico de eliminación de sinapsis en el estriado dorsal de las ratas entrenadas en el laberinto acuático con clave.

Otra posibilidad que considerar es que en la translocación del GR a mitocondrias tenga una función como centro de regulación de la actividad del receptor. Moutsatsou et al. (2001) reportaron la presencia de un GR con un menor peso molecular, resultados que los autores asociaron a un GR degradado, cuyos niveles, interesantemente parecen mayores en la fracción mitocondrial (Figura 23, señalado con la flecha inferior), por lo que no puede excluirse la posibilidad de que la translocación del GR en mitocondrias no solo participa en la potenciación de la actividad mitocondrial (Du et al., 2009a), sino que también en la modulación de los niveles de GR celulares y su función.

Por último, cabe señalar la evidencia de que la actividad mitocondrial también puede verse modulada por la translocación de una gran diversidad de factores moleculares entre los que se encuentran CREB y los receptores a cannabinoides (Hebert-Chatelain et al., 2016; Ryu, Lee, Impey, Ratan, & Ferrante, 2005), los cuales a su vez tienen vías cruzadas de señalización con el GR en procesos de consolidación de la memoria (Campolongo et al., 2009; Chen, Bambah-Mukku, Pollonini, & Alberini, 2012)

Si bien los resultados mostraron una relación de la translocación del GR en mitocondrias y el potencial de membrana mitocondrial con la consolidación de la memoria de procedimiento, son ciertamente la descripción de un primer panorama en la función de las mitocondrias en la consolidación de la memoria y su modulación por los glucocorticoides. La evidencia apunta a que este proceso tiene relevancia en la plasticidad neuronal y que es parte de una red de reacciones y vías de señalización cruzada que debe ser abordado con mayor profundidad, considerando factores como distintos sistemas de memoria, estructuras y mecanismos celulares.

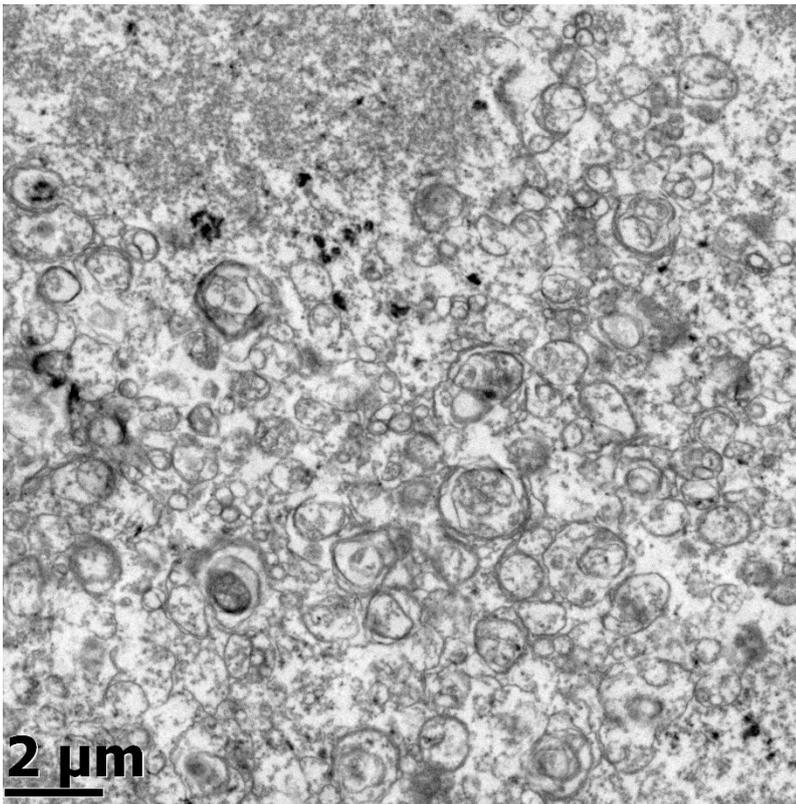
## 9. Conclusiones

- El entrenamiento en el laberinto acuático con clave induce un curso temporal en la translocación del receptor a glucocorticoides en las mitocondrias del estriado.
- El entrenamiento en el laberinto acuático con clave induce un curso temporal en el potencial de membrana mitocondrial del estriado dorsal.

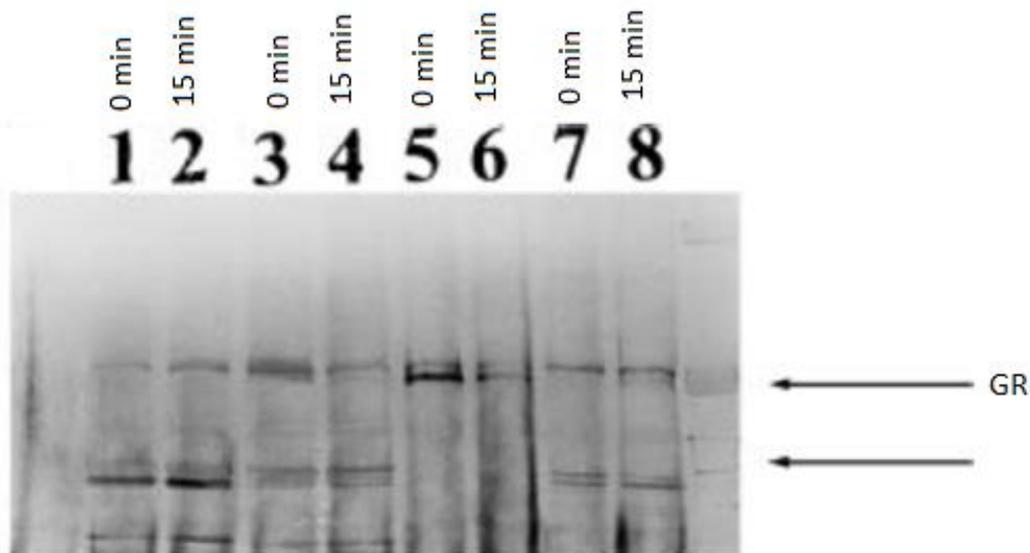
## 10. Perspectivas

- Estudiar si el proceso de translocación del GR en las mitocondrias durante la consolidación de una memoria se debe a la fosforilación.
- Estudiar qué genes del genoma mitocondrial se expresan durante la consolidación de una memoria.
- Estudiar más a fondo la asociación del GR y la proteína BCL-2 durante la consolidación de una memoria.
- Estudiar la relación del GR con otros procesos de actividad mitocondrial como la dinámica del calcio y la oxidación.
- Estudiar la relación de la translocación del GR con la actividad mitocondrial en otras estructuras cerebrales y con otros paradigmas conductuales.

## 11. Anexo- Figuras



**Figura 24.** Micrografía tomada en el microscopio electrónico de la fracción mitocondrial usada para el análisis de Western blot. Nótese ...



**Figura 25.** Las líneas pares representan los niveles de GR a los 15 minutos después de administración de CORT, mientras las líneas impares representan los niveles de GR a los 0 minutos. Las líneas 1 y 2 representan los niveles de GR en la fracción mitocondrial, 3 y 4 en la fracción sinaptosomal, 5 y 6 en la fracción citosólica, mientras 7 y 8 en la fracción nuclear. La flecha inferior marca el peso molecular de la proteína receptor a glucocorticoides, la flecha inferior representa el GR con una proteína de menor peso. Modificado de Moutsatsou et al. (2001).

## 12. Referencias

- Adcock, I. M. (2000). Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 13(3), 115-126. doi: 10.1006/pupt.2000.0243
- Adzic, M., Djordjevic, A., Demonacos, C., Krstic-Demonacos, M., & Radojic, M. B. (2009). The role of phosphorylated glucocorticoid receptor in mitochondrial functions and apoptotic signalling in brain tissue of stressed Wistar rats. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(11), 2181-2188. doi: 10.1016/j.biocel.2009.04.001
- Arboleda, G., & Sánchez, R. M. (2008). Mitochondria y muerte celular. *NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas* 6(10), 11. doi: 10.22490/24629448.409
- Arciniegas, D. B., Wortzel, H. S., & Frey, K. L. (2013). Rehabilitation and pharmacotherapy of cognitive impairments. En D. B. Arciniegas, C. A. Anderson & C. M. Filley (Eds.), *Behavioral Neurology and Neuropsychiatry*. (pp. 5111-5542). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Balas, M., Netser, S., Giladi, N., & Karni, A. (2007). Interference to consolidation phase gains in learning a novel movement sequence by handwriting: dependence on laterality and the level of experience with the written sequence. *Experimental Brain Research*, 180(2), 237-246. doi: 10.1007/s00221-007-0851-1
- Balleine, B. W., Delgado, M. R., & Hikosaka, O. (2007). The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. *The Journal of Neuroscience*, 27(31), 8161-8165. doi: 10.1523/jneurosci.1554-07.2007
- Barnes, T. D., Kubota, Y., Hu, D., Jin, D. Z., & Graybiel, A. M. (2005). Activity of striatal neurons reflects dynamic encoding and recoding of procedural memories. *Nature*, 437(7062), 1158-1161. doi: 10.1038/nature04053
- Bartosz, G. (2009). Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochemical Pharmacology*, 77(8), 1303-1315. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.11.009>
- Bennett, M. C., & Rose, G. M. (1992). Chronic sodium azide treatment impairs learning of the Morris water maze task. *Behavioral and Neural Biology*, 58(1), 72-75. doi: 10.1016/0163-1047(92)90967-9
- Billups, B., & Forsythe, I. D. (2002). Presynaptic mitochondrial calcium sequestration influences transmission at mammalian central synapses. *The Journal of Neuroscience*, 22(14), 5840-5847.
- Bindokas, V. P., Lee, C. C., Colmers, W. F., & Miller, R. J. (1998). Changes in mitochondrial function resulting from synaptic activity in the rat hippocampal slice. *The Journal of Neuroscience*, 18(12), 4570-4587.
- Bledsoe, R. K., Montana, V. G., Stanley, T. B., Delves, C. J., Apolito, C. J., McKee, D. D., . . . Xu, H. E. (2002). Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell*, 110(1), 93-105. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00817-6
- Bolam, J. P., Hanley, J. J., Booth, P. A., & Bevan, M. D. (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of Anatomy*, 196 ( Pt 4), 527-542. doi: 10.1046/j.1469-7580.2000.19640527.x
- Bolam, J. P., Izzo, P. N., & Graybiel, A. M. (1988). Cellular substrate of the histochemically defined striosome/matrix system of the caudate nucleus: a combined Golgi and immunocytochemical study in cat and ferret. *Neuroscience*, 24(3), 853-875. doi: 10.1016/0306-4522(88)90073-5
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3



- Brog, J. S., Salyapongse, A., Deutch, A. Y., & Zahm, D. S. (1993). The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *The Journal of Comparative Neurology*, 338(2), 255-278. doi: 10.1002/cne.903380209
- Calabresi, P., Gubellini, P., Picconi, B., Centonze, D., Pisani, A., Bonsi, P., . . . Bernardi, G. (2001). Inhibition of mitochondrial complex II induces a long-term potentiation of NMDA-mediated synaptic excitation in the striatum requiring endogenous dopamine. *The Journal of Neuroscience*, 21(14), 5110-5120.
- Campolongo, P., Roozendaal, B., Trezza, V., Hauer, D., Schelling, G., McGaugh, J. L., & Cuomo, V. (2009). Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4888-4893. doi: 10.1073/pnas.0900835106
- Cato, A. C. B., & Mink, S. (2001). BAG-1 family of cochaperones in the modulation of nuclear receptor action. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 78(5), 379-388. doi: 10.1016/S0960-0760(01)00114-5
- Cohen, M. D., & Bacdayan, P. (1994). Organizational routines are stored as procedural memory: Evidence from a laboratory study. *Organization Science*, 5(4), 554-568.
- Colman, V., Costa, E., Chaves, R., & Tórtora, V. (2015). Roles biológicos del citocromo c: transporte electrónico mitocondrial, muerte celular programada y ganancia de actividad peroxidática. *Anales de la Facultad de Medicina*, 2(12), 59-70.
- Colombini, M. (2009). The published 3D structure of the VDAC channel: native or not? *Trends in Biochemical Sciences*, 34(8), 382-389. doi: 10.1016/j.tibs.2009.05.001
- Cornett, L. E., Hiller, F. C., Jacobi, S. E., Cao, W., & McGraw, D. W. (1998). Identification of a glucocorticoid response element in the rat beta2-adrenergic receptor gene. *Molecular Pharmacology*, 54(6), 1016-1023. doi: 10.1124/mol.54.6.1016
- Čvoro, A., Dundjerski, J., Trajković, D., & Matić, G. (1998). Association of the rat liver glucocorticoid receptor with Hsp90 and Hsp70 upon whole body hyperthermic stress. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 67(4), 319-325. doi: 10.1016/S0960-0760(98)00103-4
- Chandel, N. S. (2014). Mitochondria as signaling organelles. *BMC Biology*, 12, 34-34. doi: 10.1186/1741-7007-12-34
- Chang, Q., & Gold, P. E. (2003). Switching memory systems during learning: changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. *The Journal of Neuroscience*, 23(7), 3001-3005.
- Chauhan, S., Leach, C. H., Kunz, S., Bloom, J. W., & Miesfeld, R. L. (2003). Glucocorticoid regulation of human eosinophil gene expression. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 84(4), 441-452. doi: 10.1016/S0960-0760(03)00065-7
- Chen, D. Y., Bambah-Mukku, D., Pollonini, G., & Alberini, C. M. (2012). Glucocorticoid receptors recruit the CaMKIIalpha-BDNF-CREB pathways to mediate memory consolidation. *Nature Neuroscience*, 15(12), 1707-1714. doi: 10.1038/nn.3266
- Cheng, A., Hou, Y., & Mattson, M. P. (2010). Mitochondria and neuroplasticity. *ASN Neuro*, 2(5), AN20100019. doi: 10.1042/an20100019
- Chrousos, G. P., & Gold, P. W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *The Journal of the American Medical Association*, 267(9), 1244-1252. doi: 10.1001/jama.1992.03480090092034
- Davies, T. H., Ning, Y. M., & Sanchez, E. R. (2002). A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 4597-4600. doi: 10.1074/jbc.C100531200

- Day, J. J., Roitman, M. F., Wightman, R. M., & Carelli, R. M. (2007). Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine signaling in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*, *10*(8), 1020-1028. doi: 10.1038/nn1923
- Day, M., Wang, Z., Ding, J., An, X., Ingham, C. A., Shering, A. F., . . . Surmeier, D. J. (2006). Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nature Neuroscience*, *9*(2), 251-259. doi: 10.1038/nn1632
- de Kloet, E. R. (1991). *Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control*. Raven Press.
- de Kloet, E. R., Joels, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(6), 463-475. doi: 10.1038/nrn1683
- De Leonibus, E., Oliverio, A., & Mele, A. (2005). A study on the role of the dorsal striatum and the nucleus accumbens in allocentric and egocentric spatial memory consolidation. *Learning & Memory*, *12*(5), 491-503. doi: 10.1101/lm.94805
- Demonacos, C. V., Karayanni, N., Hatzoglou, E., Tsiriyiotis, C., Spandidos, D. A., & Sekeris, C. E. (1996). Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones. *Steroids*, *61*(4), 226-232. doi: 10.1016/0039-128X(96)00019-0
- Doyon, J. (2008). Motor sequence learning and movement disorders. *Current Opinion in Neurology*, *21*(4), 478-483. doi: 10.1097/WCO.0b013e328304b6a3
- Doyon, J., Bellec, P., Amsel, R., Penhune, V., Monchi, O., Carrier, J., . . . Benali, H. (2009). Contributions of the basal ganglia and functionally related brain structures to motor learning. *Behavioural Brain Research*, *199*(1), 61-75. doi: 10.1016/j.bbr.2008.11.012
- Doyon, J., Owen, A. M., Petrides, M., Sziklas, V., & Evans, A. C. (1996). Functional anatomy of visuomotor skill learning in human subjects examined with positron emission tomography. *European Journal of Neuroscience*, *8*(4), 637-648. doi: 10.1111/j.1460-9568.1996.tb01249.x
- Doyon, J., & Ungerleider, L. G. (2002). Functional anatomy of motor skill learning. En *Neuropsychology of memory*, 3rd ed. (pp. 225-238). New York, NY, US: Guilford Press.
- Du, J., McEwen, B., & Manji, H. K. (2009a). Glucocorticoid receptors modulate mitochondrial function: A novel mechanism for neuroprotection. *Communicative & Integrative Biology*, *2*(4), 350-352.
- Du, J., Wang, Y., Hunter, R., Wei, Y., Blumenthal, R., Falke, C., . . . Manji, H. K. (2009b). Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(9), 3543-3548. doi: 10.1073/pnas.0812671106
- Dudai, Y. (2002). *Memory from A to Z: keywords, concepts and beyond*. Oxford: Oxford University Press.
- 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
- Filipović, D., Gavrilović, L., Dronjak, S., & Radojčić, M. B. (2005). Brain glucocorticoid receptor and heat shock protein 70 levels in rats exposed to acute, chronic or combined stress. *Neuropsychobiology*, *51*(2), 107-114. doi: 10.1159/000084168
- Fujiyama, F., Unzai, T., Nakamura, K., Nomura, S., & Kaneko, T. (2006). Difference in organization of corticostriatal and thalamostriatal synapses between patch and matrix compartments of rat neostriatum. *The European Journal of Neuroscience*, *24*(10), 2813-2824. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05177.x
- Gerfen, C. R. (1984). The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature*, *311*(5985), 461-464. doi: 10.1038/311461a0

- Gerfen, C. R. (1985). The neostriatal mosaic. I. Compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 236(4), 454-476. doi: 10.1002/cne.902360404
- Gerfen, C. R. (1992). The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, 15, 285-320. doi: 10.1146/annurev.ne.15.030192.001441
- Goshen-Gottstein, Y. (2003). Learning and memory. En *Encyclopedia of the life sciences*. (pp. 1-6): John Wiley & Sons, Ltd.
- Graybiel, A. M., Baughman, R. W., & Eckenstein, F. (1986). Cholinergic neuropil of the striatum observes striosomal boundaries. *Nature*, 323(6089), 625-627. doi: 10.1038/323625a0
- Graybiel, A. M., & Ragsdale, C. W. (1978). Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(11), 5723-5726. doi: 10.1073/pnas.75.11.5723
- Gruver-Yates, A. L., & Cidlowski, J. A. (2013). Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: A double-edged sword. *Cells*, 2(2), 202-223. doi: 10.3390/cells2020202
- Hara, Y., Yuk, F., Puri, R., Janssen, W. G. M., Rapp, P. R., & Morrison, J. H. (2014). Presynaptic mitochondrial morphology in monkey prefrontal cortex correlates with working memory and is improved with estrogen treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 486-491. doi: 10.1073/pnas.1311310110
- Hebert-Chatelain, E., Desprez, T., Serrat, R., Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Busquets-Garcia, A., . . . Marsicano, G. (2016). A cannabinoid link between mitochondria and memory. *Nature*, 539(7630), 555-559. doi: 10.1038/nature20127
- Heck, S., Kullmann, M., Gast, A., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J., Herrlich, P., & Cato, A. C. (1994). A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *The EMBO Journal*, 13(17), 4087-4095.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776. doi:10.1038/35037710
- Herkenham, M., & Pert, C. B. (1981). Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature*, 291(5814), 415-418. doi: 10.1038/291415a0
- Hilario, M. R., Clouse, E., Yin, H. H., & Costa, R. M. (2007). Endocannabinoid signaling is critical for habit formation. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 1, 6. doi: 10.3389/neuro.07.006.2007
- Hilgard, E. R., & Bower, G. H. (1987). *Teorías del aprendizaje*. (10<sup>ma</sup> ed.) México: Trillas.
- Hollis, F., van der Kooij, M. A., Zanoletti, O., Lozano, L., Cantó, C., & Sandi, C. (2015). Mitochondrial function in the brain links anxiety with social subordination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(50), 15486-15491. doi: 10.1073/pnas.1512653112
- 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
- Itani, O. A., Liu, K. Z., Cornish, K. L., Campbell, J. R., & Thomas, C. P. (2002). Glucocorticoids stimulate human sgk1 gene expression by activation of a GRE in its 5'-flanking region. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 283(5), E971-979. doi: 10.1152/ajpendo.00021.2002

- Izquierdo, I., Barros, D. M., Mello e Souza, T., de Souza, M. M., Izquierdo, L. A., & Medina, J. H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature*, 393(6686), 635-636. doi: 10.1038/31371
- Jeanneteau, F., & Arango-Lievano, M. (2016). Linking mitochondria to synapses: New insights for stress-related neuropsychiatric disorders. *Neural Plasticity*, 2016, 3985063. doi: 10.1155/2016/3985063
- Jefferys, D., Copolov, D., Irby, D., & Funder, J. (1983). Behavioural effect of adrenalectomy: Reversal by glucocorticoids or [D-ALA<sup>2</sup>, MET<sup>5</sup>]enkephalinamide. *European Journal of Pharmacology*, 92(1-2), 99-103. doi: 10.1016/0014-2999(83)90113-9
- Joëls, M., Pu, Z. W., Wiegert, O., Oitzl, M. S., & Krugers, H. J. (2006). Learning under stress: How does it work? *Trends in Cognitive Sciences*, 10(4), 152-158. doi: 10.1016/j.tics.2006.02.002
- Karbowski, M., & Youle, R. J. (2003). Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 10(8), 870-880. doi: 10.1038/sj.cdd.4401260
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J., & Emson, P. C. (1995). Striatal interneurons: Chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neurosciences*, 18(12), 527-535. doi: 10.1016/0166-2236(95)98374-8
- Kincaid, A. E., & Wilson, C. J. (1996). Corticostriatal innervation of the patch and matrix in the rat neostriatum. *The Journal of Comparative Neurology*, 374(4), 578-592. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19961028)374:4<578::AID-CNE7>3.0.CO;2-Z
- Knott, A. B., Perkins, G., Schwarzenbacher, R., & Bossy-Wetzel, E. (2008). Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 9, 505. doi: 10.1038/nrn2417
- Kreitzer, A. C. (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 127-147. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135422.
- Kroll, S., El-Gindi, J., Thanabalasundaram, G., Panpumthong, P., Schrot, S., Hartmann, C., & Galla, H. J. (2009). Control of the blood-brain barrier by glucocorticoids and the cells of the neurovascular unit. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165, 228-239. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04040.x
- Kumar, R., & Calhoun, W. J. (2008). Differential regulation of the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through site-specific phosphorylation. *Biologics : Targets & Therapy*, 2(4), 845-854. doi: 10.2147/BTT.S3820
- Li, Z., Jo, J., Jia, J.-M., Lo, S.-C., Whitcomb, D. J., Jiao, S., . . . Sheng, M. (2010). Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. *Cell*, 141(5), 859-871. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.053
- Li, Z., Okamoto, K.-I., Hayashi, Y., & Sheng, M. (2004). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell*, 119(6), 873-887. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.003
- Liesa, M., Palacín, M., & Zorzano, A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiological Reviews*, 89(3), 799-845. doi: 10.1152/physrev.00030.2008
- Liu, J., Head, E., Gharib, A. M., Yuan, W., Ingersoll, R. T., Hagen, T. M., . . . Ames, B. N. (2002). Memory loss in old rats is associated with brain mitochondrial decay and RNA/DNA oxidation: Partial reversal by feeding acetyl-L-carnitine and/or R- $\alpha$ -lipoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 2356-2361. doi: 10.1073/pnas.261709299
- Lodish, H. (2006). *Biología celular y molecular*. Madrid: Médica Panamericana.
- Lozano, Y. R., Serafín, N., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B., & Quirarte, G. L. (2013). Glucocorticoids in the dorsomedial striatum modulate the consolidation of spatial but

- not procedural memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 101, 55-64. doi: 10.1016/j.nlm.2013.01.001
- Lu, N. Z., Collins, J. B., Grissom, S. F., & Cidlowski, J. A. (2007). Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 27(20), 7143-7160. doi: 10.1128/MCB.00253-07
- Macedo-Marquez, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2), 97-103.
- Maldonado Bouchard, S., & Hook, M. A. (2014). Psychological stress as a modulator of functional recovery following spinal cord injury. *Frontiers in Neurology*, 5, 44. doi: 10.3389/fneur.2014.00044
- McCormack, J. G., Halestrap, A. P., & Denton, R. M. (1990). Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiological Reviews*, 70(2), 391-425.
- McDonald, R. J., Hong, N. S., & Devan, B. D. (2004). The challenges of understanding mammalian cognition and memory-based behaviours: an interactive learning and memory systems approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28(7), 719-745. doi: 10.1016/j.neubiorev.2004.09.014
- McGaugh, J. L. (1983). Hormonal influences on memory. *Annual Review of Psychology*, 34, 297-323. doi: 10.1146/annurev.ps.34.020183.001501
- McGaugh, J. L., & Roozendaal, B. (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(2), 205-210. doi: 10.1016/S0959-4388(02)00306-9
- McGeorge, A. J., & Faull, R. L. (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*, 29(3), 503-537. doi: 10.1016/0306-4522(89)90128-0
- 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
- Miller, K. E., & Sheetz, M. P. (2004). Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *Journal of Cell Science*, 117(13), 2791-2804. doi: 10.1242/jcs.01130
- Morava, É., & Kozicz, T. (2013). Mitochondria and the economy of stress (mal)adaptation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(4), 668-680. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.02.005
- Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K., & Kawata, M. (1996). Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience Research*, 26(3), 235-269. doi: 10.1016/S0168-0102(96)01105-4
- Moutsatsou, P., Psarra, A. M. G., Tsiapara, A., Paraskevaku, H., Davaris, P., & Sekeris, C. E. (2001). Localization of the glucocorticoid receptor in rat brain mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 386(1), 69-78. doi: <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2162>
- Nakabayashi, H., Koyama, Y., Sakai, M., Li, H. M., Wong, N. C., & Nishi, S. (2001). Glucocorticoid stimulates primate but inhibits rodent alpha-fetoprotein gene promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287(1), 160-172. doi: 10.1006/bbrc.2001.5564
- National Research Council. (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals*. (8th ed.) Washington DC: National Academy of Sciences.

- Nelson, D., & Cox, M. (2004). *Lehninger principles of biochemistry*. (4th edition ed.): W. H. Freeman.
- Nicola, S. M. (2007). The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. *Psychopharmacology (Berl)*, 191(3), 521-550. doi: 10.1007/s00213-006-0510-4
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. (2001). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, Resumen, 65. México: SENASICA.
- Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell*, 148(6), 1145-1159. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.035
- Olson, K. L., Marc, D. T., Grude, L. A., McManus, C. J., & Kellermann, G. H. (2011). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: The actions of the central nervous system and potential biomarkers En R. Klatz & R. Goldman (Eds.), *Anti-aging therapeutics Volume XIII*. (pp. 91-100). Chicago, IL USA: American Academy of Anti-Aging Medicine.
- Packard, M. G., & McGaugh, J. L. (1992). Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: Further evidence for multiple memory systems. *Behavioral Neuroscience*, 106(3), 439-446. doi: 10.1037/0735-7044.106.3.439
- Paxinos, G., & Watson, C. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. (4th ed.) San Diego: Academic Press.
- Pegueros Maldonado, R. (2015). *Efecto de diferentes niveles de aprendizaje sobre el receptor a glucocorticoides fosforilado en el caudado-putamen de rata* (Tesis de Licenciatura en Biología). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla.
- Picard, M., Juster, R. P., & McEwen, B. S. (2014). Mitochondrial allostatic load puts the 'gluc' back in glucocorticoids. *Nature Reviews. Endocrinology*, 10(5), 303-310. doi: 10.1038/nrendo.2014.22
- Picard, M., & McEwen, B. S. (2014). Mitochondria impact brain function and cognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 7-8. doi: 10.1073/pnas.1321881111
- Ploeger, G. E., Spruijt, B. M., & Cools, A. R. (1994). Spatial localization in the Morris water maze in rats: Acquisition is affected by intra-accumbens injections of the dopaminergic antagonist haloperidol. *Behavioral Neuroscience*, 108(5), 927-934. doi: 10.1037/0735-7044.108.5.927
- Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B. S., & Sanacora, G. (2012). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(1), 22-37. doi: 10.1038/nrn3138.
- Popov, V., Medvedev, N. I., Davies, H. A., & Stewart, M. G. (2005). Mitochondria form a filamentous reticular network in hippocampal dendrites but are present as discrete bodies in axons: A three-dimensional ultrastructural study. *The Journal of Comparative Neurology*, 492(1), 50-65. doi: 10.1002/cne.20682
- Psarra, A.-M. G., & Sekeris, C. E. (2011). Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells: Role of the mitochondrial glucocorticoid receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(10), 1814-1821. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.05.014
- Quirarte, G. L., de la Teja, I. S., Casillas, M., Serafín, N., Prado-Alcalá, R. A., & Roozendaal, B. (2009). Corticosterone infused into the dorsal striatum selectively enhances memory consolidation of cued water-maze training. *Learning & Memory* 16(10), 586-589.

- Rauch, S. L., Whalen, P. J., Savage, C. R., Curran, T., Kendrick, A., Brown, H. D., . . . Rosen, B. R. (1997). Striatal recruitment during an implicit sequence learning task as measured by functional magnetic resonance imaging. *Human Brain Mapping, 5*(2), 124-132. doi: 10.1002/(SICI)1097-0193(1997)5:2<124::AID-HBM6>3.0.CO;2-5
- Reber, P. J. (2013). The neural basis of implicit learning and memory: A review of neuropsychological and neuroimaging research. *Neuropsychologia, 51*(10), 2026-2042. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2013.06.019
- Redolar-Ripoll, D. (2012). Consolidación de la memoria y sustrato nervioso del refuerzo. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento, 4*, 51-74.
- Rizzuto, R., Bernardi, P., & Pozzan, T. (2000). Mitochondria as all-round players of the calcium game. *The Journal of Physiology, 529*(1), 37-47. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00037.x
- Robin, E. D., & Wong, R. (1988). Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology, 136*(3), 507-513. doi: 10.1002/jcp.1041360316
- Rodríguez, J. I. (2006). La mitocondria: ¿células dentro de células? En P. J. Patiño (Ed.), *Biología de la célula*. Colombia: Fondo Editorial Biogénesis
- Rogatsky, I., Waase, C. L., & Garabedian, M. J. (1998). Phosphorylation and inhibition of rat glucocorticoid receptor transcriptional activation by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). Species-specific differences between human and rat glucocorticoid receptor signaling as revealed through GSK-3 phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry, 273*(23), 14315-14321. doi: 10.1074/jbc.273.23.14315
- Rogatsky, I., Wang, J. C., Derynck, M. K., Nonaka, D. F., Khodabakhsh, D. B., Haqq, C. M., . . . Yamamoto, K. R. (2003). Target-specific utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100*(24), 13845-13850. doi: 10.1073/pnas.2336092100
- Roosendaal, B., & McGaugh, J. L. (1997). Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. *Neurobiology of Learning and Memory, 67*(2), 176-179. doi: 10.1006/nlme.1996.3765
- Roosendaal, B., & McGaugh, J. L. (2011). Memory modulation. *Behavioral Neuroscience, 125*(6), 797-824. doi: 10.1037/a0026187
- Roosendaal, B., McReynolds, J. R., Van der Zee, E. A., Lee, S., McGaugh, J. L., & McIntyre, C. K. (2009). Glucocorticoid effects on memory consolidation depend on functional interactions between the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala. *The Journal of Neuroscience, 29*(45), 14299-14308. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3626-09.2009
- Roubertoux, P. L., Sluyter, F., Carlier, M., Marcet, B., Maarouf-Veray, F., Cherif, C., . . . Cohen-Salmon, C. (2003). Mitochondrial DNA modifies cognition in interaction with the nuclear genome and age in mice. *Nature Genetics, 35*(1), 65-69. doi: 10.1038/ng1230
- Roulet, P., Sargolini, F., Oliverio, A., & Mele, A. (2001). NMDA and AMPA antagonist infusions into the ventral striatum impair different steps of spatial information processing in a nonassociative task in mice. *The Journal of Neuroscience, 21*(6), 2143-2149.
- Rowland, K. C., Irby, N. K., & Spirou, G. A. (2000). Specialized synapse-associated structures within the calyx of Held. *The Journal of Neuroscience, 20*(24), 9135-9144.
- Rye, B. D., Turner, R. S., Vitek, J. L., Bakay, R. A. E., Crutcher, M. D., & DeLong, M. R. (1996). Anatomical investigations of the pallidotegmental pathway in monkey and

- men. En C. Ohye, M. Kimura & J. S. McKenzie (Eds.), *The basal ganglia V.* (pp. 59-77). New York: SPRINGER SCIENCE+BUSINESS MEDIA, LLC
- Ryu, H., Lee, J., Impey, S., Ratan, R. R., & Ferrante, R. J. (2005). Antioxidants modulate mitochondrial PKA and increase CREB binding to D-loop DNA of the mitochondrial genome in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(39), 13915-13920. doi: 10.1073/pnas.0502878102
- Sandi, C. (2003). Implicacion de los glucocorticoides en la consolidacion de la memoria. *Revista de Neurologia*, *37*(9), 843-848.
- Schacter, D. L., & Tulving, E. (1994). Priming and multiple memory systems: Perceptual mechanisms of implicit memory. En D. L. Schacter & E. Tulving (Eds.), *Memory systems*. Massachusetts Institute of Technology.
- Schultz, W. (2007). Behavioral dopamine signals. *Trends in Neurosciences*, *30*(5), 203-210. doi: 10.1016/j.tins.2007.03.007
- Sekiguchi, Y., Fukushima, N., Yokouchi, K., Kawagishi, K., Hirayama, S., & Moriizumi, T. (2012). Functional correlation between olfaction and various sectioning of the lateral olfactory tract. *Neuroscience Research*, *73*(1), 17-23. doi: 10.1016/j.neures.2012.02.006
- Shadmehr, R., & Holcomb, H. H. (1997). Neural correlates of motor memory consolidation. *Science*, *277*(5327), 821-825. doi: 10.1126/science.277.5327.821
- Simamura, E., Shimada, H., Hatta, T., & Hirai, K.-I. (2008). Mitochondrial voltage-dependent anion channels (VDACs) as novel pharmacological targets for anti-cancer agents. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *40*(3), 213-217. doi: 10.1007/s10863-008-9158-6
- Smith, Y., Bevan, M. D., Shink, E., & Bolam, J. P. (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*, *86*(2), 353-387. doi: 10.1016/S0306-4522(98)00004-9
- Soriano-Mas, C., & Guillazo-Blanch, G. (2007). *Fundamentos de neurociencia*. Editorial UOC, S.L.
- Squire, L. R. (1987). *Memory and brain*. New York: Oxford University Press.
- Squire, L. R., & Alvarez, P. (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: A neurobiological perspective. *Current Opinion in Neurobiology*, *5*(2), 169-177. doi: 10.1016/0959-4388(95)80023-9
- Squire, L. R., & Knowlton, B. J. (1995). The organization of memory. En H. Morowitz & J. Singer (Eds.), *The Mind, the Brain, and Complex Adaptive Systems*. (pp. 63-97). Reading, MA: Addison-Wesley.
- Stahn, C., & Buttgerit, F. (2008). Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nature Reviews Rheumatology*, *4*(10), 525-533. doi: 10.1038/ncprheum0898
- Suen, D.-F., Norris, K. L., & Youle, R. J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes & Development*, *22*(12), 1577-1590. doi: 10.1101/gad.1658508
- Taanman, J.-W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1410*(2), 103-123. doi: 10.1016/S0005-2728(98)00161-3
- Tan, H. Y., Chen, Q., Sust, S., Buckholtz, J. W., Meyers, J. D., Egan, M. F., . . . Callicott, J. H. (2007). Epistasis between catechol-O-methyltransferase and type II metabotropic glutamate receptor 3 genes on working memory brain function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(30), 12536-12541. doi: 10.1073/pnas.0610125104
- Tepper, J. M., & Bolam, J. P. (2004). Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current Opinion in Neurobiology*, *14*(6), 685-692. doi: 10.1016/j.conb.2004.10.003



- Tharp, G. D. (1975). The role of glucocorticoids in exercise. *Medicine and Science in Sports*, 7(1), 6-11.
- Turrens, J. F. (1997). Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain. *Bioscience Reports*, 17(1), 3-8. doi: 10.1023/a:1027374931887
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., . . . Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102(1), 43-53. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00009-X
- Voorn, P., Vanderschuren, L., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., & Pennartz, C. M. A. (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences*, 27(8), 468-474. doi: 10.1016/j.tins.2004.06.006
- Wallace, D. C. (2010). Bioenergetics, the origins of complexity, and the ascent of man. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(Supplement 2), 8947-8953. doi: 10.1073/pnas.0914635107
- 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
- White, N. M. (1989). A functional hypothesis concerning the striatal matrix and patches: mediation of S-R memory and reward. *Life Sciences*, 45(21), 1943-1957. doi: 10.1016/0024-3205(89)90569-9
- Wu, W., Chaudhuri, S., Brickley, D. R., Pang, D., Karrison, T., & Conzen, S. D. (2004). Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Research*, 64(5), 1757-1764. doi: 10.1158/0008-5472.can-03-2546
- Yamamoto, K. R. (1985). Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annual Review of Genetics*, 19, 209-252. doi: 10.1146/annurev.ge.19.120185.001233
- Yin, H. H., & Knowlton, B. J. (2004). Contributions of striatal subregions to place and response learning. *Learning & Memory*, 11(4), 459-463. doi: 10.1101/lm.81004
- Yin, H. H., Knowlton, B. J., & Balleine, B. W. (2004). Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. *The European Journal of Neuroscience*, 19(1), 181-189. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03095.x
- Yin, H. H., Knowlton, B. J., & Balleine, B. W. (2005). Blockade of NMDA receptors in the dorsomedial striatum prevents action-outcome learning in instrumental conditioning. *The European Journal of Neuroscience*, 22(2), 505-512. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04219.x
- Zhou, F. M., Wilson, C. J., & Dani, J. A. (2002). Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *Journal of Neurobiology*, 53(4), 590-605. doi: 10.1002/neu.10150