



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

EFFECTO DEL ENTRENAMIENTO MODERADO E INCREMENTADO EN
LA TAREA DE EVITACIÓN INHIBITORIA SOBRE LA FOSFORILACIÓN
DE CREB EN EL HIPOCAMPO DORSAL DE RATAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

PRESENTA

HANOI IVÁN GUILLERMO MONTIEL

DIRECTOR: DR. ROBERTO AGUSTÍN PRADO ALCALÁ

REVISOR: DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO

Ciudad Universitaria, Ciudad de México 2018



**Facultad
de Psicología**



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).

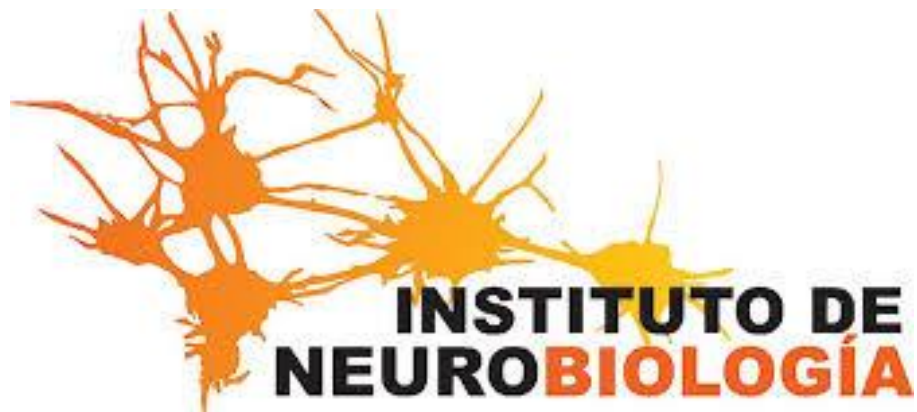
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

RESUMEN

Se ha encontrado que los tratamientos que típicamente producen amnesia se vuelven inocuos cuando los animales son sometidos a un entrenamiento incrementado en la tarea de evitación inhibitoria (EI). Este efecto ha sido observado con la administración de fármacos como la tetrodotoxina (TTX, que produce una inactivación temporal de los canales de sodio), con bloqueadores de receptores a neurotransmisores y con inhibidores de la síntesis de proteínas (ISP). Los mecanismos neurobiológicos que pudieran estar implicados en la consolidación de este tipo de memoria son desconocidos. Se sabe que la proteína de unión al elemento de respuesta al adenosín monofosfato cíclico fosforilada en la serina 133 (pCREB) participa en la consolidación de la memoria. El objetivo de esta tesis fue encontrar evidencia de la participación de pCREB en la consolidación de la memoria de un entrenamiento moderado e incrementado. Se entrenaron a grupos independientes de ratas con 0.0, 1.0 y 3.0 mA en la tarea de EI con la finalidad de determinar cuál choque eléctrico produce un entrenamiento moderado e incrementado a partir de una curva de extinción. Los resultados conductuales indican que el grupo entrenado con 1.0 mA muestra una resistencia a la extinción menor en comparación al grupo entrenado con 3.0 mA, permitiendo considerarlos como entrenamiento moderado e incrementado, respectivamente. Posteriormente, para establecer si la proporción de núcleos pCREB positivos en el giro dentado (GD) y en el cuerno de Amón (CA1 y CA3) del hipocampo dorsal es diferente según la intensidad de entrenamiento, otros grupos independientes de ratas fueron entrenados con las mismas intensidades de choque agregándose un grupo al que sólo se le administró el choque eléctrico más alto (SCh) y otro grupo que permaneció en el bioterio (Bio). Cada uno de los grupos de ratas fueron sacrificados una hora después del entrenamiento en la tarea de EI para la detección con inmunohistoquímica de pCREB. Los resultados muestran que el entrenamiento moderado induce un aumento en la proporción de núcleos pCREB positivos en el GD y en el área CA1, sin embargo, este aumento es mayor cuando el entrenamiento es incrementado. En el área CA3 se encontró que el entrenamiento incrementado induce una mayor proporción de núcleos pCREB positivos en comparación al resto de los grupos. Se concluye que el aumento en la proporción de núcleos pCREB positivos en las distintas áreas del hipocampo dorsal inducido por el entrenamiento incrementado podría deberse a un aumento en la liberación de neurotransmisores y corticosterona desembocando la activación de cascadas de segundos mensajeros para la transcripción de genes asociados a la consolidación de la memoria.

RECONOCIMIENTO

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria adscrito al Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá.



AGRADECIMIENTOS

Las historias comienzan con un sueño y para llegar a él siempre es necesario el apoyo y la solidaridad de personas y de instituciones.

Le agradezco a la **Universidad Nacional Autónoma de México**, a la **Facultad de Psicología** y al **Instituto de Neurobiología** por su sentido crítico en la educación, su carácter formativo y por priorizar la búsqueda de conocimiento para la generación de ideas ya que sin ello no hubiese podido concientizarme de los compromisos y de las responsabilidades que implica ser un universitario.

Mil gracias al **Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá** por su orientación, su imprescindible confianza, su decidido apoyo y su puntual dirección para este trabajo. Me llevo una visión completamente diferente de la ciencia y de la psicología así como el orgullo de haber trabajado en su laboratorio.

Tengo muy presente la guía y el cariño de la **Dra. Gina Lorena Quirarte**, quien me hizo sentir parte de esta gran familia académica y de quien comparto el genuino gusto por la psicología científica. Me queda una profunda admiración por su manera de formar estudiantes. Infinitas gracias por el apoyo para hacer posible este trabajo y por las valiosas sugerencias me dio para enriquecerlo.

Aprecio las correcciones y comentarios de mi revisor, el **Dr. Hugo Sánchez Castillo**, así como el interés que mostró por mi trayectoria académica desde mi primer semestre en la carrera. Este agradecimiento se extiende a mis sinodales, el **Dr. Eduardo Calixto González** y el **Dr. José Fernando Peña Ortega** por su atención y orientación para hacer este escrito más completo y preciso.

Agradezco a la **Dra. Paola Cristina Bello Medina** el haber aceptado mi participación para colaborar en este proyecto, su paciencia, su ecuanimidad, su disposición para solucionar cualquier problema, pero principalmente su asesoría que resultó indispensable.

Es importante reconocer el apoyo técnico y el puntual interés en mi formación académica (primero como verano de la ciencia y luego como tesista) de la **Dra. Andrea Cristina Medina Fragoso**, quien también procuró mi bienestar con sus valiosos consejos e innegable cariño; abriéndome las puertas de este maravilloso laboratorio.

La asesoría técnica, la disposición, el ánimo y las críticas constructivas de la **M.V.Z. Norma Serafín López**, así como el adecuado manejo y cuidado de los animales que tuvo la **Sra. Bertha Islas**, permitieron que este trabajo fuera más ameno.

Quisiera extender un sincero agradecimiento al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el financiamiento que otorgó al proyecto de investigación 237570 y a la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT)** por auspiciar el proyecto de investigación IN203918.

Agradezco a la **Unidad de Microscopia**, en forma muy especial a la **Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos**, por todas las facilidades y los consejos para el uso del microscopio y por los ánimos para obtener las muestras.

Debo de reconocer el apoyo que me brindó el personal de la biblioteca del campus Juriquilla (sobre todo al **Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela**) y al personal de bioterio (principalmente al **M.V.Z. José Martín García Servín** y a la **Dra. Alejandra Castilla León**).

Deseo agradecer a la **Dra. Mariana Gutiérrez Lara** y al **Lic. Ricardo Lozada** por la accesibilidad y facilidades para concluir el servicio social en su programa, ya que, sin esta ayuda no hubiese sido posible llevar a la par la elaboración de este proyecto de tesis y el servicio social. Muchas gracias por sus tan acertados consejos para sortear todas las dificultades que se me fueron presentando en estos proyectos.

El inicio de este capítulo de mi historia hubiese sido impensable sin el apoyo de mi **madre**. Su incondicional amor, ejemplo y consejos a lo largo de esta travesía fueron invaluable.

Debo de reconocer el cariño y la fraternidad de mi **hermano** que en todo momento me brindó, pese a su corta edad, lo cual, es motivo de mi absoluta admiración, eterno respeto y profunda gratitud.

Si no hubiese contando con el amor, la ayuda y la confianza que mi **abuela** depositó en mí no hubiese podido emprender y terminar este proyecto.

Muchas gracias a mis **tíos, Lucía y Julio**, por su amor e interés en mi formación académica.

A lo largo de mi camino me encontré con valiosas personas que, ajenas a los lazos sanguíneos, me brindaron una incondicionalidad admirable. Una de esas personas fue la **médica Vanesa Rosales Romero**, a quién considero como mi hermana y mi mejor amiga; quien nunca dudó de mi capacidad o integridad y creyó en mí y siempre me motivó a cumplir mis sueños, aunque a veces parecieran inalcanzables. También reconozco la fraternidad y el cariño sincero de su familia, Romero Colín, quienes me auxiliaron en esta odisea.

Agradezco al **filósofo David Sotelo** por sus constantes y valiosas contribuciones a la redacción de esta tesis, por las largas horas que dedicó a hablar de mi trabajo, por la puntual ayuda para llegar a Querétaro, por impedir que claudicara y, muy especialmente, por todo el cariño, la paciencia, la comprensión, la sincera compañía, el interés y cuidado mutuo.

La amistad del **psicólogo Antonio Ramos** fue indispensable para sortear los miles de retos y dudas que se presentaron a lo largo de mi formación profesional. Valoro mucho el apoyo que me dio su familia Ramos García.

Estoy agradecido con la **psicóloga Silvia Cisneros** por darme el empujón necesario para comenzar de nuevo en Querétaro, por sus buenos consejos y motivación a seguir creciendo este mundo de la ciencia.

Reconozco al **psicólogo Elías Mina** por la asesoría para la edición de algunas imágenes de este trabajo y el apoyo en cuestiones de formato. Además aprecio su disponibilidad y ayuda para solucionar mis distintos percances.

Es importante mencionar que las facilidades para intercambiar material y solucionar imprevistos que me dio el **psicólogo Carlos Gachuz** los tengo muy presentes.

Muchas gracias:

Al **Dr. Diego Alexander González Franco** por sus observaciones a mi trabajo, su desinteresado apoyo, por su entera disposición a discutir de ciencia, por aclarar mis dudas e interesarse en mi formación.

Al **M. en C. Rafael Arrazola** por comentarme de este proyecto y promover mi participación en el mismo. Además de su valiosa disposición y accesibilidad.

A la **M. en C. Martha Martínez Degollado** por su entrañable compañerismo, paciencia, puntuales observaciones, valiosa orientación y solidaridad.

A la **M. en C. Laura Pinedo** por su cariño, incondicionalidad, consejos y motivación para cumplir esta meta; por todos los momentos que llevó hasta la raíz y que sin los cuales esta experiencia no hubiese sido lo que fue.

A la **Dra. Erika Orta** por recibirme en su casa (y en su corazón); por su imprescindible solidaridad que hizo sumamente agradable mi estancia en Querétaro; además de los consejos y las sugerencias (académicas y personales).

A **Paula Mendoza**, a **Marco Antonio Garibay** y a los **psicólogos, Juan Emilio Montiel, Juan Sotomayor, Tesoro Hernández y Alma Rodríguez** por los buenos momentos tan necesarios y el interés en mi trabajo.

Porque todos ustedes contribuyeron acercarme a entender este increíble fenómeno de la memoria que no deja de maravillarme.

DEDICATORIA

Para Yolanda, mi mamá, quien nunca se rinde.

«Somos la memoria que tenemos y la responsabilidad que asumimos. Sin memoria no existimos y sin responsabilidad quizá no merezcamos existir».

José Saramago.

ABREVIATURAS

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico.

AMPc: adenosín monosfosfato cíclico.

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro.

CA: cuerno de Amón.

Ca²⁺: ión de calcio.

CaMKII: proteína quinasa Ca²⁺/calmodulina II

CE: corteza entorrinal.

CREB: proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc.

EI: evitación inhibitoria

GABA: ácido γ -aminobutírico.

GD: giro dentado del hipocampo.

MCP: memoria de corto plazo.

MLP: memoria de largo plazo.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

pCREB: proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc fosforilada en la serina 133.

PKA: proteína quinasa A.

PKC: proteína quinasa C.

Sub: subículo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	II
RECONOCIMIENTO.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
DEDICATORIA.....	VIII
ABREVIATURAS.....	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
1. El aprendizaje.....	3
2. La memoria.....	5
3. Descripción anatómica y morfológica del hipocampo.....	7
4. Conectividad del hipocampo.....	8
5. El hipocampo dorsal desempeña un papel importante en la consolidación de la memoria.....	11
6. Modificaciones bioquímicas durante la consolidación de la memoria en el hipocampo dorsal.....	13
7. La fosforilación de CREB está implicada en la consolidación de la memoria.....	15
8. El entrenamiento incrementado produce un efecto protector en la memoria.....	16
III. JUSTIFICACIÓN.....	18
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	19
V. OBJETIVO GENERAL.....	19
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
VII. HIPÓTESIS.....	20
VIII. MÉTODO GENERAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	20

1. Animales.....	21
2. Aparatos.....	21
3. Manipulación.....	22
4. Tarea de evitación inhibitoria.....	22
4.1. Entrenamiento.....	22
4.2. Retención.....	23
5. Sacrificio y extracción del cerebro.....	23
6. Criosección.....	23
7. Inmunohistoquímica.....	24
8. Obtención y análisis de imágenes.....	24
9. Análisis estadístico.....	27
IX. EXPERIMENTO I: curva de extinción.....	28
1. Método y diseño experimental.....	28
2. Resultados.....	29
X. EXPERIMENTO II: cuantificación de la proporción de núcleos pCREB positivos en el hipocampo dorsal bajo condiciones de entrenamiento moderado e incrementado.....	32
1. Método.....	32
2. Resultados.....	33
2.1 Cambios en la proporción de núcleos pCREB positivos en el GD.....	33
2.2 Cambios en la proporción de núcleos pCREB positivos en el CA1.....	36
2.3 Cambios en la proporción de núcleos pCREB positivos en el CA3.....	38
2.4 Resumen de los resultados del experimento II.....	40
XI. DISCUSIÓN.....	40
XII. CONCLUSIONES.....	46
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

I. INTRODUCCIÓN

El entrenamiento incrementado (o intenso) se refiere a las condiciones experimentales en las que ocurre un alto número de ensayos o de sesiones de entrenamiento (sobreeentrenamiento) y, en el caso del condicionamiento aversivo, al entrenamiento motivado por intensidades relativamente altas de choque eléctrico (sobrerreforzamiento). En ambos casos, el entrenamiento incrementado induce una mayor resistencia a la extinción que el entrenamiento moderado o con bajos niveles de estimulación aversiva. Esta condición experimental tiene como resultado un efecto protector en la consolidación de la memoria frente a tratamientos amnésicos. Particularmente, uno de los paradigmas más empleados para estudiar este fenómeno ha sido a través del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria (EI) (Prado-Alcalá et al., 2007).

El efecto protector de la memoria ocurre ante tratamientos que bloquean la actividad del sistema colinérgico (Durán-Arévalo, Cruz-Morales y Prado-Alcalá, 1990), serotoninérgico (Galindo et al., 2008) y GABAérgico (Cobos-Zapíaín et al., 1996). Del mismo modo, cuando ocurre este efecto no se observa la amnesia que típicamente se reporta cuando se inhibe la síntesis de proteínas, ya sea de manera sistémica (Díaz-Trujillo et al., 2009), o cuando se administra dentro de una estructura cerebral relacionada con los procesos mnemónicos como el hipocampo (Rodríguez Serrano, 2010). La información derivada del entrenamiento incrementado se consolida incluso ante el bloqueo farmacológico de estructuras que participan en la memoria como el estriado (Giordano y Prado-Alcalá, 1986), la amígdala cerebral (Salado-Castillo, Sánchez-Alavéz, Quirarte, Martínez-García y Prado-Alcalá, 2011) y el hipocampo (Quiroz et al., 2003).

Los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la consolidación de este tipo de aprendizaje son aún desconocidos. Una estrategia para poder descubrirlos es analizando los cambios bioquímicos que ocurren durante el proceso de consolidación dentro de las distintas áreas cerebrales implicadas.

La secuencia de eventos moleculares que se ha reportado que ocurren en el hipocampo dorsal durante la consolidación de la memoria de un aprendizaje de

El es la siguiente: la activación de los receptores ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y N-metil-D-aspartato (NMDA), lo cual, ocasiona un incremento en la concentración de calcio intracelular (Ca^{2+}) provocando un aumento de la actividad de la proteína quinasa A (PKA, por sus siglas en inglés) junto con la fosforilación de la proteína asociada de crecimiento 43 (GAP-43, por sus siglas en inglés). Se sabe que la actividad de PKA es importante para la proteína de unión al elemento de respuesta al adenosín monofosfato cíclico fosforilada en la serina 133 – a partir de este momento pCREB –, la cual, promueve la expresión de genes relacionados con la plasticidad cerebral como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), c-fos, GluR1, CRF y TH (Izquierdo y Medina, 1997; Bernabeu, Cammarota, Izquierdo y Medina, 1997).

La presencia de pCREB es un paso necesario para la consolidación de la memoria. Se sabe que hay un cambio en los niveles de pCREB después de una experiencia de aprendizaje. A través de la técnica de Western Blot, Taubenfeld, Wiig, Bear y Alberini (1999) hallaron un aumento en los niveles de pCREB en ratas que fueron entrenadas en la tarea de EI. Se ha reportado que impedir la fosforilación de esta molécula ocasiona dificultades para el almacenamiento de una experiencia de aprendizaje. Trifilieff y colaboradores (2006) administraron UO126 (sustancia que impide la fosforilación de CREB) antes del entrenamiento de una tarea de miedo al contexto. Se infiere que el condicionamiento tendrá más fuerza mientras menor sea el movimiento del sujeto (congelamiento). Sus resultados mostraron que los animales tenían dificultades para consolidar la memoria de este aprendizaje puesto que el porcentaje de congelamiento era menor al compararse con el grupo al que no se le administró esta sustancia.

El aumento en la magnitud del componente aversivo que se usa para el entrenamiento modifican la densidad de inmunotinción de pCREB en distintas regiones del hipocampo (Morris y Gold, 2012). Esta evidencia permite plantear que pCREB podría estar relacionado al proceso de consolidación del entrenamiento incrementado.

Los experimentos que se reportan en esta tesis se llevaron a cabo con ratas entrenadas en la tarea de EI con diferentes intensidades de choque eléctrico para establecer un sobrerreforzamiento. Posteriormente, se midió la proporción de núcleos pCREB positivos con inmunohistoquímica en rebanadas de hipocampo dorsal de cada uno de los grupos de ratas entrenadas y los distintos grupos controles, recolectadas una hora después del entrenamiento en EI, para hacer comparaciones entre ellos y encontrar evidencia que permitiera concluir cómo esta molécula participa en la consolidación del aprendizaje ante dos intensidades de entrenamiento.

II. ANTECEDENTES

1. El aprendizaje

Los organismos pueden modificar la manera de relacionarse con su medioambiente para sobrevivir, es decir, cuentan con la capacidad de modificar su conducta. El aprendizaje es un cambio relativamente permanente de la conducta derivado de una experiencia (McGaugh, 1973). Al limitar el aprendizaje a cambios relativamente permanentes se excluyen modificaciones de la conducta debidas a factores de motivación o a la fatiga. Al señalar que la práctica, el entrenamiento o la experiencia son condiciones esenciales del aprendizaje, se excluyen cambios de la conducta resultado de la maduración, la senectud, las lesiones cerebrales, la intoxicación por drogas o las enfermedades (Bower y Hilgard, 1989).

Hay dos clases de aprendizaje: el no asociativo y el asociativo. El aprendizaje no asociativo ocurre cuando sistemáticamente se atenúa (habituaación) o se aumenta (sensibilización) la percepción sensorial o la emisión de una respuesta como resultado de la presentación de un estímulo de una única modalidad sensorial cuya intensidad, duración y frecuencia de presentación no se modifican (Poon y Schmid, 2012; Kandel, Kupfermann e Iversen, 2013). Por otro lado, en el aprendizaje asociativo los efectos que un estímulo tiene sobre la

conducta dependen de la relación que mantienen los estímulos con las respuestas como con otros estímulos (Skinner, 1953).

Un tipo de aprendizaje asociativo es el condicionamiento clásico. Es una forma de aprendizaje en la que un estímulo que previamente tenía una escasa repercusión sobre la conducta (estímulo condicionado, EC) se asocia con un estímulo (incondicionado, EI) que induce una respuesta refleja (respuesta incondicionada, RI). Como resultado de esta asociación, ahora el EC desencadena una respuesta muy similar, llamada respuesta condicionada (RC) (Pierce y Cheney, 2013). El condicionamiento clásico ha sido ampliamente estudiado desde su descubrimiento por Iván Pavlov (Chance, 2001). Sin embargo, no es el único tipo de aprendizaje asociativo. También está el condicionamiento operante y fue descrito por primera vez en los estudios de Edward Thorndike (Mazur, 2014).

En 1953, B.F. Skinner consideró que este aprendizaje era de tipo operante porque, dada una situación, el organismo opera dentro de su ambiente para modificarlo a través de su conducta generando una consecuencia que determina si tal comportamiento volverá aparecer. Esta relación entre los estímulos que establecen la ocasión para la emisión de una conducta y las consecuencias que le siguen se llama contingencia (Skinner, 1938). En general, las contingencias se organizan en cuatro procedimientos operantes. Dos de ellos aumentan la probabilidad de ocurrencia de la conducta y dos de ellos la disminuyen (Skinner, 1953). Cuando un estímulo tiene como efecto el aumento de la probabilidad de aparición de una conducta se denomina reforzador, en cambio, a los estímulos que la disminuyen se consideran como castigos (Pierce y Cheney, 2013). Se dice que tanto los reforzadores como los castigos pueden ser positivos si resultan en la aparición de un estímulo o negativos si lo suspenden (Chance, 2001).

En algunas ocasiones la estimulación aversiva puede ser una contingencia. Se sabe que los estímulos aversivos son aquellos eventos que los organismos evaden, evitan o escapan como sonidos fuertes, choques eléctricos, ataques o luces muy brillantes (Mazur, 2014). El castigo positivo y el reforzamiento negativo

frecuentemente emplean este tipo de estímulos para controlar la emisión de una conducta (Chance, 2001). En el caso del castigo positivo, cuando el animal ejecuta una respuesta le sigue la presentación de un estímulo que disminuye su probabilidad de ocurrencia (Pierce y Cheney, 2013). Por ejemplo, si se administra un choque eléctrico a las patas de una rata justo después que entró a un compartimento, la probabilidad que vuelva a entrar a tal lugar disminuye. Por otro lado, en el reforzamiento negativo la probabilidad de ocurrencia de la respuesta se fortalece al eliminar la presencia de un estímulo, es decir, para escapar o evitar (Chance, 2001). En el escape, una respuesta cambia la situación en la que el estímulo está presente. De esta manera, se emite una respuesta que disminuye el contacto con el estímulo aversivo. En contraste, cuando una respuesta previene la aparición de un estímulo se denomina evitación (Mazur, 2014).

La evitación puede contar con un estímulo discriminativo como una luz o un sonido para que se genere una condición en la que (luego de algún tiempo) se presente un reforzador negativo si no se ejecuta una respuesta (Pierce y Cheney, 2013). En contraste, otro tipo de evitación, denominado inhibitoria, el animal no tiene ninguna señal particular más allá que las características del contexto y debe de dejar de ejecutar una respuesta para que no aparezca un estímulo aversivo (Netto e Izquierdo, 1985).

2. La memoria

La conducta persiste en el tiempo gracias a un proceso denominado memoria, que permite su almacenamiento y su posterior evocación (Kandel, 2001). Una de las maneras de clasificar a la memoria es por su duración (Dudai, 2004). Esta clasificación remarca la importancia que tiene el periodo en el cual la información puede ser recuperada y propone que la memoria puede ser de corto plazo (MCP) o de largo plazo (MLP) (Fig.1).

Este modelo considera que cuando la información ingresa al sistema nervioso para ser procesada se mantiene en la MCP por un periodo breve, pudiéndose

recuperar en una ventana temporal que va de segundos a minutos, siendo muy fácilmente modificable y frágil. Sin embargo durante la consolidación, la información pasa de manera gradual de un estado lábil a uno perdurable, es decir, a la MLP. Cabe señalar que la única manera de comprobar que este proceso ocurrió es a través de la evocación, es decir, en la salida de la información almacenada para que el animal ajuste sus respuestas según las demandas de su medio (Atkinson y Schiffrin, 1968; McGaugh, 1973). Sin embargo los cambios en las condiciones externas pueden dificultar la evocación de las respuestas, disminuyendo con ello su probabilidad de aparición. Este fenómeno se denomina extinción (McGaugh, 1973) y mientras más fuerte sea una memoria este fenómeno tarda más en aparecer (Garín-Aguilar et al., 2012; Bello-Medina et al., 2016)

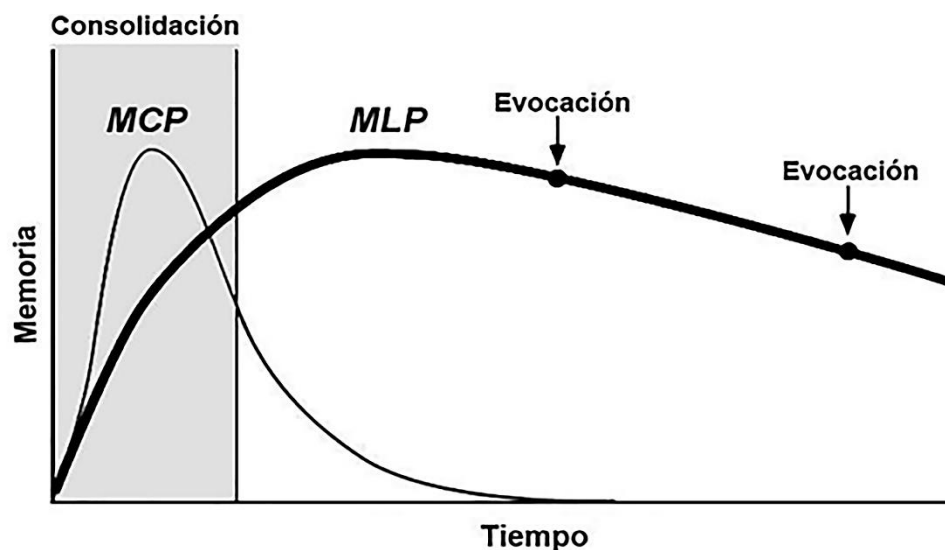


Figura 1. Representación de la clasificación de la memoria por su duración. El paso de la MCP a la MLP, en donde la información se vuelve estable y persistente, se denomina consolidación. Sin embargo, el término consolidación, también se emplea para describir a dos procesos: el primero sucede minutos (y hasta horas) después de una experiencia de aprendizaje y ocurre en las sinapsis de los circuitos neuronales relacionados. El segundo dura días, semanas e incluso meses después debido a la reorganización de las memorias, que en un inicio dependen del hipocampo para trasladarlas a otros sitios de la neo-corteza con la finalidad de obtener un almacenamiento mucho más duradero. Modificado de Dudai (2004). MCP = Memoria a corto plazo, MLP = Memoria a largo plazo.

3. Descripción anatómica y morfológica del hipocampo

Entender la anatomía y la morfología del hipocampo nos permite tener indicios sobre cómo participa en la consolidación de la memoria. El hipocampo está conformado por el giro dentado (GD), el área CA1, el área CA2, el área CA3 (el término CA proviene de cuerno de Amón) y el *hilus* (Hi) (Basu y Siegelbaum, 2015) (Fig. 2).

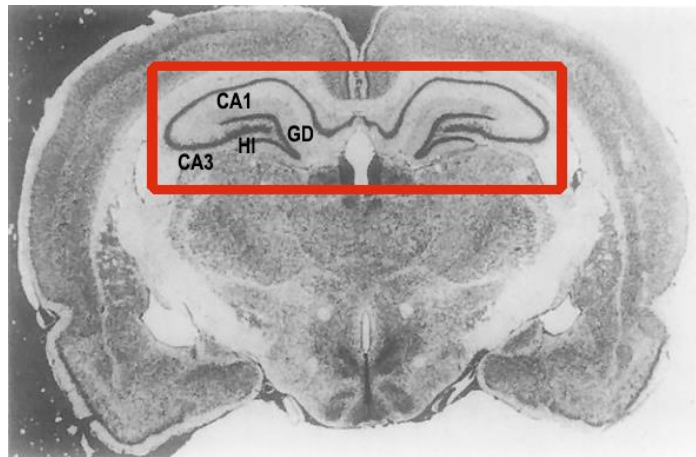


Figura 2. Corte coronal de un cerebro de rata teñido con violeta de cresilo. Dentro del recuadro rojo se señala la ubicación del hipocampo en su región dorsal y se indican las diferentes áreas que conforman a esta estructura. Modificado de Jarrard (1993).

El GD es un área con forma de U o V. A la parte en donde está el ápice de la U (o V) se denomina ginu. La parte que está localizada entre el área CA3 y el área CA1 (y que está separada por la fisura hipocampal) se le llama área supra-piramidal; y a la porción opuesta a ella es el área infra-piramidal (Amaral y Lavenex, 2007).

El GD está compuesto por tres capas de células: molecular, granular y polimórfica (Amaral, Scharfman y Lavenex, 2007). La capa granular debe su nombre a las neuronas granulares, las cuales, son glutamatérgicas principalmente (Gómez-Lira, Lamas, Romo-Parra y Gutiérrez, 2005), aunque pueden emplear otros neurotransmisores como el ácido γ -aminobutírico (GABA) o péptidos opioides (Walker, Ruiz y Kullmann, 2002).

Las neuronas granulares tienen arborizaciones en forma de cono con dendritas en puntas espinosas. Las ramas de estas dendritas se proyectan por toda la capa molecular y las últimas puntas del árbol dendrítico terminan en la fisura hipocampal o en la superficie ventricular (Amaral et al., 2007). Al conjunto de axones no mielinizados de las células granulares se le ha denominado fibras musgosas y conectan con las células musgosas y con las neuronas piramidales del área CA3 (Amaral et al., 2007).

Las áreas del CA se conforman de una capa principal denominada *stratum pyramidale* y una capa anexa relativamente libre de células y situada a mayor profundidad llamada *stratum oriens*. Únicamente en el área del CA3 hay una estrecha zona libre de células denominada *stratum lucidum* ubicada por encima del *stratum pyramidale*. Sobre el *stratum lucidum* y el *stratum pyramidale* se localiza el *stratum radiatum*. A la parte más superficial del hipocampo se le llama *stratum lacunosum moleculare* (Cappaert, van Strien y McBain, 2015).

Las células piramidales del área CA1 producen glutamato y GABA, pero cuentan con receptores a otros neurotransmisores para regular su función como acetilcolina, dopamina, serotonina y norepinefrina; lo mismo sucede con las células piramidales del área CA3 (Spruston y McBain, 2007). De hecho, las neuronas piramidales del área CA3 son estructuralmente similares a las del área CA1, con la diferencia que su árbol dendrítico se bifurca mucho más cerca del soma. Además, las neuronas piramidales del área CA3 son típicamente más largas que las células piramidales del área CA1 (Spruston y McBain, 2007).

4. Conectividad del hipocampo

Un importante objetivo en la investigación del hipocampo es comprender cómo sus diferentes regiones procesan las entradas de información que ocurren durante el aprendizaje para generar una salida de información que contribuya al establecimiento de una memoria (Basu y Siegelbaum, 2015).

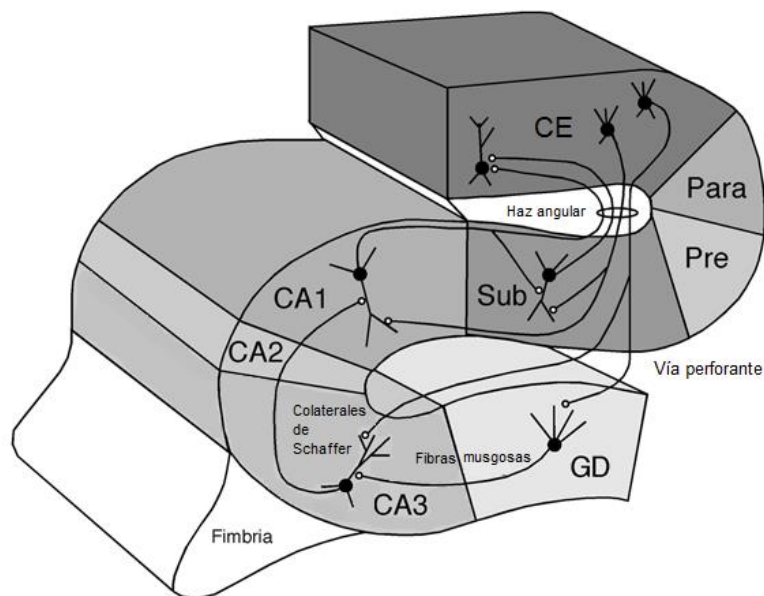


Figura 3. La CE manda proyecciones a través de la vía perforante del GD cuyos axones se unen con las neuronas piramidales del área CA3. Por medio de las colaterales de Schaffer, estas células proyectan hacia las células piramidales del área CA1. Finalmente, el subículo envía sus conexiones a la corteza entorrinal y ésta proyecta la información de regreso a la neocorteza. Modificado de Amaral y Lavenex (2007).

Amaral y Lavenex (2007) mencionan que las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal (CE) proyectan hacia el GD y al área CA3 a través de la vía perforante. Luego, el GD se comunica con el área CA3 gracias a las proyecciones de las fibras musgosas. Las neuronas del área CA3 se conectan con el área CA1 a través de las colaterales de Schaffer. Finalmente, el área CA1 proyectan hacia el Sub y, tanto el área CA1 como el Sub, envían sus proyecciones de regreso a la CE (Fig. 3). Sin embargo, es sabido que la conectividad interna del hipocampo no es tan lineal. De acuerdo con Basu y Siegelbaum (2015) hay otros patrones de conectividad dentro del hipocampo: las neuronas de la capa III de la CE proyectan hacia al área CA1 y al Sub, incluso el área CA2 mantiene una entrada de información que proviene de la CE. El área CA2 manda información hacia el área CA1 a través de proyecciones que se solapan con las provenientes del área CA3. El GD y el área CA3 proyectan hacia el área CA2, aunque en menor medida.

Con respecto a sus aferencias, el hipocampo recibe información de las cortezas del cíngulo, amígdala, prefrontal y límbica a través de sus conexiones con la CE (Cohen y Eichenbaum, 1993; Health y Harper, 1974) así como de todas las áreas sensoriales de la corteza, incluyendo de áreas involucradas en las últimas etapas del procesamiento de información visual, auditiva, somatosensorial y una entrada del sistema olfatorio a través del bulbo olfatorio (Amaral y Lavenex, 2007). Por otro lado, hay fibras provenientes del área septal, del área ventral tegmental, del núcleo del rafé y del locus coeruleus que liberan acetilcolina, dopamina, serotonina y noradrenalina, respectivamente en el hipocampo (Cooper y Lowenstein, 2003).

Por otro lado, las eferencias hipocámpales proyectan hacia el hipotálamo, los cuerpos mamilares, el prosencéfalo y el núcleo talámico a través del fornix. También cuenta con fibras precomisurales del área CA1, del área CA3 y del Sub que terminan en el área septal, la cual, a través de los núcleos septo-fibrial y habenular medial proyectan hacia el hipotálamo (Swanson, Wyss y Cowan, 1978).

Hay diferencias estructurales y funcionales a lo largo del eje longitudinal del hipocampo (Strange, Witter, Lein y Moser, 2014). En roedores, el hipocampo ventral envía sus proyecciones de manera más pronunciada hacia la corteza prefrontal y la amígdala cerebral en comparación con el hipocampo dorsal (Ishikawa y Nakamura, 2006), el cual, manda sus proyecciones hacia los núcleos supra-mamilares, al núcleo medial septal, a la corteza anterior y retrosplenial del cíngulo y al tálamo anterior (Fanselow y Dong, 2010). Se sabe que el hipocampo dorsal tiene un papel más destacado en la consolidación de la memoria y el procesamiento cognitivo de los estímulos (Kim y Fanselow, 1992; Ye et al., 2017).

Cada área del hipocampo dorsal desempeña un papel particular en el almacenamiento de la información. Se ha propuesto que el GD y sus proyecciones al área CA3 transforman representaciones o recuerdos muy similares en representaciones muy diferentes para que no se superpongan y se facilite su recuerdo. A esta función se le ha llamado separación de patrones (Prince, Bacon, Tigaret y Mellor, 2016). En cambio, el área CA3 y sus proyecciones hacia el área

CA1 se consideran una red de auto-asociación capaz de establecer patrones de activación basados en señales parciales o similares de la actividad que proviene del GD, de tal forma que la información queda completa para enviarse al área CA1. Esta capacidad se le denomina completamiento de patrones (Bakker, Kirwan, Miller y Stark, 2008). Aunque algunas teorías han propuesto que el GD mantiene patrones exclusivamente de separación y el área CA3, patrones exclusivamente de completamiento, actualmente algunos estudios experimentales más recientes mencionan que ambas áreas pueden actuar en ambos procesos (Leutgeb, Leutgeb, Moser y Moser, 2007).

Otras funciones se han podido describir a través de experimentos en los que se emplea la lidocaína para generar una inactivación del área CA1 y del área CA3 durante el aprendizaje. Por ejemplo, en una tarea de condicionamiento de miedo al contexto, Daumas, Halley, Frances y Lassalle (2005) brindaron indicios sobre el papel diferencial que desempeña cada una de estas áreas: el área CA3 está más involucrada en la rápida elaboración de una representación unificada del contexto; mientras que el área CA1 se orienta a la detección de aspectos novedosos.

Finalmente, se ha reportado que la síntesis de proteínas para el mantenimiento de la información no es necesaria cuando se trata del área CA3 aunque sí para el área CA1 (Calixto, Thiels, Klann y Barrionuevo, 2003).

5. El hipocampo dorsal desempeña un papel importante en la consolidación de la memoria

Diversos estudios han mostrado el papel que tiene el hipocampo dorsal en la consolidación de la memoria. Ambrogio-Lorenzini, Baldi, Bucherelli, Sacchetti y Tassoni (1996) administraron un bloqueador de los canales de sodio dependientes de voltaje, tetrodotoxina (TTX), en el hipocampo dorsal inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de EI, para determinar el papel que tiene esta estructura durante el proceso de consolidación. Los investigadores observaron

que cuando la inactivación es inducida inmediatamente después del entrenamiento sólo se muestra un efecto amnésico en aquellos animales a los que se les administró bilateralmente la TTX.

Hay evidencia que demuestra que si daña al hipocampo dorsal la consolidación de la memoria no llega a tener lugar. Martínez, Quirarte, Díaz-Cintra, Quiroz y Prado-Alcalá (2002) demostraron que, si se producen daño en el área del CA1 y el área del CA3 con ácido kaínico los animales muestran dificultades para consolidar y recordar el entrenamiento de la tarea de EI (Fig.4).

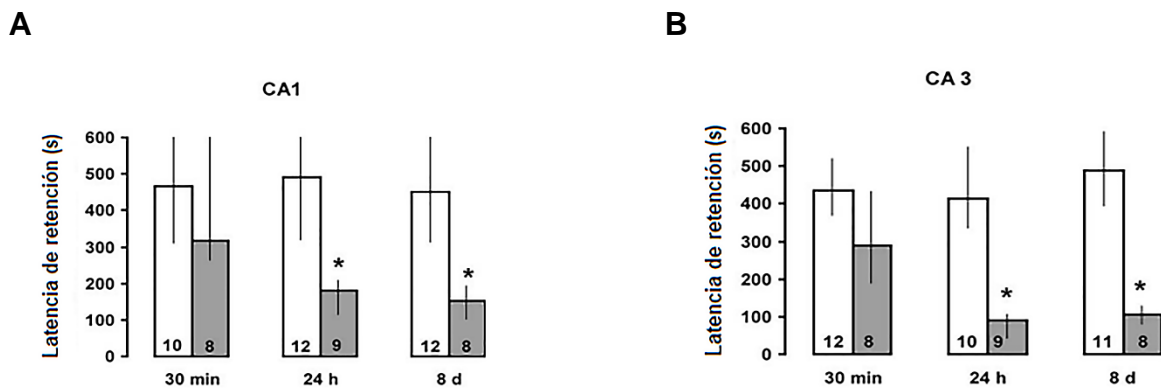


Figura 4. Latencia de retención expresada en medianas y rangos intercuartiles de ratas que recibieron un daño **A** en el área del CA1 o **B** en el área del CA3 con ácido kaínico (barras grises) y de ratas que tuvieron una falsa lesión (barras blancas), que fueron evaluadas a diferentes tiempos (30 min, 24 h y 8 días) después del entrenamiento. Se muestra una latencia de retención baja en aquellos grupos que tuvieron realmente la lesión. Modificado de Martínez et al. (2002).

Luego de una experiencia de aprendizaje que se recuerda por largo plazo ocurren modificaciones estructurales y funcionales en distintas áreas del hipocampo dorsal. Un cambio estructural en las neuronas que ha sido propuesto como un sustrato de la MLP es la densidad de espinas dendríticas (Horner, 1993). Se ha encontrado que consolidación de la memoria induce el desarrollo de espinas dendríticas en el hipocampo dorsal en una amplia variedad de tareas de aprendizaje (Leuner, Falduto y Shors, 2009), incluyendo a la tarea de EI (O'Malley, O'Connell y Regan, 1998). Se han reportado estos cambios en áreas como el GD

(O'Malley et al., 1998) y en el área CA1 (Leuner et al., 2003; Martínez Degollado, 2016). Dichos cambios estructurales asociados a la memoria dependen de las modificaciones en la bioquímica del hipocampo dorsal (Kandel, 2001; Giachero, Calfa y Molina, 2013).

6. Modificaciones bioquímicas durante la consolidación de la memoria en el hipocampo dorsal

La principal distinción que hay entre los cambios moleculares que ocurren dentro del hipocampo dorsal con respecto a los que suceden en otras estructuras, como la amígdala cerebral, la CE o la corteza parietal, es que los primeros suceden en un orden secuencial y temporal específico (Izquierdo y Medina, 1997).

La secuencia de eventos moleculares que ocurren en el hipocampo dorsal durante la consolidación de la memoria de un aprendizaje de EI es la siguiente (Izquierdo y Medina, 1997): la activación de los receptores NMDA y AMPA que ocasionan un aumento en los niveles de concentración de Ca^{2+} intracelular, provocando un aumento de la actividad de CaMKII y PKA que inducen la fosforilación de CREB en su serina 133 (pCREB).

La fosforilación de CREB se considera un mecanismo de convergencia de varias vías de señalización implicadas en el proceso de consolidación de la memoria (Silva, Kogan, Frankland y Kida, 1998; Bitner, 2012, Fig. 5). Cabe señalar que pCREB corresponde a un factor de transcripción que regula la expresión de genes relacionados con la plasticidad cerebral como el BDNF, c-fos, GluR1, CRF y TH (Izquierdo y Medina, 1997; Bernabeu et al., 1997).

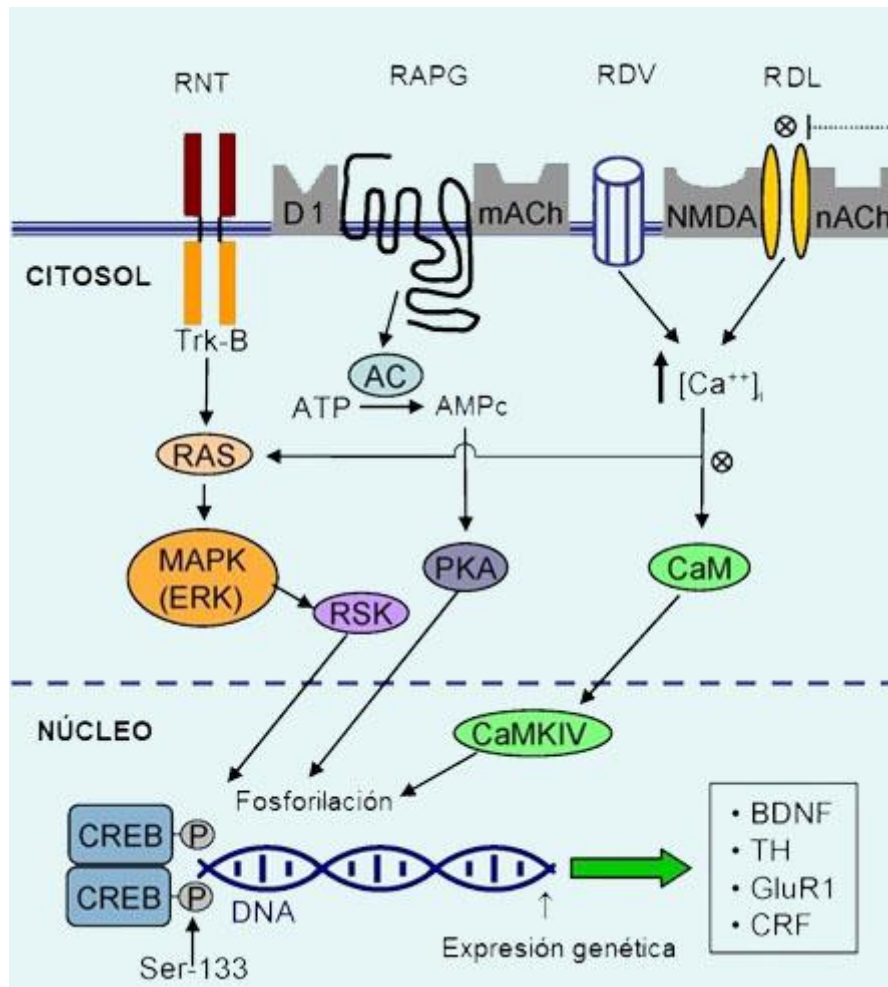


Figura 5. Cascada de señalización para la fosforilación de CREB. Bajo condiciones fisiológicas normales, la fosforilación de CREB y la subsecuente transcripción de distintos genes en el sistema nervioso central puede ocurrir como resultado de la estimulación de distintos receptores, tales como los receptores neurotróficos de tirosina quinasa (RNT) como Trk-B; los receptores acoplados a proteínas G (RAPG) como los dopaminérgicos (D1) y muscarínicos o colinérgicos (mACh); los receptores dependientes de voltaje (RDV), por ejemplo los receptores a NMDA y los nicotínicos; y los receptores dependientes de ligando (RDL). Posteriormente, ocurren cascadas de segundos mensajeros, tales como la activación de la quinasa ribosomal S6 (RSK, ribosomal s6 kinase); CaMKIV o PKA. La fosforilación de CREB inicia con la transcripción de numerosos genes como el factor neurotrófico derivado del cerebro o BDNF (Brain derived neurotrophic factor), la tirosina hidroxilasa (TH) o el factor de liberación de corticotrofina (CRF; corticotrophin releasing factor). Modificado de Bitner (2012).

7. La fosforilación de CREB está implicada en la consolidación de la memoria

La fosforilación es un mecanismo bioquímico por medio del cual los factores de transcripción se regulan en respuesta a diferentes señales celulares (Mayr y Montminy, 2001).

El aumento de los niveles de AMPc en respuesta a la activación de los receptores acoplados a proteínas G induce la mayoría de respuestas a través de PKA, la cual, tiene dos subunidades: la reguladora (R) y la catalítica (C) y se difunde pasivamente a través del núcleo celular induciendo la fosforilación de CREB en su serina 133 (Mayr y Montminy, 2001). pCREB también puede aparecer como resultado de un aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular a través de la activación de los receptores dependientes de voltaje o de ligando y de la activación de receptores neurotróficos (Bitner, 2012) donde estaría participando otras moléculas como CaMKII (Mizuno et al., 2002). La activación de CREB es un paso necesario para la transcripción de proteínas relacionadas a la plasticidad neuronal (Mayr y Montminy, 2001; Bitner, 2012).

Hay cambios en los niveles de pCREB luego de una experiencia de aprendizaje que se recuerda por largo plazo. Taubenfeld y colaboradores (1999) hallaron un aumento de en los niveles de esta proteína en el hipocampo dorsal en ratas que fueron entrenadas en la tarea de EI. Incluso, se ha reportado que impedir la fosforilación de CREB ocasiona dificultades para el almacenamiento de una experiencia de aprendizaje. Trifilieff y colaboradores (2006) administraron UO126 (sustancia que impide la fosforilación de CREB) antes del entrenamiento de una tarea de miedo al contexto en donde se infiere que el condicionamiento es más fuerte mientras menor sea el movimiento del sujeto (congelamiento). Sus resultados mostraron que los animales tenían dificultades para retener el aprendizaje puesto que su porcentaje de congelamiento era menor si se comparaba con el grupo al que no se le administró vehículo. Finalmente, en las neuronas la intensidad del choque eléctrico usado para el entrenamiento en EI induce cambios en el nivel de pCREB (Morris y Gold, 2012).

8. El entrenamiento incrementado produce un efecto protector en la memoria

El entrenamiento incrementado se refiere a la condición experimental en la que un sujeto recibe un mayor número de sesiones de entrenamiento (sobrentrenamiento) o una mayor intensidad en la estimulación durante la realización de una tarea (sobrerreforzamiento) y tiene como resultado una mayor resistencia de la respuesta ante a la extinción, es decir, la respuesta condicionada tarda más tiempo en desaparecer (Garín-Aguilar et al., 2012; Bello-Medina et al., 2016). Los tratamientos que producen típicamente amnesia se vuelven inocuos bajo un entrenamiento incrementado. A este fenómeno se le ha denominado efecto protector de la memoria (Prado-Alcalá, Medina, Serafín-López y Quirarte, 2012).

El entrenamiento incrementado protege a la memoria frente a tratamientos amnésicos que actúan sobre el sistema colinérgico (Durán-Arévalo et al., 1990), serotoninérgico (Galindo et al., 2008) y GABAérgico (Cobos-Zapiaín et al., 1996). La memoria se almacena incluso ante bloqueos farmacológicos de la actividad del estriado (Giordano y Prado-Alcalá, 1986), la sustancia negra (Cobos-Zapiaín et al., 1996), la amígdala cerebral (Salado-Castillo et al., 2011) y el hipocampo (Garín-Aguilar et al., 2014) (Fig. 6A). Del mismo modo, el entrenamiento incrementado impide la amnesia producida cuando se administra un inhibidor de la síntesis de proteínas (ISPs). Díaz-Trujillo y colaboradores (2009) demostraron que la administración sistémica de un ISPs genera amnesia ante condiciones moderadas de entrenamiento, pero no en condiciones incrementadas. Se encuentra el mismo efecto cuando se administra otro ISPs como la anisomicina (ANI) en el hipocampo dorsal (Rodríguez Serrano, 2010) (Fig. 6B).

Ante estos hallazgos se ha especulado que quizá las proteínas sintetizadas *de novo* tengan una función homeostática de reponer a otras, principalmente a aquellas con una susceptibilidad a la intensidad del estímulo que sufrieron proteólisis dejando a aquellas intactas como las encargadas de producir los cambios que subyacen a la formación de la memoria (Routtenberg y Rekart,

2005). Entonces, podría proponerse que, al menos bajo condiciones de entrenamiento incrementado, la participación de proteínas preexistentes es suficiente para la formación de memorias de largo plazo (Díaz-Trujillo et al., 2009). Quizá un mecanismo potencial sea la fosforilación puesto que, para que se presente no se requiere de la síntesis de nuevas proteínas (Cohen, 2002), siendo un candidato pCREB, dada su convergencia en las diferentes cascadas de señalización que están relacionadas a la consolidación (Viola et al., 2000; Bernabeu et al., 1997; Impey et al., 1998; Cammarota et al., 2000; Silva et al. 1998).

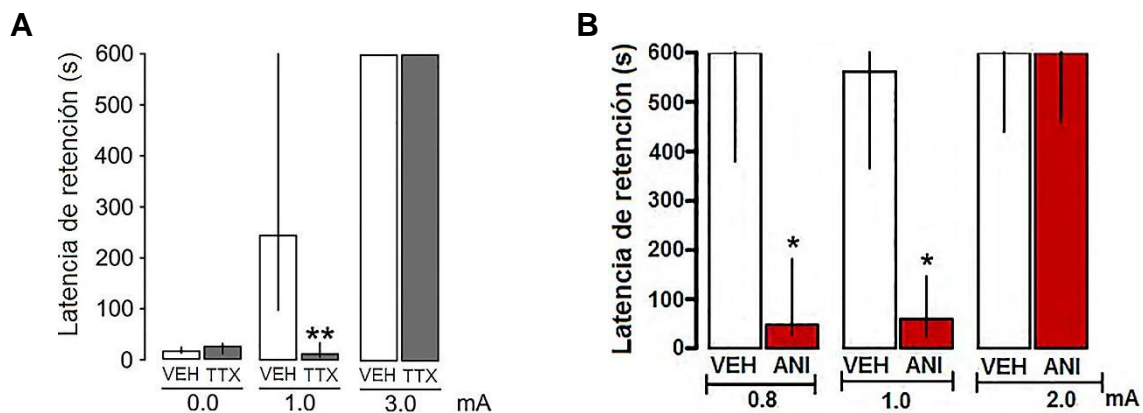


Figura 6. El efecto protector de la memoria ocurre aún ante bloqueos de la actividad del hipocampo por bloqueadores de canales de sodio o inhibidores de la síntesis de proteínas (ISPs) después del entrenamiento en la tarea de El **A** Medianas y rangos intercuartiles de las latencias de retención de las ratas a las que se les administró un vehículo (VEH) o TTX en el hipocampo dorsal (HD). Se observa amnesia únicamente en los grupos sin sobrerreforzamiento. **B** Medianas y rangos intercuartiles de las latencias de retención de las ratas a las que se les administró un vehículo (VEH) o ANI en el HD. Se observa amnesia únicamente en los grupos sin sobrerreforzamiento. Modificado de Garín-Aguilar et al. (2014) y Rodríguez Serrano (2010), respectivamente.

III. JUSTIFICACIÓN

Un paso importante para comprender a la neurobiología de la consolidación de la memoria es determinar los mecanismos que emplea el sistema nervioso para procesar la información y poder guardarla de forma relativamente permanente. Una manera de abordar el problema es a través del estudio exhaustivo de un tipo de aprendizaje para tratar de determinar los mecanismos involucrados en el almacenamiento de la experiencia de aprendizaje (Prado-Alcalá et al., 2007). A través de distintos experimentos, la comunidad científica ha demostrado la existencia de múltiples momentos de expresión de genes y de proteínas en diferentes tareas de condicionamiento (Barzilai, Kennedy, Sweat y Kandel, 1989; Pohle, Riithrich, Popov y Matthies, 1987), incluyendo el de EI (Bernabeu et al., 1997).

La tarea de EI es muy útil para estudiar los procesos de la memoria debido a que se sabe el momento preciso en el que el animal asocia los estímulos derivados del contexto (es decir, las características físicas de la cámara de condicionamiento) y los derivados de la actividad motora con la administración del choque eléctrico (Prado-Alcalá et al., 2007).

Si la experiencia incrementada de aprendizaje produce diferencias en la fortaleza de la memoria (medida a través de la extinción), entonces, podríamos suponer que las diferentes velocidades de extinción se deben a que las memorias de las respuestas condicionadas originadas por las diferentes intensidades de choque están bajo control de diferentes mecanismos cerebrales, a pesar de que se trata de la misma respuesta condicionada (Prado-Alcalá et al., 2007).

Se ha reportado que la magnitud del entrenamiento, modificando la intensidad del estímulo, es un parámetro que influyen en la consolidación de la memoria (Morris y Gold, 2012). Por otra parte, Díaz-Trujillo y colaboradores (2009) demostraron que la administración de un ISPs genera amnesia ante condiciones moderadas de entrenamiento, pero no en condiciones de sobrerreforzamiento. Se encuentra el mismo efecto cuando se administra otro ISPs como la anisomicina (ANI) en el hipocampo dorsal (Rodríguez Serrano, 2010). Incluso se ha reportado

que la síntesis de proteínas para el mantenimiento de la información no es necesaria cuando se trata del área CA3 aunque sí para el área CA1 (Calixto et al., 2003).

Se especula que quizá la activación de las proteínas que no sufrieron proteólisis sean las encargadas de llevar a cabo todos estos procesos. En este caso, sabemos que la fosforilación de CREB resulta importante para la consolidación de la memoria (Viola et al., 2000; Bernabeu et al., 1997; Impey et al., 1998; Cammarota et al., 2000). Se esperaría que la fosforilación de esta proteína fuese diferente entre ratas que tuvieron un entrenamiento moderado frente aquellas que recibieron uno incrementado y que, dependiendo del área del hipocampo dorsal evaluada, se observaran diferencias, puesto que cada parte de esta estructura desempeña un papel particular en el proceso de consolidación de la memoria (Calixto et al., 2003; Prince et al., 2016). De esta manera podríamos obtener evidencia de la manera en que el entrenamiento incrementado induce cambios dentro de las distintas áreas del hipocampo dorsal.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El entrenamiento moderado e incrementado producirá cambios en la proporción de núcleos pCREB positivos en las distintas áreas del hipocampo dorsal (GD, CA1 y CA3)?

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar la proporción de núcleos pCREB positivos en el hipocampo dorsal (GD, área CA1 y área CA3) bajo condiciones de entrenamiento moderado e incrementado.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar qué intensidad de choque eléctrico corresponde a un entrenamiento moderado o incrementado en la tarea de EI.
2. Cuantificar los núcleos pCREB positivos en el GD, el área CA1 y el área CA3 del hipocampo dorsal en ratas entrenadas en la tarea de EI bajo condiciones de entrenamiento moderado e incrementado.

VII. HIPÓTESIS

1. Una intensidad alta de choque eléctrico en el entrenamiento de EI producirá una mayor resistencia a la extinción en comparación a una intensidad baja de choque eléctrico.
2. La proporción de núcleos pCREB positivos en el GD será mayor en el grupo entrenado con 3.0 mA en comparación al grupo entrenado con 1.0 mA.
3. La proporción de núcleos pCREB positivos en el área CA1 será mayor en el grupo entrenado con 3.0 mA en comparación con el grupo entrenado con 1.0 mA.
4. La proporción de núcleos pCREB positivos en el área CA3 será mayor en el grupo entrenado con 3.0 mA en comparación con el grupo entrenado con 1.0 mA.

VIII. MÉTODO GENERAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las directrices del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología (INB) de la UNAM y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (2001) referentes al uso y al manejo de animales de experimentación, así como la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud de Estados (2011).

1. Animales

Se utilizaron 50 ratas macho de la cepa Wistar (250 – 350 g; obtenidas del bioterio del INB-UNAM) y se asignaron de manera aleatoria a cada grupo experimental. Las ratas permanecieron individualmente en cajas habitación de acrílico ubicadas en el bioterio del laboratorio con una temperatura entre 22 a 24 °C; con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h (encendiendo las luces a las 7:00 h) y se les permitió libre acceso a agua y alimento.

2. Aparatos

El entrenamiento se llevó a cabo en una cámara de EI (Fig. 7). Este aparato tiene dos compartimientos: de seguridad y de castigo. Ambos compartimientos son del mismo tamaño (30 cm x 30 cm x 30 cm) y están separados por una puerta deslizante, tipo guillotina. Las paredes del compartimiento de seguridad están hechas de acrílico rojo y el piso es una rejilla de tubos de acero inoxidable. Cuenta con un foco de 10 W al centro de su tapa para mantenerlo iluminado. Por otro lado, el compartimiento de castigo no está iluminado. A la mitad de su piso hay una ranura de 1.5 cm que separa dos placas de acero inoxidable que forman las paredes laterales. Tales placas tienen forma de «V» con 20 cm de separación en la parte superior y 8 cm en la parte inferior. Las placas del compartimiento de castigo están conectadas a una unidad de corriente constante (*Grass Instruments Co.*, modelo CCU-1, EEUU), la cual está conectada a un estimulador que genera pulsos cuadrados (*Grass Instruments Co.*, modelo S486G, EEUU). Los parámetros de los estímulos eléctricos fueron los siguientes: 100 V, pulsos de 50 ms de duración y una frecuencia de pulsos de 10/s. La duración de los estímulos y las latencias de entrada, escape y retención fueron medidas con ayuda de equipo automatizado. Ambos compartimientos se limpiaron con alcohol al 10 % antes y después de cada ensayo. La cámara de evitación inhibitoria se ubica dentro de un cuarto sonoamortiguado y oscuro, provisto de un enmascarador de ruido (BRS/LVE, modelo AU-902).



Figura 7. Cámara de evitación inhibitoria. **A** Compartimento de seguridad. **B** Compartimento de castigo. **C** Estimulador de pulsos cuadrados.

3. Manipulación

Antes del entrenamiento, las ratas fueron manipuladas en tres sesiones consecutivas para habituarlas al manejo del experimentador y disminuir el estrés provocado por éste. Cada sesión consistió en colocar a la rata sobre una toalla blanca (que estaba colocada en las piernas del experimentador) para sujetarla cuidadosamente y manipularla con ambas manos (usando guantes) durante 5 minutos. Al término, la rata se regresaba a su caja habitación.

4. Tarea de EI

4.1 Entrenamiento

La rata fue colocada en el compartimento de seguridad, y 10 s después se abrió la puerta deslizable; una vez que el animal pasó al compartimento de castigo se cerró la puerta y se administró un choque eléctrico de 1.0 o 3.0 mA durante 10 s. Transcurridos 5 s después del inicio de la administración del choque se abrió la puerta, permitiendo al sujeto escapar al compartimento de seguridad en donde permaneció durante 30 s antes de ser regresado a su caja-habitación. Se registró el tiempo transcurrido entre la colocación de la rata en el compartimento de

seguridad y el momento en el que ingresó al compartimento de castigo (latencia de entrada), así como el tiempo en que tardó en pasar del compartimento de castigo al de seguridad durante la administración del choque eléctrico (latencia de escape). Un grupo de ratas (0.0 mA) no recibió choque eléctrico durante el entrenamiento.

4.2 Retención

Pasadas 24 h después del entrenamiento se realizó la prueba de retención que consistió en el mismo procedimiento de la sesión de entrenamiento, pero sin administrar el choque eléctrico. Se midió el tiempo que la rata tardó en pasar al compartimento de castigo (latencia de retención). Si el animal no pasaba en el transcurso de 600 s, se daba por terminada la sesión y se anotaba ese tiempo como su latencia de retención. Para medir la extinción, este procedimiento se repitió durante siete días consecutivos con un intervalo de 24 h entre cada sesión.

5. Sacrificio y extracción del cerebro

Los animales fueron decapitados 60 minutos después del entrenamiento. Los cerebros fueron extraídos para sumergirlos en 2-metilbutano (Sigma-Aldrich), el cual, estaba contenido dentro de un vaso colocado en un baño de alcohol etílico natural al 96 % en hielo seco. El tejido cerebral fue almacenado a -70 °C.

6. Crio-sección

Los cerebros congelados fueron colocados en una matriz de acero inoxidable para cortarlos en rebanadas que tuvieran en ambos hemisferios al hipocampo dorsal según las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (2007). El grosor de tales rebanadas fue de 4 mm en el eje antero-posterior (coordenadas antero-posterior:- 3.14 a 4.3 con respecto a Bregma).

Cada rebanada de cerebro fue colocada de manera aleatoria en un molde de plástico (Electron Microscopy). Una vez ocupadas las cinco posiciones del molde, se aplicó un medio crioprotector (OCT Tissue Tek) y se esperó a que se congelara. Al resultado de este procedimiento se le denominó bloque de cerebros. Cada bloque de cerebros tenía un sujeto de cada condición experimental y fueron

cortados a 20 μm en un criostato a una temperatura entre -16 a -18 °C. Los tejidos fueron recolectados en laminillas silanizadas. Las laminillas fueron almacenadas a -70 °C.

7. Inmunohistoquímica

Se emplearon 20 laminillas que contenían tejido cerebral de todos los grupos experimentales, los cuales, fueron fijados en formalina al 2 % (pH 7.4) por 8 minutos. Se realizaron lavados con TBS 1X (pH 7.0) y TBS 1X Tween (TBST). Las señales inespecíficas de la detección fueron bloqueadas con una solución que contenía TSA (Perkin Elmer), Tritón y suero normalizado de cabra (NGS por sus siglas en inglés, 5 %) por 30 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo primario (Anti-pCREB, Ser 133, Cell Signaling) fue diluido (1:400) en TSA buffer de bloqueo, Tritón y NGS (5 %) y se dejó incubar en las laminillas por 2 horas a temperatura ambiente y después toda la noche a 4 °C. Se volvió a lavar con TBS 1X por 5 minutos. Enseguida, los tejidos se incubaron en una solución de peróxido de hidrógeno (3.3 ml) disueltos en metanol (100 ml) por 20 minutos para después lavarse con TBS 1X-T. El segundo anticuerpo biotinilado fue diluido 1:400 en TSA. Logrado lo anterior, se dejó incubar a temperatura ambiente por 3 h y luego toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se realizaron lavados con TBS 1X-T y TBS 1X, para dejar incubar con el kit de amplificación AB (Vector) por 45 minutos. Después de la amplificación con AB, se hicieron otros lavados con TBS 1X-T y TBS 1X. Las laminillas fueron incubadas con DAPI (1:5000; por 45 minutos) para la detección de núcleos celulares. Finalmente se montaron los cubre objetos con Vectashield (Vector).

8. Obtención y análisis de imágenes

Fue empleado un microscopio semi-confocal ApoTome (marca Carl Zeiss Imager Z1) con cámara AxiCamMR3 para la obtención de imágenes del GD, del área CA1 y del área CA3 (Fig. 8).

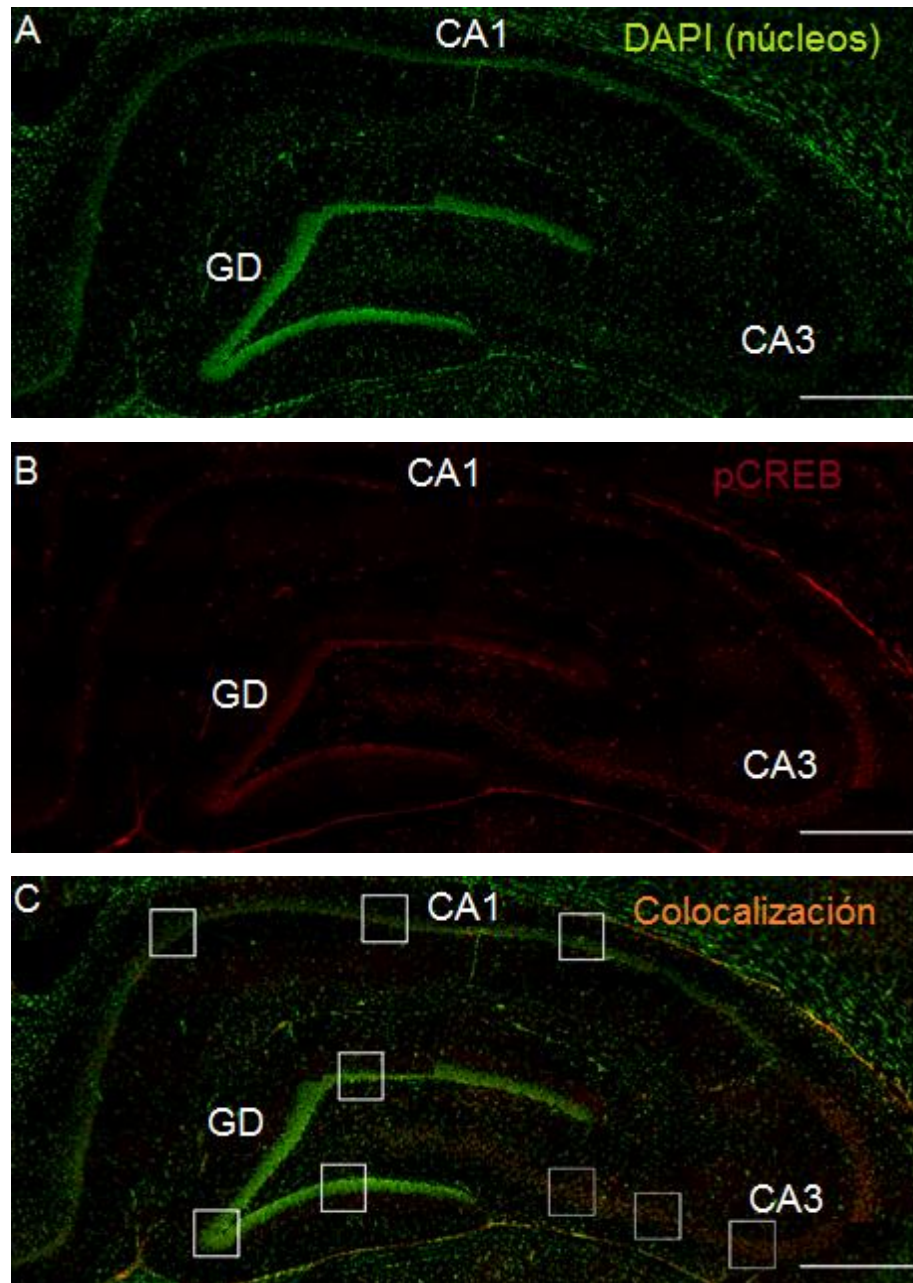


Figura 8. Imágenes mosaico del hipocampo dorsal izquierdo. **A.** Contratinción de núcleos neuronales con DAPI. **B.** Inmunohistoquímica para pCREB. **C.** Colocalización de imágenes y señalamiento de las tres capturas que se realizaron en cada subregión. Las imágenes fueron obtenidas de un corte cerebral de una rata entrenada con 3.0 mA. Escala 500 μm

Para controlar la variación de la señal producida por el proceso de marcaje, los parámetros de imagen (brillo, contraste y saturación) se ajustaron según los valores observados en el animal del grupo bioterio para hacer la comparación con el resto de los tejidos cerebrales colocados en la laminilla. Excitando con fluorescencia el tejido, se realizó la captura de imágenes en profundidad (Z-stacks) con un objetivo de 40 x con 1.3 AN (apertura numérica) y un total de 25 planos ópticos aproximadamente. Después de obtener las imágenes de cada región, éstas fueron analizadas con el programa IMAGE-J (licencia libre).

Los conteos celulares fueron realizados basándose en la tinción de núcleos que permitió una distinción morfológica: se clasificaron como núcleos neuronales y núcleos gliales. Aquellas células que tenían núcleos con tinción nuclear pequeña, intensa y uniforme fueron consideradas glías y fueron excluidas, mientras que los núcleos con apariencia más grande y con tinción menos intensa y uniforme se tomaron como neuronas (González-Franco et al., 2017; Vazdarjanova et al., 2006).

A partir del plano medial de cada apilamiento de imágenes en Z, se tomaron sólo el 60 % (30% hacia arriba y 30 % hacia abajo) para poder observar y contabilizar los núcleos de las neuronas. Esto con el fin de no contar núcleos incompletos o que parte de ellos estuvieran en otra laminilla y prevenir que fueran contados doble vez. Terminado el conteo de núcleos se hizo el empalme de las imágenes (núcleos con DAPI y pCREB) y tomando en cuenta todos los planos útiles, se observaron y contabilizaron aquellos núcleos previamente marcados y contados que se empalmaban con la señal de ambas tinciones. Como criterio de inclusión se tomó en cuenta que la señal de pCREB ocupara más de la mitad del núcleo y que estuviese presente tres planos como mínimo en la proyección en Z. Aquellos núcleos que cumplían estos criterios fueron designados como pCREB positivos (Fig.9). La proporción de núcleos pCREB se obtuvo al dividir los núcleos pCREB entre el total de núcleos. El análisis de imágenes se hizo en ciego.

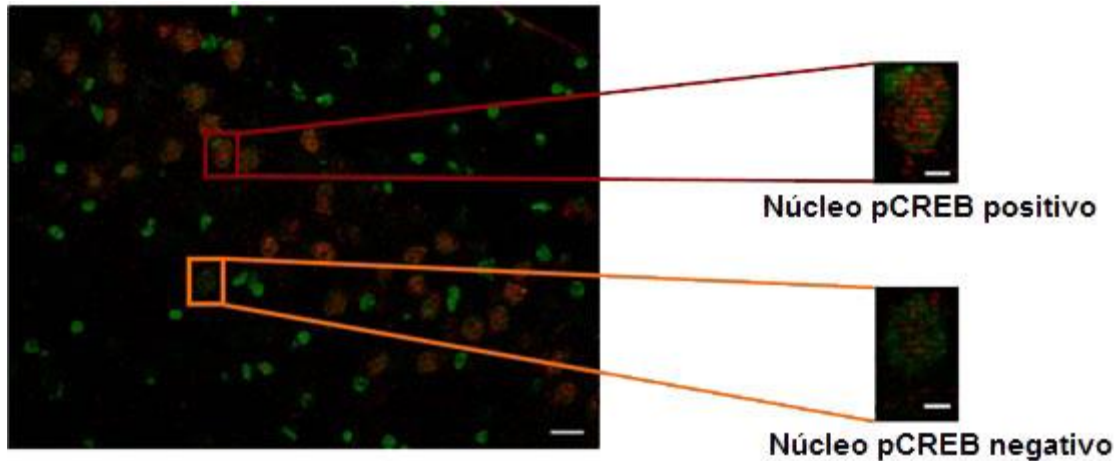


Figura 9. Cuantificación de pCREB en núcleos. Se muestra una imagen del área CA3 tomada con el objetivo apocromático de 40 x del microscopio ApoTome. En el extremo derecho se muestran a los dos tipos de núcleos que se consideraron: positivo (superior derecha) y negativo (inferior derecha). Escala 20 μm (imagen izquierda) y escala 5 μm (imágenes en el lado derecho).

9. Análisis estadístico

Tarea de EI. Debido a un corte arbitrario de 600 s en las latencias de retención, los resultados fueron analizados con estadística no paramétrica. Se utilizó la prueba Kruskal-Wallis para comparar, en forma independiente, las latencias de entrada, escape y retención. En caso de encontrar diferencias significativas se ocupó la prueba de comparaciones múltiples de Dunn para hacer comparaciones entre pares de grupos. Se empleó el nivel de significancia $p < 0.05$.

Prueba de extinción. Se empleó la prueba de Friedman para analizar las latencias de retención en los siete ensayos. Si se llegaban a encontrar diferencias, se recurría a la prueba Wilcoxon para comparar entre pares de ensayos entre sí en cada grupo. Asimismo, para hacer comparaciones en cada sesión de extinción, entre los tres grupos, se utilizó la prueba Kruskal-Wallis. Si se encontraban diferencias significativas, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar entre pares de grupos. Se utilizó el nivel de significancia $p < 0.05$.

Cuantificación de los núcleos con pCREB. Se unieron los datos de ambos hemisferios y se utilizó la prueba ANOVA de una vía para determinar si existían diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales en cuanto a la proporción de núcleos con pCREB. Si el análisis de varianza resultaba significativo se recurría a la prueba post-hoc de Bonferroni para determinar entre qué pares de grupos se encontraban las diferencias. Se usó el nivel de significancia $p < 0.05$.

VIII. EXPERIMENTO 1: curva de extinción

1. Método y diseño experimental

Se utilizaron 30 ratas macho de la cepa Wistar, las cuales fueron manipuladas durante tres días por 5 minutos. Posteriormente, las ratas fueron distribuidas en grupos independientes para su entrenamiento en la tarea de EI. Los parámetros de estimulación eléctrica fueron establecidos siguiendo la curva de extinción obtenida por Bello-Medina y colaboradores (2016) quedando de la siguiente manera: un grupo **contexto (0.0 mA)**, donde las ratas fueron entrenadas en la tarea de EI, pero no se les administró ningún choque eléctrico y sólo pasaban de un compartimento a otro; un grupo entrenado con un **choque eléctrico moderado (1.0 mA)**; y un grupo entrenado con un **choque eléctrico incrementado (3.0 mA)**. Ambas intensidades de choque eléctrico fueron administradas en un tren de 50 ms de pulsos cuadrados de 10 Hz. Cada grupo estuvo constituido por 10 ratas.

Veinticuatro horas después del entrenamiento, se llevaron a cabo siete sesiones de extinción que consistieron en colocar al animal en el compartimento de seguridad y registrar el tiempo que le tomaba pasar al compartimento de castigo. Si la rata no cruzaba en 600 s, se daba por terminada la sesión y se le asignaba ese tiempo a su latencia de retención. Se infiere que mientras mayor sea la latencia de retención mayor es el nivel de memoria (Fig. 10).

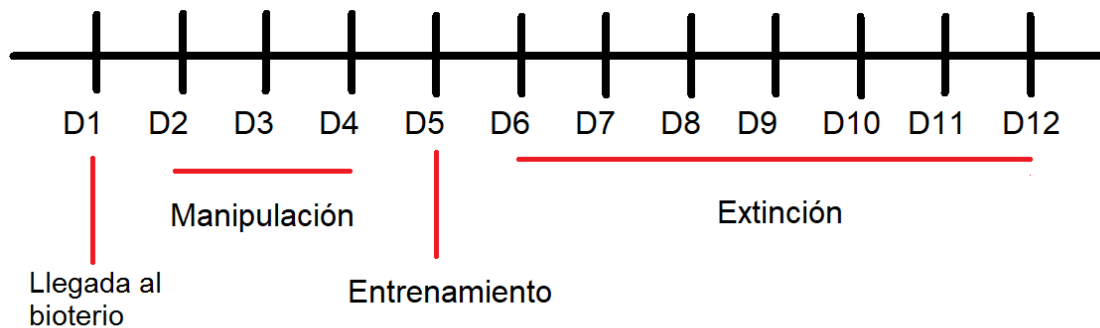


Figura 10. Línea temporal donde se muestra el orden y fases del experimento I

2. Resultados

Al hacer el análisis estadístico de los datos conductuales, la prueba Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas en las latencias de entrada observadas entre los tres grupos (0.0, 1.0 y 3.0 mA). ($H_{(2)} = 1.33$, $p = 0.5142$) (Fig.11 A). Sin embargo, se hallaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las latencias de escape entre los grupos ($H_{(2)} = 19.86$, $p < 0.0001$) (Fig. 11 B) encontrándose que el grupo de 0.0 mA tuvo una latencia de escape significativamente mayor que la de los grupos entrenados con 1.0 mA ($p = 0.0052$) y 3.0 mA ($p = 0.001$). No se encontraron diferencias estadísticas al comparar estos dos últimos grupos ($p = 0.9999$) (Fig.12 B).

El análisis estadístico de las latencias de retención observadas a lo largo de las sesiones de extinción se realizó con la prueba Friedman, la cual, no reporta diferencias estadísticas en el grupo de 0.0 mA ($X^2_{(2)} = 7.803$, $p = 0.2529$). En contraste, se muestran diferencias en el grupo entrenado con 1.0 mA ($X^2_{(2)} = 57.15$, $p < 0.0001$). Por otro lado, no se observan diferencias en el grupo entrenado con 3.0 mA ($X^2_{(2)} = 6$, $p = 0.4232$) (Fig. 11 C). Al analizar las latencias de retención del grupo entrenado con 1.0 mA con la prueba Friedman, se observó una reducción significativa en su latencia de retención en la quinta sesión de extinción en comparación con la primera sesión de extinción ($p = 0.002$). Esta disminución continuó en la sexta ($p = 0.002$) y en la séptima sesiones ($p = 0.002$).

Se realizaron comparaciones entre el grupo de 0.0, 1.0 y 3.0 mA en cada sesión de extinción usando la prueba Kruskal-Wallis. Los resultados de este análisis muestran que en la primera sesión los grupos experimentales son diferentes ($H_{(2)} = 27.5$, $p < 0.0001$). Las comparaciones entre pares de grupos con la prueba U de Mann-Whitney reportan que el grupo de 0.0 mA tuvo una menor latencia que los grupos entrenados 1.0 mA ($p < 0.0001$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). El grupo entrenado con 1.0 mA no es diferente al grupo de 3.0 mA ($p = 0.9999$). En la segunda sesión también se encontró que los grupos son distintos ($H_{(2)} = 26.03$, $p < 0.0001$); el grupo de 0.0 mA sigue siendo diferente del grupo de 1.0 mA ($p = 0.0002$) y del grupo de 3.0 mA ($p < 0.0001$). No se encuentran diferencias entre el grupo de 1.0 mA contra el grupo de 3.0 mA ($p = 0.9999$). En la tercera sesión esta diferencia entre los grupos experimentales se mantiene ($H_{(2)} = 23.95$, $p < 0.0001$), siendo el grupo de 0.0 mA estadísticamente diferente al grupo de 1.0 mA ($p < 0.0001$) y al grupo de 3.0 mA ($p < 0.0001$). No se reportan diferencias entre el grupo de 1.0 mA contra el grupo de 3.0 mA ($p = 0.9999$). En la cuarta sesión, se encontró que todos los grupos son diferentes entre sí ($H_{(2)} = 23.23$, $p < 0.0001$). Las comparaciones entre pares de grupos reportan que el grupo de 0.0 mA es diferente al grupo de 1.0 mA ($p < 0.0001$) y al grupo de 3.0 mA ($p < 0.0001$) y el grupo de 1.0 mA es distinto al grupo de 3.0 mA ($p = 0.0105$). Tales diferencias se mantienen en la quinta sesión ($H_{(2)} = 25.02$; $p < 0.0001$). En esta sesión, la prueba de U de Mann-Whitney reporta que grupo de 0.0 mA es distinto al grupo de 1.0 mA ($p < 0.0001$) y al grupo de 3.0 mA ($p < 0.0001$). De igual modo, se reporta que el grupo de 1.0 mA es diferente del grupo de 3.0 mA ($p = 0.0003$). Lo mismo ocurre en la sexta sesión ($H_{(2)} = 23.25$, $p < 0.0001$), en donde el grupo de 0.0 mA continúa siendo diferente al grupo de 1.0 mA ($p < 0.0001$) y al grupo de 3.0 mA ($p < 0.0001$); y el grupo de 1.0 mA es estadísticamente diferente del grupo de 3.0 mA ($p = 0.0002$). Para la séptima sesión la diferencia entre los grupos se mantiene ($H_{(2)} = 24.32$; $p < 0.0001$), hallándose que el grupo de 0.0 mA es diferente al grupo de 1.0 mA ($p = 0.0002$) y al grupo de 3.0 mA ($p = 0.0002$). La diferencia entre el grupo de 1.0 mA y el grupo de 3.0 mA se mantiene en esta sesión ($p = 0.0005$) (Fig. 11 C).

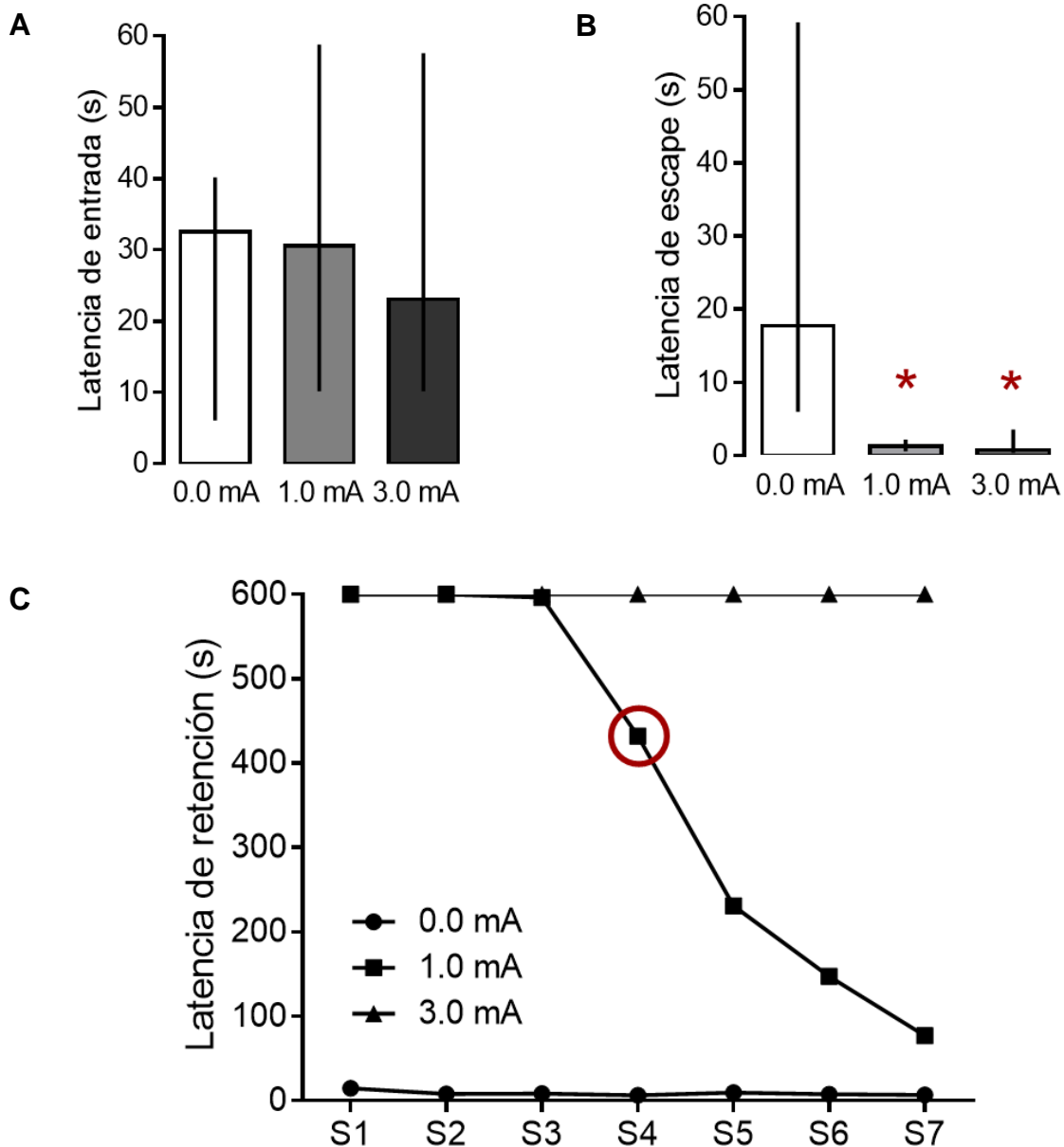


Figura 11. A Latencia de entrada al compartimento de castigo. No se observan diferencias entre los grupos. **B** Latencia de escape del compartimento de castigo. Los grupos entrenados con 1.0 mA y con 3.0 mA difieren del grupo 0.0 mA ($p < 0.01$). Los círculos en cada barra representan el desempeño de cada animal. **C** Latencia de retención por sesión de extinción para las tres condiciones experimentales en la tarea de EI. El círculo indica el momento en el que la latencia de retención comienza a diferir con respecto a la primera sesión. Todos los resultados se muestran en medianas con rangos intercuartilares. * $p < 0.01$ con respecto al grupo 0.0 mA.

IX. EXPERIMENTO II: cuantificación de la proporción de núcleos positivos a pCREB en el hipocampo dorsal bajo condiciones de entrenamiento moderado e incrementado

1. Método y diseño experimental

Se emplearon 20 ratas de la cepa Wistar, las cuales, fueron manipuladas durante 5 minutos por 3 días. Los sujetos fueron entrenados en la tarea de EI, asignándose al azar a los siguientes grupos (n = 4, por grupo): un grupo **Bioterio (Bio)** que permaneció en del bioterio del laboratorio hasta el día de su sacrificio; un grupo **contexto (0.0 mA)**, que fue entrenado, pero al que no se administró choque eléctrico para determinar si la exploración al contexto cambia la proporción de núcleos pCREB positivos; un grupo de **sólo choque (3.0 mA)** que fue colocado directamente en el compartimento de castigo para recibir el choque de 3.0 mA durante 5.6 s (ya que este tiempo es equivalente al tiempo que recibieron el choque el grupo entrenado con 3.0 mA) para saber si la expresión de pCREB era inducida sólo por la administración del choque eléctrico sin entrenamiento; un grupo de **entrenamiento moderado (1.0 mA)**, y uno de **entrenamiento incrementado (3.0 mA)**, donde las ratas fueron entrenadas con los mismos parámetros ya descritos. Una hora después del entrenamiento, se extrajeron los cerebros y se almacenaron a -70 °C. Posteriormente, se procesó el tejido con la técnica de inmunohistoquímica para la detección de pCREB y DAPI. Finalmente, se realizó la captura y el análisis de las imágenes del GD, área CA1 y área CA3 del hipocampo dorsal (Fig.12).

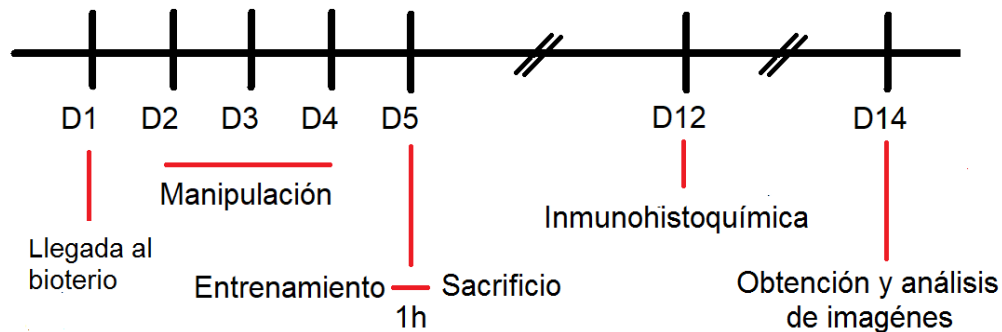


Figura 12. Línea temporal de las distintas fases del experimento II

2. Resultados

2.1 Cambios en la proporción de núcleos pCREB positivos en el GD

Se decidió unir los datos encontrados en ambos hemisferios para analizarlos con la prueba ANOVA de una vía, la cual, reportó diferencias significativas entre grupos ($F_{(4, 15)} = 11.297$, $p = 0.0002$). Las comparaciones entre pares de grupos con el post hoc Bonferroni revelan que el grupo Bio es diferente al grupo SCh ($p = 0.0162$), al grupo entrenado con 1.0 mA ($p = 0.0047$) y al grupo entrenado con 3.0 mA ($p < 0.0001$). Se observa que el grupo entrenado con 0.0 mA difiere del grupo entrenado con 3.0 mA ($p = 0.0002$). Se revelaron diferencias entre el grupo entrenado con 1.0 mA al compararlo con el grupo entrenado con 3.0 mA ($p = 0.009$). Se muestra que el grupo SCh es diferente al grupo entrenado con 3.0 mA ($p = 0.0026$). No hubo diferencias significativas cuando se realizaron comparaciones entre los grupos restantes (Fig. 13 y Fig. 14).

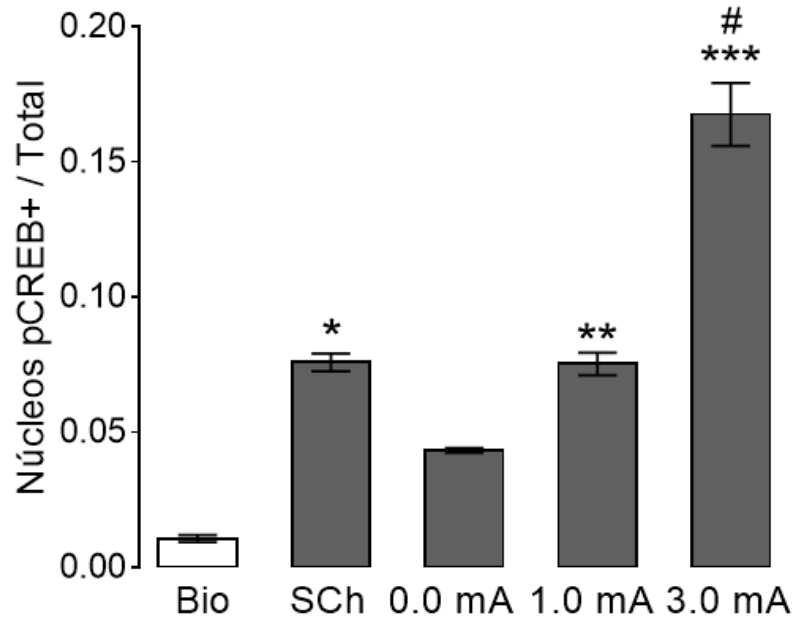


Figura 13. Proporción de núcleos pCREB positivos en el GD del hipocampo dorsal de cada grupo estudiado, observada una hora después de haber sido entrenadas en la tarea de EI, donde se comparan entre sí los distintos grupos experimentales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, con respecto a Bio. # $p < 0.001$ contra todos los grupos.

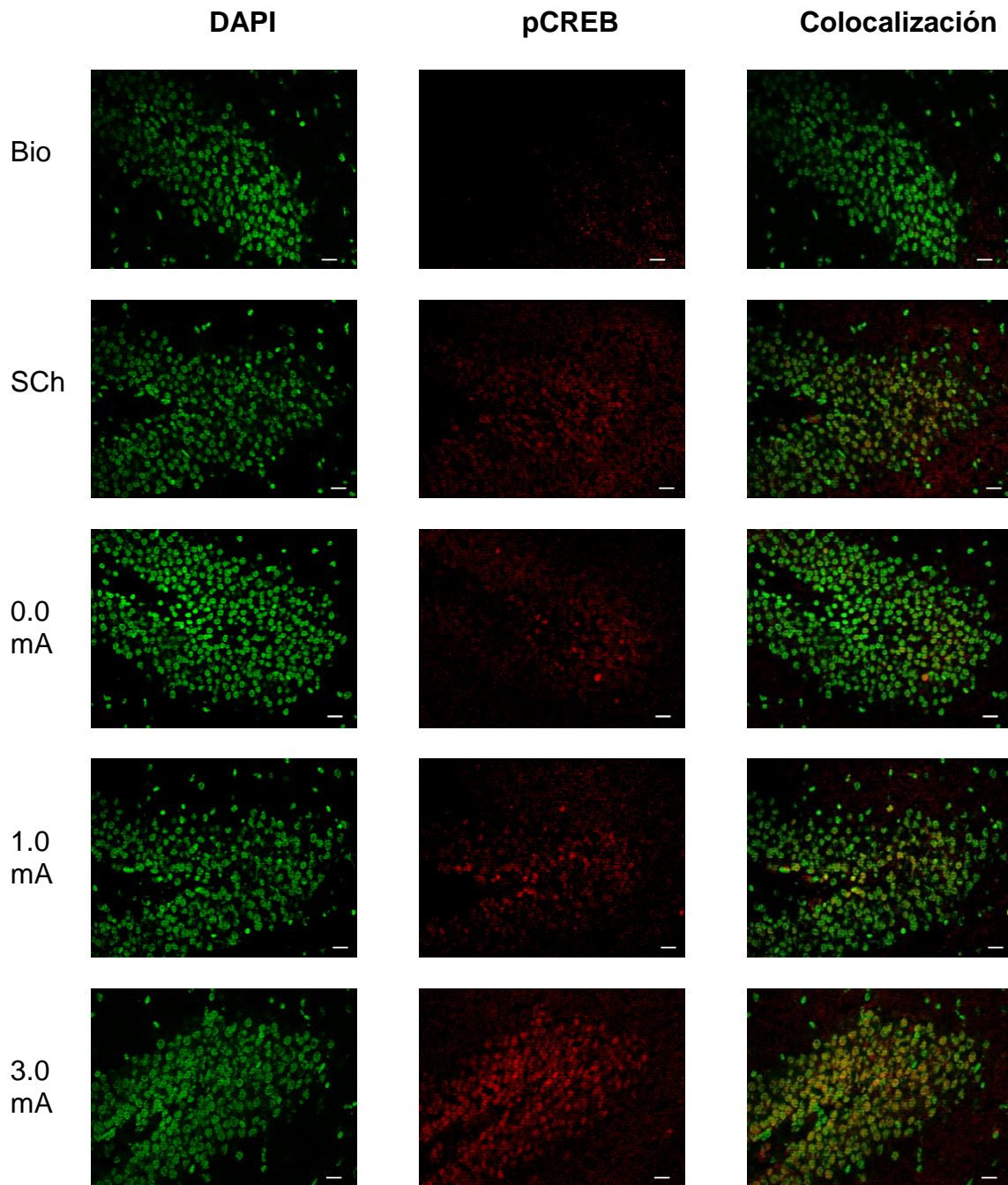


Figura 14. Imágenes representativas de núcleos pCREB positivos en el GD. En la primera columna se muestra en verde a los núcleos teñidos con DAPI. En la segunda columna se muestra en rojo a pCREB. En la tercera columna se presenta la colocalización de ambas imágenes. Todas las imágenes se muestran con una escala de 20 μm .

2.2 Cambios en la proporción de núcleos pCREB positivos en el área CA1

La prueba ANOVA de una vía reveló diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($F_{(4, 15)} = 19.077, p < 0.0001$). El post hoc Bonferroni muestra que el grupo Bio tiene una proporción estadísticamente menor que los grupos entrenados con 1.0 mA ($p = 0.001$) y con 3.0 mA ($p < 0.0001$). El grupo entrenado con 0.0 mA muestra ser estadísticamente diferente de los grupos entrenados con 1.0 mA ($p = 0.0235$) y con 3.0 mA ($p < 0.0001$). La comparación entre el grupo entrenado con 1.0 mA con el grupo entrenado con 3.0 mA resulta significativa ($p = 0.0013$). Se observan diferencias entre el grupo de SCh con respecto al grupo entrenado con 3.0 mA ($p < 0.0001$) (Fig. 15 y 16)

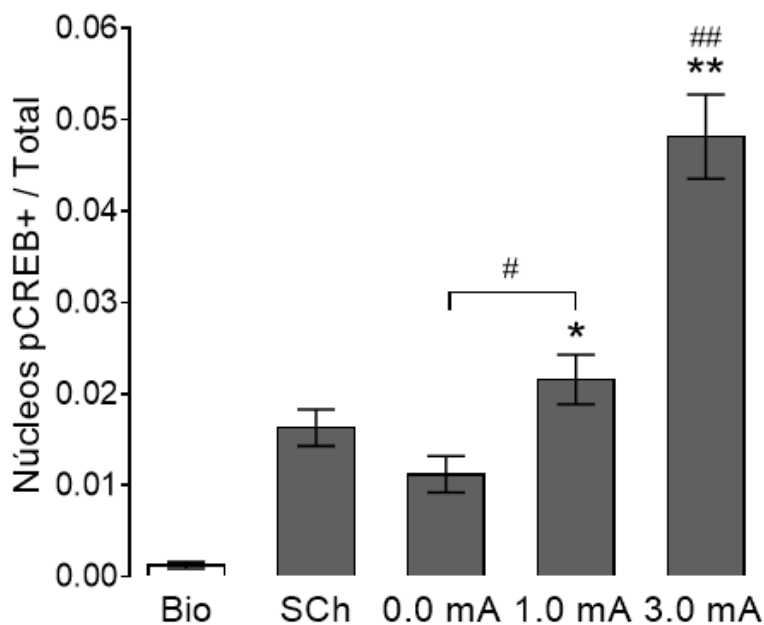


Figura 15. Proporción total de núcleos pCREB positivos en el CA1 del hipocampo dorsal de ratas observadas una hora después de haber sido entrenadas en la tarea de EI, comparando entre los distintos grupos experimentales. Al no haber diferencias entre hemisferios se unieron los datos para el análisis. * $p < 0.001$, ** $p < 0.0001$ con respecto a Bio. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ a 0.0001 contra todos los grupos.

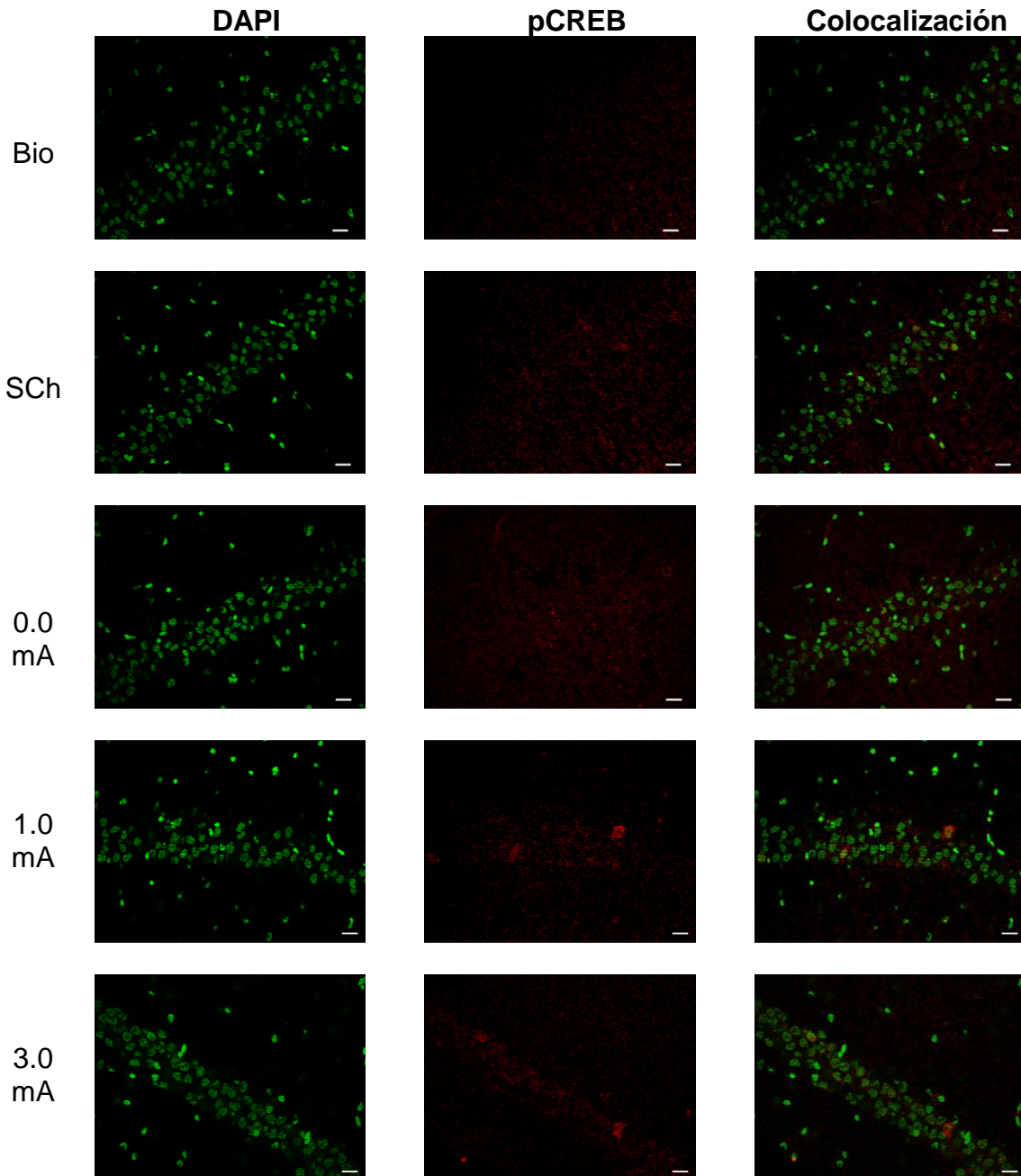


Figura 16. Imágenes representativas de núcleos pCREB positivos en el área CA1. En la primera columna se muestra en verde a los núcleos teñidos con DAPI. En la segunda columna se muestra en rojo a pCREB. En la tercera columna se presenta la colocalización de ambas imágenes. Todas las imágenes se muestran con una escala de 20 μm .

2.3 Cambios en la proporción de núcleos pCREB positivas en el área CA3

Los datos encontrados en ambos hemisferios se analizaron con la prueba ANOVA de una vía encontrándose diferencias entre grupos ($F_{(4, 15)} = 11.706$; $p = 0.0002$). Las comparaciones entre pares de grupos con el post hoc Bonferroni muestran que el grupo Bio tiene una proporción de núcleos pCREB positivos menor que la de los grupos SCh ($p = 0.0152$) y del entrenado con 3.0 mA ($p < 0.0001$). Se reporta que el grupo entrenado con 0.0 mA es distinto al grupo entrado con 3.0 mA ($p = 0.0001$). Se observa que el grupo entrenado con 1.0 mA es diferente al grupo entrenado con 3.0 mA ($p = 0.0004$). La comparación entre el grupo de SCh con el grupo entrenado con 3.0 mA resultó estadísticamente significativa ($p = 0.0025$). No se encontraron diferencias cuando se realizaron comparaciones entre otros pares de grupos (Fig. 17 y Fig. 18).

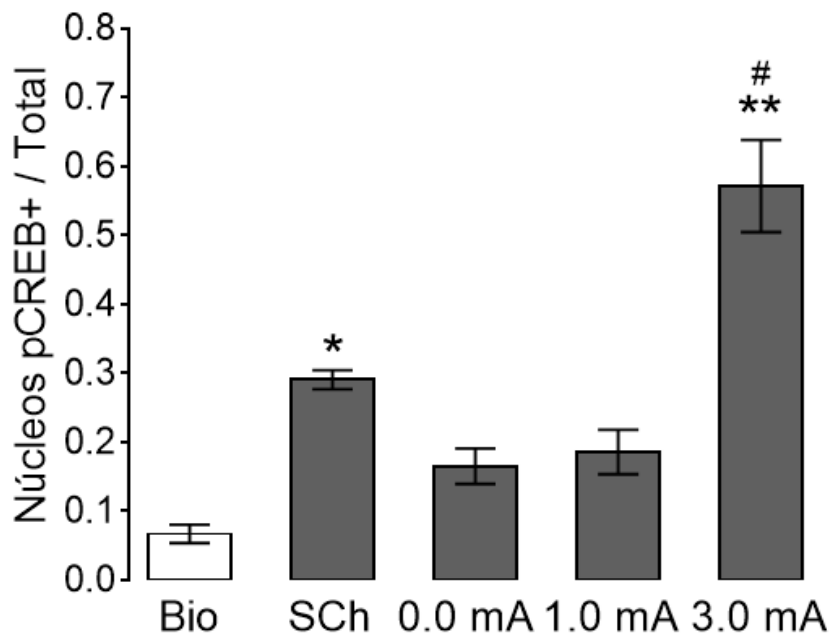


Figura 17. Proporción total de núcleos pCREB positivos en el área CA3 del hipocampo dorsal de ratas observadas una hora después de haber sido entrenadas en la tarea de El realizando comparaciones entre los distintos grupos experimentales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$ contra Bio, # $p < 0.01$ a 0.0001 contra todos los grupos.

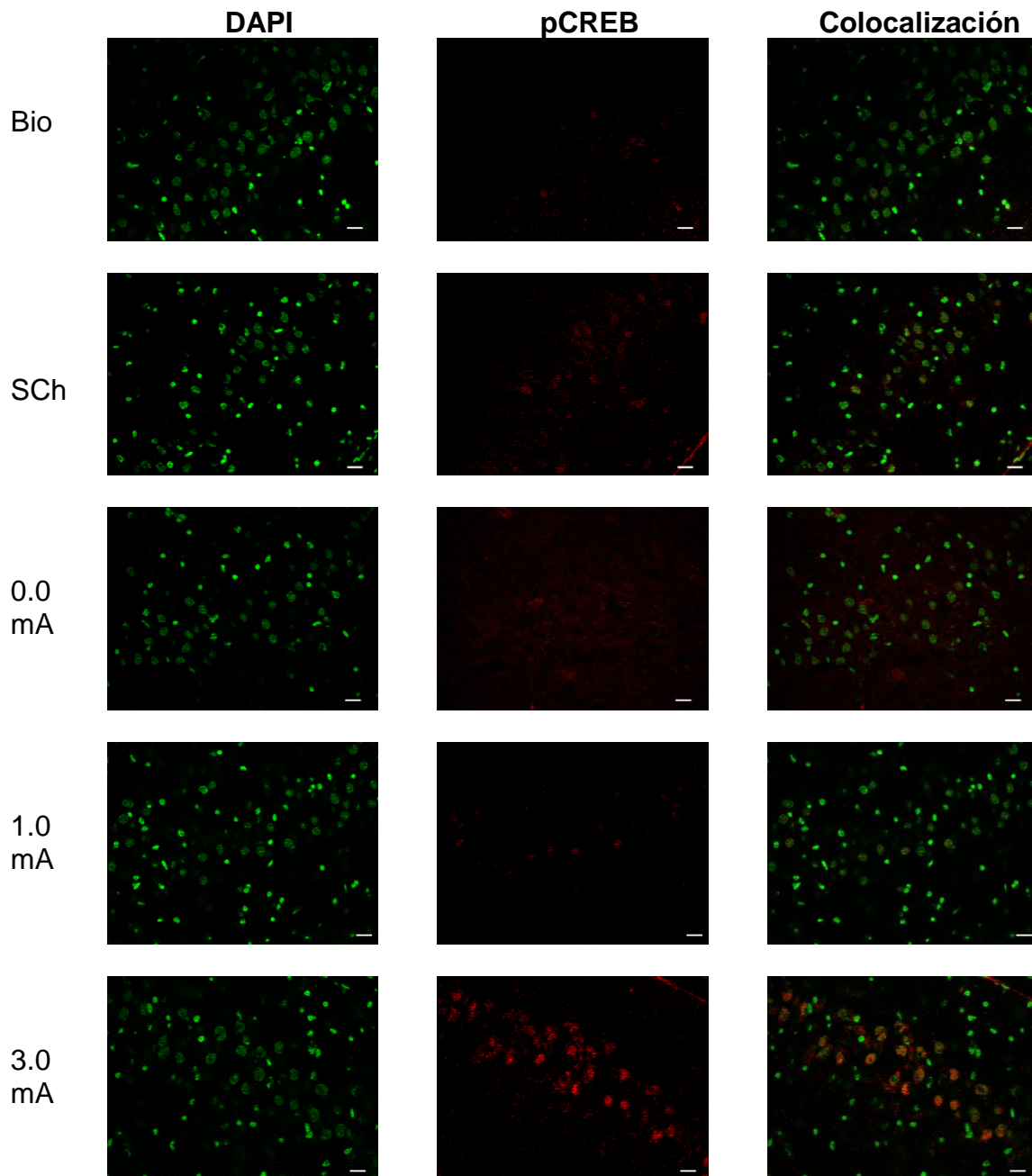


Figura 18. Imágenes representativas de núcleos pCREB positivos en el área CA3. En la primera columna se muestra en verde a los núcleos teñidos con DAPI. En la segunda columna se muestra en rojo a pCREB. En la tercera columna se presenta la colocalización de ambas imágenes. Todas las imágenes se muestran con una escala de 20 μ m.

2.4 Resumen de los resultados del experimento II

	SCh	0.0 mA	1.0 mA	3.0 mA
GD	↑	-	↑	↑ ^{+#}
Área CA1	-	-	↑ ⁺	↑ ^{+#}
Área CA3	↑	-	-	↑ ^{+#}

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos en la proporción de núcleos pCREB positivos en el GD, área CA1 y el área CA3 del hipocampo dorsal. Se muestra con flechas el cambio con respecto al grupo intacto. El símbolo ⁺ indica que el cambio es mayor con respecto al grupo entrenado con 0.0 mA. El # señala que el cambio es mayor con respecto al grupo entrenado con 1.0 mA.

XI. DISCUSIÓN

Las diferencias en las latencias de retención observadas en función de la intensidad del entrenamiento durante la extinción de la tarea de EI indican que el grupo entrenado con 1.0 mA muestra una resistencia a la extinción menor que el grupo entrenado con 3.0 mA, permitiendo considerarlos como entrenamiento moderado e incrementado, respectivamente, ya que lo que caracteriza al entrenamiento incrementado es su alta resistencia a la extinción (Prado-Alcalá et al., 1994; Garín-Aguilar et al., 2012; Bello-Medina et al., 2016; González-Franco et al., 2017).

Comprender la manera como sucede el proceso de consolidación de la memoria dentro del sistema nervioso nos brinda pautas para explicar por qué las experiencias más intensas tardan más en presentar un proceso de extinción. Si la experiencia incrementada de entrenamiento produce diferencias en la fortaleza de la memoria (medida a través de la extinción), entonces podríamos suponer que las diferentes velocidades de extinción se deben a que las memorias de las respuestas condicionadas originadas por las diferentes intensidades de entrenamiento están bajo control de diferentes mecanismos cerebrales de consolidación, a pesar de que se trata de una misma respuesta condicionada (Prado-Alcalá et al., 2007).

En general, los resultados de esta tesis muestran que ocurre un cambio en la proporción de núcleos pCREB positivos como consecuencia de la asociación entre el contexto y el choque eléctrico con la respuesta. Esto era de esperarse dado que la fosforilación de CREB está relacionada a la consolidación de la memoria debido a que esta molécula participa en la expresión de genes como BDNF, TH, GluR1, CRF, c-fos, entre otros, que son importantes para la plasticidad sináptica (Bernabeu et al., 1997; Impey et al., 1998; Cammarota et al., 2000; Viola et al., 2000; Bitner, 2012). Cabe mencionar que la plasticidad sináptica es un mecanismo que se ha empleado para explicar los cambios estructurales que se han sugerido se requieren para la consolidación de la memoria (Dudai, 2004). Sin embargo, la intensidad del entrenamiento es un parámetro que influye en el proceso de consolidación (Morris y Gold, 2012; Lamprecht y LeDoux, 2004; Viturera y Goda, 2013) y en los cambios estructurales que se asocian a la plasticidad sináptica (Bello-Medina et al., 2016). De esta forma, planteamos la posibilidad que la fosforilación de CREB fuese diferente en el hipocampo dorsal según la intensidad con la que se llevara a cabo el entrenamiento en la tarea de EI.

Se encontró que la proporción de núcleos pCREB positivos en el GD del grupo entrenado con 3.0 mA es diferente a todos los grupos experimentales y controles. Una estrategia para explicar lo anterior es analizando cómo las aferencias del GD modifican los niveles de neurotransmisores y neuromoduladores y de qué manera estos cambios se encuentran vinculados a la fosforilación de CREB y a la consolidación de la memoria. El GD recibe información proveniente de la CE y de los núcleos submiliares del hipotálamo (fibras que emplean en su mayoría glutamato), así como proyecciones noradrenérgicas del núcleo coeruleus, dopaminérgicas del área ventral tegmental y serotoninérgicas de los núcleos del rafe (Amaral, 1993; Buhl y Whittington, 2007; Prince et al., 2016). Es lógico suponer que la entrada de información al GD conlleve un aumento en los niveles de glutamato (Riedel y Micheau, 2001), noradrenalina (Mello-Carpes, da Silva de Vargas, Gayer, Roehrs e Izquierdo, 2016), dopamina (Bernabeu et al., 1999) y serotonina (Meneses, Manuel-Apolinar,

Castillo y Castillo, 2007). Se ha encontrado evidencia de que estos neurotransmisores están vinculados a un aumento en los niveles de pCREB (Izquierdo y Medina, 1997; Bernabeu et al., 1999; Wang et al., 2018). De esta manera, nuestros resultados podrían sugerir que durante el proceso de consolidación ocurre un aumento en los niveles de glutamato, dopamina, serotonina y noradrenalina que inducen un aumento en la proporción de núcleos pCREB positivos en el GD. Por otro lado, este incremento en la proporción de núcleos pCREB positivos podría vincularse con modificaciones estructurales reportadas en el GD luego de una experiencia de aprendizaje, como el incremento en la densidad de espinas dendríticas (O'Malley et al., 1998).

Los patrones de cambio en la proporción de núcleos pCREB positivos que fueron encontrados en el GD podrían ser explicados analizando su funcionalidad, la cual, ha sido descrita a través de la teoría de separación de patrones que propone que el GD mantiene la capacidad de transformar representaciones o recuerdos similares en representaciones muy diferentes (Leutgeb et al., 2007). Potencialmente, este mecanismo electrofisiológico estaría participando al momento de la entrada de la información en el GD realizando una distinción entre un entrenamiento moderado frente a uno incrementado, incluso aunque la información esté en un primer relevo de integración (Amaral et al., 2007).

Otro hallazgo de esta tesis fue que la proporción de núcleos pCREB positivos en el área CA1 es menor en el grupo entrenado con 1.0 mA en comparación con el grupo entrenado con 3.0 mA. La conectividad del área CA1 es importante para comprender su participación en el proceso de consolidación, ya que las diferentes aferencias y eferencias de esta subregión sugieren la posibilidad de una alta interacción de entradas sinápticas (Kaibara y Leuing, 1993). El área CA1 recibe aferencias provenientes de las colaterales de Schaffer (Amaral y Lavenex, 2007), del hipocampo contralateral (Witter, Groenewegen, Lopes Da Silva y Lohman, 1989) y la CE, a través de la vía perforante (Amaral, 1993). La gran mayoría de estas fibras son glutamatérgicas (Buhl y Whittington, 2007). Este aumento en los niveles de glutamato, como resultado de la

estimulación necesaria para el establecimiento de la memoria, activa a los receptores AMPA y NMDA, los cuales, incrementan la concentración de Ca^{2+} intracelular generando una mayor actividad de PKA y CaMKIV, las cuales, fosforilan a CREB (Izquierdo y Medina, 1997). Probablemente, el aumento de la intensidad del entrenamiento genere un incremento en la actividad de las aferencias del área CA1, lo cual, promovería un aumento en todos los pasos de la cascada anteriormente descrita y conduciría a una mayor proporción de núcleos pCREB positivos

La topografía de las aferencias sinápticas afecta a la integración de los impulsos nerviosos procedentes de sistemas aferentes específicos (Shepherd et al., 1985). Se sabe que hay dos proyecciones diferentes en la CE. Las proyecciones de la vía perforante surgen principalmente de la capa II y III de la CE (Witter y Amaral, 1991). Las células de la capa II proyectan casi exclusivamente al GD, al área CA3 y al área CA2; en cambio, las células de la capa III proyectan hacia el área CA1 y al Sub, siendo esta última proyección más robusta y organizada en el cerebro de la rata (Amaral, 1993). Probablemente, durante el entrenamiento incrementado las células de la capa III cambien su patrón de estimulación y, probablemente sea el motivo por el que, aunque hay un aumento en la proporción de núcleos pCREB positivos en el área CA1, éste no sea mayor que lo observado en el GD y el área CA3.

Esta diferencia en las aferencias de la CE nos permite explicar por qué se observa que la proporción de núcleos pCREB positivos en el área CA3 es mayor en el grupo entrenado con 3.0 mA en comparación con el resto de los grupos. Probablemente, las células de la capa II se encuentren más activas y, de esta manera, los receptores NMDA y AMPA se activen y desencadenen la cascada neuroquímica necesaria para la fosforilación de CREB.

Además, la CE se considera una estación que transmite señales de dolor al hipocampo (Liu y Chen, 2009). En este sentido la vía que existe entre la CE con el GD y el área CA3 envían proyecciones hacia áreas del tálamo y de la sustancia gris periacuaductal que se han relacionado con el procesamiento de estímulos

dolorosos (Prince, 2000), lo cual, brinda indicios para explicar por qué en el grupo de SCh se presentó un aumento en la proporción de núcleos pCREB positivos en el GD y el área CA3. Probablemente el patrón de activación de esta vía puede ser alterada por la intensidad del estímulo, sin llegar a inducir los cambios que se observan cuando ocurre un entrenamiento incrementado.

La funcionalidad del área CA1 y del área CA3 también nos brinda indicios para explicar estos cambios en la proporción de núcleos pCREB positivos. Se ha encontrado que la actividad eléctrica del área CA3 está relacionada a la codificación de nueva información (Basu y Siegelbaum, 2015). Por otro lado, área CA1 presenta una actividad eléctrica mayor en componentes de tipo espacial (Roth, Yu, Rao y Knierim, 2012). De hecho la tarea de EI tiene componentes de tipo espacial (Prado-Alcalá et al., 2012). La participación del área CA1 en este tipo de aspectos espaciales permite entender el aumento en la proporción de núcleos pCREB positivos en el grupo experimental que únicamente estuvo expuesto al contexto (grupo entrenado con 0.0 mA), pues se ha reportado una mayor activación de CREB como resultado de la exposición de contextos novedosos (Viola et al., 2000).

Cabe señalar que el área CA1 requiere de síntesis de proteínas *de novo* para mantener la información por largo plazo, mientras que el área CA3 no (Calixto et al., 2003). Esto plantea la necesidad de proponer otros mecanismos bioquímicos que expliquen el aumento de la proporción de núcleos pCREB positivos observados en estas dos áreas. Hay que considerar que este aumento la proporción de núcleos pCREB positivos podría relacionarse a una mayor liberación de corticosterona. Se ha reportado que los eventos estresantes inducen la liberación de corticosterona, la cual, facilita la consolidación de la memoria (Medina et al., 2007; Sandi y Rose, 1997) que directa o indirectamente actúa sobre el hipocampo dorsal (Kemp y Manahan-Vaughan, 2008) promoviendo la activación de las cascadas del AMPc (Finsterwald y Alberini, 2014) desencadenando con ello la fosforilación de CREB (Bitner, 2012). Se sabe que al aumentar los parámetros de intensidad para el entrenamiento se ocasiona un

incremento en los niveles de corticosterona (Gonzalez-Franco et al., 2017). De esta manera, los cambios en la proporción de núcleos pCREB positivos en la consolidación de la memoria de la tarea de El podrían ser resultado de la activación tanto de vías genómicas (Aakalu, Smith, Nguyen, Jiang, y Schuman 2001) como de vías no genómicas de los receptores a glucocorticoides (Chen, Bambah-Mukku, Pollonini y Alberini, 2012).

Particularmente, en el caso del entrenamiento incrementado, este aumento encontrado en el número de núcleos pCREB positivos, permite explicar por qué es posible la consolidación de la memoria aún ante tratamientos amnésicos, como los reportados por Rodríguez Serrano (2010), en donde la administración de anisomicina (un ISPs) en el hipocampo dorsal no interfiere con la consolidación de la memoria cuando se emplea un entrenamiento incrementado. Probablemente, la fosforilación de CREB sea la encargada de llevar estos procesos de consolidación, pues, como señala Díaz-Trujillo y colaboradores (2009), la activación de las proteínas preexistentes pueden ser las encargadas de llevar a cabo todos estos procesos de consolidación de la memoria que subyacen al entrenamiento incrementado. Otra evidencia que nos permite sustentar lo anterior es que los cambios postraduccionales, como la fosforilación, participan de manera más activa en la consolidación de la memoria (Routtenberg y Rekart, 2005).

Potencialmente, este tipo de investigación podría llevarnos a comprender la manera en que el sistema nervioso procesa la información de determinadas experiencias para poder guardarlas en forma más o menos permanente (Prado-Alcalá et al., 2012). De esta forma, los datos de esta tesis podrían ser evidencia que permitiría generar una posible explicación para los informes clínicos que mencionan que las experiencias más intensas o más recurrentes son las menos vulnerables a procesos amnésicos, lo cual, tiene evidentes implicaciones para la psicoterapia; pues muchas de las estrategias psicoterapéuticas necesitan entender la manera acerca de cómo se incorporan experiencias emocionales intensas y por qué éstas resultan difíciles de olvidar como ocurre en el trastorno de estrés postraumático (Sánchez-Castillo et al., 2014).

XII. CONCLUSIONES

1. El aumento en la intensidad del choque eléctrico en el entrenamiento de EI produce una mayor resistencia a la extinción en comparación con una intensidad baja de choque eléctrico.
2. El aumento en la proporción de núcleos pCREB positivos en las distintas áreas del hipocampo dorsal inducido por el entrenamiento incrementado podría estar relacionado a un aumento de la actividad neuronal que incluye una mayor liberación de neurotransmisores y corticosterona así como la activación de cascadas de segundos mensajeros que desembocan en la transcripción de genes asociados a la consolidación.
3. En el GD la proporción de núcleos pCREB positivos difiere entre el grupo con un entrenamiento moderado del grupo y el grupo con entrenamiento incrementado, probablemente porque la información se encuentra en un primer relevo de integración.
4. La proporción de núcleos pCREB positivos en el área CA1 es menor en el grupo con un entrenamiento moderado en comparación con el grupo con un entrenamiento incrementado, probablemente por una diferencia en los niveles de glutamato y Ca^{2+} intracelular, mismos que inducen una mayor actividad de la cascada de señalización del AMPc desencadenando con ello una mayor fosforilación de CREB.
5. En el área CA3, la proporción de núcleos pCREB positivos es mayor en el grupo con un entrenamiento incrementado en comparación al resto de los grupos, debido quizá a que las aferencias provenientes de la capa II de la CE se encuentran más activas, induciendo a una mayor activación de los receptores NMDA y AMPA desencadenando la cascada neuroquímica necesaria para la fosforilación de CREB.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aakalu, G., Smith, W.B., Nguyen, N., Jiang, C., y Schuman, E.M. (2001). Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron*, 30, 489-502
- Amaral, D. G. (1993). Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. *Current Opinion in Neurobiology*, 3, 225-229
- Amaral, D., G., Scharfman, H.E., y Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: Fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research*, 163, 3-22. DOI: 10.1016/S0079-6123(07)63001-5
- Amaral, D., y Lavenex, P. (2007). Hippocampal Neuroanatomy. En P. Andersen, R. Morris, D.G. Amaral, T. Bliss & O'Keefe. *The Hippocampus Book* (pp.37-114). EEUU: Oxford University Press.
- Ambrogio-Lorenzini, C.A., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., y Tassoni, G. (1996). Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: A tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Research*, 730, (1-2), 32-39
- Atkinson, R.C., y Shiffrin, R.M., (1968). Human Memory: A proposed System and Its Control Processes. *Psychology of Learning and Motivation*, 2, 85-195
- Bakker, A., Kirwan, C.B., Miller, M., y Stark, C.E. (2008). Pattern separation in the human hippocampal CA3 and Dentate Gyrus. *Science*. 319 (5870), 1640-1642, doi:10.1126/science.1152882
- Barzilai, A., Kennedy, T.E., Sweat, J.D., y Kandel, E.R. (1989). 5-HT modulates protein synthesis and the expression of specific proteins during long-term facilitation in Aplysia sensory neurons. *Neuron*, 2 (6), 1577-1586
- Basu, J., y Siegelbaum, S.A., (2015). The Corticohippocampal Circuit, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.*, 7 (11), pii: a021733, doi:10.1101/cshperspect.a021733

- Bello-Medina, P.C., Flores, G., Quirarte, G.L., McGaugh, J.L., y Prado-Alcalá, R.A. (2016). Mushroom spine dynamics in médium spiny neurons of dorsal striatum associated with memory of moderate and intense training. *Proceedings of the National Academy of the Sciences*, 113 (42), E6516 – E6525
- Bernabeu, R., Cammarota, M., Izquierdo, I., y Medina, J.H. (1997). Involvement of hippocampal AMPA glutamate receptor changes and the cAMP/protein kinase A/ CREB-P signalling pathway in memory consolidation of an aversive task in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30 (8), 961-5
- Bitner, R.S. (2012). Cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation: a mechanistic maker in the development of memory enhancing Alzheimer's disease therapeutics. *Biochemical Pharmacology*, 83 (6): 705-14. doi: 10.1016/j.bcp.2011.11.009
- Bower, G.H., y Hilgard, E.R. (1989). *Teorías del aprendizaje (Segunda edición)*. México: Trillas.
- Buhl, E., y Whittington, M., Local circuits. En P. Andersen, R. Morris, D.G. Amaral, T. Bliss & O'Keefe. *The hippocampus book* (pp.297-315). EEUU: Oxford University Press.
- Calixto, E., Thiels, E., Klann, E. y Barrionuevo, G. (2003). Early maintenance of hippocampal mossy fiber-long-term potentiation depends on protein and RNA synthesis and presynaptic granule cell integrity. *The Journal of Neuroscience*. 23 (12), 4842-4849
- Cammarota, M., Bevilaqua, L.R., Ardenghi, P., Paratcha, G., Levi de Stein, M., Izquierdo, I., y Medina, J.H. (2000). Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Research: Molecular Brain Research*, 76 (1), 36-46

- Cappaert, N.L.M., van Strien, N.M., y Witter, M.P. (2015). Hippocampal Formation, En *The Rat Nervous System* (511-573). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-374245-2.00020-6
- Chance, P. (2001). *Aprendizaje y Memoria (Tercera Edición)*. México: Manual Moderno.
- Chen, D.Y., Bambah-Mukku, D., Pollonini, G., y Alberini, C.M. (2012). Glucocorticoid receptors recruit the CaMKII α -BDNF-CREB pathways to mediate memory consolidation. *Nature Neuroscience*, 15 (12), 1707-1714, doi:10.1038/nn.3266
- Cobos-Zapíaín, G.G., Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavez, M., Quirarte, G.L., Roldán, G., Díaz del Guante, M.A., y Prado-Alcalá, R.A. (1996). High level of foot-shock during inhibitory avoidance training prevents amnesia induced by intranigral injection of GABA antagonists. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65, 202-206
- Cohen, N.J., y Eichenbaum, H. (1993). *Memory, amnesia, and the hippocampal system*. EEUU: The MIT Press.
- Cohen, P. (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nature Cell Biology*, 4, E127-E130
- Cooper, E.C., y Lowenstein, D.H. (2003). *Hippocampus*. EEUU: John Wiley & Sons.
- Daumas, S., Halley, H., Frances, B., y Lassalle, J.M. (2005). Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: Differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampus subregions. *Learning and Memory*, 12, 375-382
- Díaz-Trujillo, A., Contreras, J., Medina, A.C., Silveyra-Leon, G.A., Antaramian, A., Quirarte, G.L., y Prado-Alcalá, R.A. (2009). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide,

- a protein synthesis inhibitor. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91 (3): 310-4, doi: 10.1016/j.nlm.2008.10.006
- Dudai, Y. (2004). The Neurobiology of Consolidations, or How Stable Is the Engram? *Annual Review of Psychology* 55, 51-86
- Durán-Arévalo, M., Cruz-Morales, S.E., y Prado-Alcalá, R.A. (1990). Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Research Bulletin*, 24, 725-727.
- Fanselow, M.S., y Down, H.W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampal functionally distinct structures? *Neuron*, 65, 7-19.
- Finsterwald, C., y Alberini, C.M. (2014). Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: from adaptive responses to psychopathologies. *Neurobiology of Learning and Memory*, 112, 17-29, doi: 10.1016/j.nlm.2013.09.017
- Galindo, L.E., Garín-Aguilar, M.E., Medina, A.C., Serafín, N, Quirarte, G.L., y Prado-Alcalá, R.A. (2008). Acquisition and retention of enhanced active avoidance are unaffected by interference with serotonergic activity. *Behavioural Brain Research*, 195, 153-158
- Garín-Aguilar, M.E., Díaz-Cintra, S., Quirarte, G.L., Aguilar-Vázquez, A., Medina, A.C., y Prado-Alcalá, R.A. (2012). Extinction procedure induces pruning of dendritic spines in CA1 hippocampus field depending on strength of training in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16, 6 (12), doi: 10.3389/fnbeh.2012.00012
- Garín-Aguilar, M.E., Medina, A.C., Quirarte, G.L., McGaugh, J.L., y Prado-Alcalá, R.A. (2014). Intense aversive training protects memory from the amnesic effects of hippocampal inactivation. *Hippocampus*, 24, 102-112
- Giachero, M., Calfa, G., y Molina, V.A. (2013). Hippocampal structural plasticity accompanies the resulting contextual fear memory following stress and fear conditioning. *Learning and Memory*, 20, 611-616

- Giordano, M. & Prado-Alcalá, R.A. (1985). Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen protective effect of negative reinforcer. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 24, 905-909
- Gómez-Lira, G., Lamas, M., Romo-Parra, H., y Gutiérrez, R. (2005). Programmed and induced phenotype of the hippocampal granule cells. *Journal of Neuroscience*, 25 (30), 6939-6946
- González-Franco, D.A., Ramírez-Amaya, V., Joseph-Bravo, P., Prado-Alcalá, R.A. y Quirarte, G.L. (2017). Differential Arc protein expression in dorsal and ventral striatum after moderate and intense inhibitory avoidance training. *Neurobiology of Learning and Memory*, 140 (2017), 17-26
- Horner, C.H. (1993). Plasticity of the dendritic spine. *Progress in Neurobiology*, 41 (3), 281-321.
- Impey, S., Smith, D.M., Obrietan, K., Donahue, R., Wade, C., y Storm, D.R. (1998). Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nature Neuroscience*, 1 (7), 595-601
- Ishikawa, A., y Nakamura, S. (2006). Ventral hippocampal neurons project axons simultaneously to the medial prefrontal cortex and amygdala in the rat. *Journal of Neurophysiology*, 96, 2134-2138
- Izquierdo, I., y Medina, J.H. (1997). Memory Formation: The sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, 68, 285-316
- Jarrard, L.E. (1993). On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behavioral and Neural Biology*, 60, 9-26
- Kaibara, T., y Leung, L.S. (1993). Basal versus apical dendritic long-term potentiation of commissural afferents to hippocampal CA1: a current-source density study. *The Journal of Neuroscience*, 13 (6), 2391-2404
- Kandel, E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294 (5544), 1030-1038

- Kandel, E.R., Kupfermann, I., e Iversen, S. (2013). Learning and Memory. En *Principles of neural science*. EEUU: McGraw-Hill
- Kemp, A., y Manahan-Vaughan, D. (2008). Beta-adrenoreceptors comprise a critical element in learning-facilitated long-term plasticity. *Cerebral Cortex*, 18 (6), 1326-1334
- Kim, J.J., y Fanselow, M.S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*. 256, 675-677
- Lamprecht, R., y LeDoux, J. (2004). Structural Plasticity and Memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5 (1), 45-54
- Leuner, B., Falduto, J., y Shors, T.J. (2003). Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 23 (2), 659-665
- Leutgeb, J.K., Leutgeb S., Moser, M.B., y Moser, E.I. (2007). Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of hippocampus. *Science*, 315 (5814), 961-966. DOI: 10.1016/j.tcb.2006.04.005
- Liu, M.G., y Chen, J. (2009). Roles of the hippocampal formation in pain information processing. *Neuroscience Bulletin*, 25 (5), 237-266
- Martínez Degollado, M. G. (2016). *Citoarquitectura de las espinas dendríticas de neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo en la consolidación de la memoria de un entrenamiento incrementado*. Tesis de maestría: UNAM.
- Martínez, I., Quirarte, G.L., Díaz-Cintra, S., Quiroz, C., y Prado-Alcalá, R.A. (2002). Effects of lesion of hippocampal fields CA1 and CA3 on acquisition of inhibitory avoidance. *Neurophychobiology*, 46, 97-103
- Mayr, B., y Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2 (8), 599 – 609
- Mazur, J.E. (2014). *Learning and Behavior*.UK: Pearson Education Limited.

- McGaugh, J.L. (1973). *Learning and memory: an introduction*. EEUU: Albion Pub. Co.
- Medina, A.C., Charles, J.R., Espinoza-González, V., Sánchez-Resendis, O., Prado-Alcalá, R.A., Roozendaal, B., y Quirarte, G.L. (2007). Glucocorticoid administration into the dorsal striatum facilitates memory consolidation of inhibitory avoidance training but not the context or footshock components. *Learning and Memory*, 14 (10), 673-677, doi:10.1101/lm.654407
- Mello-Carpes, P.B., da Silva de Vargas, L., Gayer, M.C., Roehrs, R., e Izquierdo, I. (2016). Hippocampal noradrenergic activation is necessary for object recognition memory consolidation and can promote BDNF increase and memory persistence. *Neurobiology of Learning and Memory*, 127, 84-92, doi:10.1016/j.nlm.2015.11.014
- Meneses, A., Manuel-Apolinar, L., Castillo, C., y Castillo, E. (2007). Memory consolidation and amnesia modify 5-HT₆ receptors expression in rat brain: an autoradiographic study. *Behavioral Brain Research*, 178 (1), 53-61
- Mizuno, M., Yamada, K., Maekawa, N., Saito, K., Seishima, M., y Nabeshima, T. (2002). CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. *Behavioural Brain Research*, 133, 135-141
- Morris, K.A., y Gold, P.E. (2012). Age-related impairments in memory and in CREB and pCREB expression in hippocampus and amygdala following inhibitory avoidance training. *Mechanism of Ageing and Development*, 133 (5), 291-9. DOI: 10.1016/j.mad.2012.03.004
- National Research Council (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Academy of Science Ed.): EEUU.
- Netto, C.A., e Izquierdo, I. (1985). On how passive is inhibitory avoidance. *Behavioral Neural Biology*, 43 (3), 327-330.

- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. (2001). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México: SENASICA.
- O'Malley, A., O'Connell, C., y Regan, C.M. (1998). Ultrastructural analysis reveals avoidance conditioning to induce a transient increase in hippocampal dentate spine density in the 6 hour post-training period of consolidation. *Neuroscience*, 87 (3), 607-613.
- Paxinos, G., y Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press: EEUU.
- Pierce, W.D., y Cheney, C.D. (2004). *Behavior Analysis and Learning*. EEUU: LEA.
- Pohle, W., Acosta, L., Ruthrich, H., Krug, M., y Matthies, H. (1987). Incorporation of ³H-fucose in rat hippocampal structures after conditioning by perforant path stimulation and after LTP-producing tetanization. *Brain Research*, 410, 245-256.
- Poon, C.S., y Schmid, S. (2012). Nonassociative Learning. En: N.M. Seel (eds). *Encyclopedia of the Science of Learning*. EEUU: Springer. DOI: 10.1007/978-1-4419-1428-6
- Prado-Alcalá, R.A., Medina, A.C., Serafín-Lopez, N., y Quirarte, G.L. (2012). Intense emotional experiences and enhanced training prevent memory loss induced by post-training amnesic treatments administered to the striatum, amygdala, hippocampus or substantia nigra. *Reviews in the Neurosciences*, 23 (5-6), 501-8
- Prado-Alcalá, R.A., Salado-Castillo, R., Quiroz, C., Garín-Aguilar, M.E., Díaz-Trujillo, A., Rivas-Aranciba, S., y Quirarte, G.L. (2007). Enhanced Learning Protects Brain against Effects of Amnesic Treatments (Cap. 9). En Bermúdez-Rattoni, F. (editor). *Neural plasticity and Memory. From: Genes to Brain Imaging*. EEUU: Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.

- Prince, D.D. (2000). Psychological and neural mechanisms of affective dimension of pain. *Science*. 288 (5472), 1769-1772.
- Prince, L.Y., Bacon, T.J., Tigaret, C.M., y Mellor, J.R. (2016). Neuromodulation of the Feedforward Dentate Gyrus-CA3 microcircuit. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 8, 32, DOI:10.3389/fnsyn.2016.00032
- Quiroz, C., Martínez, I., Quirarte, G.L., Morales, T., Díaz-Cintra, S., y Prado-Alcalá, R.A. (2003). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Experimental Brain Research*, 153, 400-402.
- Riedel, G., y Micheau, J. (2001). Function of hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 25 (4), 835-853.
- Rodríguez Serrano, L. M. (2010). *Efecto de la microinyección de anisomicina en el hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria de un aprendizaje mediado por niveles altos y bajos de reforzamiento*. Tesis de maestría: UNAM.
- Roth, E.D., Yu, X., Rao, G., y Knierim, J.J. (2012). Functional differences in the backward shifts of CA1 and CA3 place fields in novel and familiar environments. *Plos One*, 7 (4), e36035, DOI:10.1371/journal.pone.0036035.
- Routtenberg, A., y Rekart, J.L. (2005). Post-translational protein modification as the substrate for long-lasting memory. *Trends in Neurosciences.*, 28 (1), 12-19.
- Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavéz, M., Quirarte, G.L., Martínez-García, M.I., y Prado-Alcalá, R.A. (2011). Enhanced training protects memory against amnesia produced by concurrent inactivation of amígdala and striatum, amígdala and substantia nigra, or striatum and substantia nigra. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5 (83). DOI: 10.3389/fnbeh.2011.00083

- Sánchez-Castillo, H., Paz-Trejo, D., Vázquez-Ramírez, J., Zarate-González, P., y Migliaro, M. (2014). Neurobiology of posttraumatic stress disorder (PTSD) and its frontostriatal implications: a short review. *Actualidades en Psicología*, 28 (117), 13-20.
- Shepherd, G.M., Brayton, R.K., Miller, J.P., Segev, I., Rinzel, J., y Rall, W. (1985). Signal enhancement in distal cortical dendrites by means of interactions between active dendritic spines. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 82 (7), 2192-2195.
- Silva, A., J., Kogan, J.H., Frankland, P.W., y Kida, S. (1998). CREB y memoria. *Annual Review of Neuroscience*, 21 (1), 127 – 148.
- Skinner, B.F. (1938). *The behavior of organisms: an experimental analysis*. New York: Appleton-Century-Crofts.
- Skinner, B.F. (1953). *Science and human behavior*. EEUU: Free Press.
- Spruston, N., y McBain, C. (2007). Structural and Functional Properties of Hippocampal Neurons. En P. Andersen, R. Morris, D.G. Amaral, T. Bliss & O'Keefe (2009). *The hippocampus book* (pp.133-202): Oxford University Press.
- Strange, B.A., Witter, M.P., Lein, E.S., y Moser, E.I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews*, 15, 655-699, doi: 10.1038/nrn3785
- Taubenfeld, S.M., Wiig, K.A., Bear, M.F., y Alberini, C.M. (1999). A molecular correlate of memory and amnesia in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, 2 (4): 309-310.
- Trifilieff, P., Herry, C., Vanhoutte, P., Caboche, J., Desmedt, A., Riedel, G., Mons, N., y Micheau, J. (2006). Foreground contextual fear memory consolidation requires two independent phases of hippocampal ERK/CREB activation. *Learning and Memory*, 13 (3): 349-358. DOI: 10.1101/lm.80206.

- Vazdarjanova, A., Ramírez-Amaya, V., Insel, N., Plummer, T.K., Rosi, S., Chowdhury, S., Mikhael, D., Worley, P.F., Guzowski, J.F., y Barnes, C.A. (2006). Spatial exploration induces ARC, a plasticity related immediate-early gene only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the rat forebrain. *The Journal of Comparative Neurology*, 498 (3), 317-329. doi: 10.1002/cne.21003
- Viola, H., Furman, H., Izquierdo, L.A., Alonso, M., Barros, D.M., de Souza, M.M., Izquierdo, I., y Medina, J.H. (2000). Phosphorylated cAMP response element-binding protein as a molecular marker of memory processing in rat hippocampus: effect of novelty. *Journal of Neuroscience*, 20 (23), RC112.
- Vitureira, N., y Goda, Y. (2013). Cell biology in neuroscience: the interplay between Hebbian and homeostatic synaptic plasticity. *Journal of Cell Biology*, 203 (2), 175-86. doi: 10.1083/jcb.201306030
- Walker, M.C., Ruiz, A., y Kullmann, D.M. (2002). Do mossy fibers release GABA? *Epilepsia*, 43, 196-202.
- Wang, X.L., Gao, J., Wang, X.Y., Mu X.F., Wei, S., Xue, L., y Qiao, M.Q. (2018). Treatment with Shuyu capsule increases 5-HT_{1A}R level and activation of cAMP-PKA-CREB pathway in hippocampal neurons treated with serum from a rat model of depression. *Molecular Medicine Reports*, 17 (3), 3575-3582.
- Witter, M.P., Groenewegen, H.J., Lopes Da Silva, F.H., y Lohman, A.H.M. (1989). Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of hippocampal region. *Progress in Neurobiology*, 33, 161-253.
- Witter, M.P., y Amaral, D.G. (1991). Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *The Journal of Comparative Neurology*, 307 (3), 437-459.
- Ye, X., Kapeller-Libermann, D., Travaglia, A., Inda, M.C., y Alberini, C.M. (2017). Direct dorsal hippocampal-prelimbic cortex connections strengthen fear memories. *Nature Neuroscience*, 20, 52-61. DOI: 10.1038/nn.4443