



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTO DE LA ADQUISICIÓN DE LA TAREA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL
CONTEXTO SOBRE LA FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR A GLUCOCORTICOIDES EN
EL HIPOCAMPO DORSAL Y VENTRAL**

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

PRESENTA:
RENATA PONCE LINA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. GINA LORENA QUIRARTE
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

DR. FRANCISCO SOTRES BAYÓN
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2020



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.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje (B-04) del departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, así como en el Laboratorio de Bioquímica de Hormonas (D-01) del departamento de Neurobiología Celular y Molecular, ambos pertenecientes al Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. El proyecto estuvo financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) No becario 395852 y N° de beca 251634, así como por PAPIIT-DGAPA Universidad Nacional Autónoma de México (IN204118, IN201817 y IN207018).

Agradecimientos

- A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Instituto de Neurobiología (INB) por todo el apoyo dado a mi desarrollo académico y personal.
- Al CONACyT por el apoyo económico otorgado.
- A las Dras. Gina Quirarte y Maricela Luna por darme la oportunidad de trabajar en sus laboratorios y permitir el desarrollo de mis ideas, así como por sus enseñanzas y consejos académicos y personales.
- A los integrantes del Laboratorio de Memoria y Aprendizaje (B-04), en especial al Dr. Roberto Prado, a la M. V. Z. Norma Serafín, a la Dra. Cristina Medina y a la Señora Bertha Islas Rivas.
- A los integrantes del Laboratorio de Bioquímica de Hormonas (D-01), en especial al Dr. Carlos Arámburo y a la M. en C. Martha Carranza.
- Al personal que labora en el Bioterio del INB, en especial al M.V.Z. Martín García Servín, a la Dra. Alejandra Castilla León y a la Dra. María A. Carbajo Mata.
- A los encargados de la Biblioteca del Campus Juriquilla, el Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela y la Lic. Soledad Medina Malagón.
- A la Dra. Nuri Aranda López y Leonor Casanova de la Unidad de Enseñanza del INB.
- A la Lic. Ma. de Lourdes Lara Ayala encargada del servicio de videoconferencia.
- A la Unidad de Cómputo del INB, en especial al Ing. Ramón Martínez Olvera, al Ing. Omar González Hernández y a la Ing. María Eugenia Rosas Alatorre.
- Al personal que labora en la Unidad de Microscopía, especialmente a la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos.
- Al Dr. Ataulfo Martínez por todo el apoyo brindado durante mi estancia en el INB.

DEDICATORIA

**A mis padres
Laura Lina y Feliciano Ponce**

ÍNDICE

	Página
Índice de tablas y de figuras	i
Lista de abreviaturas	ii
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes	5
2.1. El condicionamiento de miedo al contexto (CMC)	5
2.1.1. Circuito neural del CMC	6
2.2. Participación del hipocampo en el CMC	8
2.3. Los glucocorticoides (GCs)	10
2.3.1. El receptor a glucocorticoides (GR)	13
2.3.2. Distribución del GR en el hipocampo y su participación en el CMC	16
3. Justificación	17
4. Objetivos	18
5. Hipótesis	18
6. Materiales y métodos	19
7. Resultados	31
8. Discusión	41
9. Conclusión	48
10. Contribución del estudiante en el proyecto	48
11. Referencias	49
12. Apéndice A	60
13. Apéndice B	61
14. Apéndice C	62

Índice de tablas y de figuras

	Página
Figura 1. Efecto de la fosforilación del GR en su localización y función en la célula.	15
Figura 2. Protocolo conductual del CMC	20
Figura 3. Protocolo para la obtención de muestras	22
Figura 4. Promedio del porcentaje de congelamiento por minuto	32
Figura 5. Promedio del porcentaje de congelamiento de cada sesión	32
Figura 6. Análisis “en ciego” del porcentaje de congelamiento	33
Figura 7. Correlación de los resultados de congelamiento obtenido con el método manual y el automatizado	34
Figura 8. Concentración de CORT en suero de ratas	34
Figura 9. Densitometría del GR total y fosforilado en Ser232 and Ser246	35
Figura 10. Distribución de la inmunoreactividad del GR total en las diferentes subregiones ventrales y dorsales del hipocampo	36
Figura 11. Distribución de la inmunoreactividad del GR fosforilado en Ser232 o Ser246 en diferentes subregiones dorsales del hipocampo	37
Figura 12. Distribución de la inmunoreactividad del GR fosforilado en Ser232 o Ser246 en diferentes subregiones ventrales del hipocampo	38
Figura 13. Expresión de genes regulados por el GR en las subregiones dorsales del hipocampo	40
Figura 14. Expresión de genes regulados por el GR en las subregiones ventrales del hipocampo	41
Figura 15. Modelo propuesto de los efectos del entrenamiento en el CMC sobre la fosforilación del GR	42
Tabla 1. Grupos experimentales	21
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes	28

Lista de abreviaturas

ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF1	Función de activación 1
AF2	Función de activación 2
am	Antes del meridiano
ANOVA	Análisis de varianza
RNA	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AVP	Vasopresina
BA	Núcleo basal de la amígdala
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
BLA	Núcleo basolateral de la amígdala
C	Cisteína
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
CA1	Subregión CA1 del hipocampo
CA2	Subregión CA2 del hipocampo
CA3	Subregión CA3 del hipocampo
CBG	Globulina de unión a glucocorticoides
CDK	Cinasas dependientes de ciclina
cDNA	Hebra complementaria del ADN
CEA	Núcleo central de la amígdala
cm	Centímetro
CMC	Condicionamiento de miedo al contexto
CMT	Condicionamiento de miedo al tono
CO ₂ H	Carboxilo terminal
CORT	Corticosterona
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
dB	Decibeles
DBD	Dominio de unión al ADN
DH	Hipocampo dorsal
EC	Estímulo condicionado
EE	Error estándar
EI	Estímulo incondicionado
g	Unidad de aceleración de la gravedad
GABA	Neurotransmisor ácido γ -aminobutírico
GCs	Glucocorticoides
GD	Giro dentado del hipocampo
GILZ	Zipper de leucina inducido por glucocorticoides
GR	Receptor a glucocorticoides
gr	Gramo
GRE	Elemento de respuesta a glucocorticoides
GR α	Isoforma α del receptor a glucocorticoides
GR β	Isoforma β del receptor a glucocorticoides

GSK3	Cinasa 3 glicógeno sintasa
h	Hora
HD	Región dorsal del Hipocampo
HHA	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
Hsp90	Proteína de choque térmico 90
HV	Región ventral del hipocampo
ISH	Hibridación <i>in situ</i>
JNK	Cinasa c-Jun N-terminal
K ⁺	Ion potasio
Kd	Constante de disociación
L	Litro
LA	Núcleo lateral de la amígdala
LBD	Dominio de unión a ligando
LTP	Potenciación a largo plazo
LIMK1	Cinasa 1 de LIM
mA	Miliamperes
MAPK	Proteína cinasa de unión a mitógeno
mA	Miliamperio
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
mPFC	Corteza prefrontal media
MR	Receptor mineralocorticoides
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
N-terminal	Extremo amino terminal
Na ⁺	Ion sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH ₂	Amino terminal
ng	Nanogramo
nGRE	Elementos negativos de respuesta a glucocorticoides
nM	nano Molar
nm	nanómetro
NTD	Dominio de activación transcripcional en el extremo N-terminal
pH	potencial de hidrógeno
pSer	Serina fosforilada
PTSD	Desórdenes de estrés postraumático
PVN	Núcleo paraventricular del hipotálamo
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RC	Respuesta condicionada
RI	Respuesta incondicionada
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
Ser	Serina

SEM	Error estándar de la media
SGK1	Cinasa-1 regulada por glucocorticoides de suero
SNAP25	Proteína 25 asociada al sinaptosoma
TA	Temperatura ambiente
Thr	Treonina
VH	Hipocampo ventral
° C	Grados centígrados
µL	Microlitros

Resumen

La liberación de corticosterona durante la adquisición facilita la consolidación de la memoria del condicionamiento de miedo. Este efecto depende, entre otros factores, de la activación del receptor a glucocorticoides (GR). El GR es un factor transcripcional cuya actividad transcripcional y localización celular depende de su fosforilación. Investigamos el efecto del entrenamiento en el condicionamiento de miedo al contexto (CMC) sobre la fosforilación del GR en la serina 232 (pSer232), que induce la expresión de genes, y la serina 246 (pSer246), que inhibe la expresión de genes, en el hipocampo dorsal y ventral. Se entrenaron ratas macho (Wistar) con diferentes intensidades de choque eléctrico (0.0, 0.5, o 1.5 mA). A algunos animales se les realizó la prueba de retención de la memoria 48 h después del entrenamiento. El resto de los animales fueron sacrificados ya sea 15 min después del entrenamiento para la cuantificación de CORT en suero, o 1 h después de entrenamiento para la semicuantificación de la inmunoreactividad a GR total y a pSer232 o pSer246 en las subregiones CA1, CA2, CA3 y el giro dentado (GD) del hipocampo dorsal y ventral. Para correlacionar la fosforilación del GR con la expresión de genes, también se evaluó la expresión de seis genes regulados por el GR: *bdnf*, *map2k2*, *limk1*, *maoa*, *ndufv1* y *snap25*, en las subregiones CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo dorsal y ventral, 1 h después del entrenamiento. La prueba de retención de la memoria mostró que las ratas entrenadas con 0.5 y 1.5 mA aprendieron la tarea. Los niveles séricos de CORT aumentaron en los animales entrenados con 0.5 y 1.5 mA, siendo el último grupo el que mostró una mayor concentración de hormona. El entrenamiento no afectó la inmunoreactividad al GR total en ninguna subregión del hipocampo, contrario a la inmunoreactividad de las dos variantes fosforiladas del GR. Observamos un aumento de la inmunoreactividad a pSer246 en CA1 dorsal, así como en el GD ventral y dorsal, mientras que pSer232 aumentó en CA3 ventral. El entrenamiento aumentó la expresión de *maoa* en el hipocampo dorsal y ventral, así como de *ndufv1* en el hipocampo dorsal. La expresión de *limk1* disminuyó específicamente en CA1 dorsal. Estos resultados indican que durante la fase de adquisición del CMC se favorece la fosforilación de GR en el hipocampo en subregiones específicas, posiblemente para regular la expresión de genes que codifican proteínas que podrían estar participando en procesos plásticos por los cuales CORT facilita la consolidación de la memoria del miedo.

Abstract

Corticosterone (CORT) release during acquisition facilitates fear conditioning memory consolidation. This effect depends, among other factors, on glucocorticoid receptor (GR) activation. The GR is a transcriptional factor whose transcriptional activity and cellular localization depends on its phosphorylation. We investigated the effect of contextual fear conditioning (CFC) training on the phosphorylation of GR at serine 232 (pSer232), which induces gene expression, and at serine 246 (pSer246), which silence gene expression, in dorsal and ventral hippocampus. Male Wistar rats were trained with different foot-shock intensities (0.0, 0.5 or 1.5 mA). Some animals were tested for retention 48 h post-training. The rest of the animals was sacrificed either 15 min after training for serum CORT quantification, or 1 h after training for semiquantification of immunoreactivity to total GR and to pSer232 or pSer246 in dorsal and ventral CA1, CA2, CA3 and the dentate gyrus (DG). To correlate GR phosphorylation with gene expression, we also evaluated the expression of the GR-regulated genes: *bdnf*, *map2k2*, *limk1*, *maoa*, *ndufv1* and *snap25*, in dorsal and ventral CA1, CA2, C3 and DG subregions 1 h after training. Memory retention test showed that rats trained with 0.5 and 1.5 mA learned the task. CORT serum levels increased in animals trained with 0.5 and 1.5 mA, being the last group the one with higher hormone concentration. Training did not affect the immunoreactivity to total GR in any hippocampal subregion, but it did affect the immunoreactivity to the two GR-phosphorylated variants. We observe an increase of immunoreactivity to pSer246 in dorsal CA1, as well as in ventral and dorsal DG, while pSer232 increased in ventral CA3. Training increased the expression of *maoa* in overall dorsal and ventral hippocampus, and of *ndufv1* in dorsal hippocampus. Expression of *limk1* decreased specifically in dorsal CA1. These results suggest that during the acquisition phase of CFC, GR phosphorylation in the hippocampus is favored in specific subregions in order to affect the expression of genes whose coded protein could be participating in plasticity processes by which CORT facilitate fear memory consolidation.

1. Introducción

El estrés es la respuesta fisiológica a un estímulo o a una condición que altera el equilibrio homeostático de un organismo. Esta respuesta involucra la liberación de varias hormonas, incluidos los glucocorticoides (GCs), que además de regular procesos homeostáticos en el organismo, modulan procesos implicados en el aprendizaje y la memoria (Schwabe et al., 2012). El estudio de los efectos del estrés sobre la conducta aprendida se ha realizado entrenando animales, generalmente roedores, en tareas de aprendizaje que utilizan estímulos aversivos dentro de sus protocolos. Entre estas tareas se encuentra el condicionamiento de miedo al contexto (CMC), que consiste en asociar un contexto (estímulo condicionado, EC) con la respuesta de miedo que se genera en un animal al aplicarle un estímulo aversivo (estímulo incondicionado, EI) (Jacobs et al., 2010).

Los GCs facilitan la consolidación de la memoria de miedo al contexto a través de su unión con el receptor a glucocorticoides (GR) localizado en distintas áreas cerebrales (Donley et al., 2005; Pugh et al., 1997; Reis et al., 2015; Revest et al., 2005; Rodrigues & Sapolsky, 2009). El GR es un receptor nuclear que al acoplarse con su ligando se puede fosforilar en distintos aminoácidos ubicados en su región amino-terminal. Dependiendo del aminoácido fosforilado se afectará la localización del GR dentro de la célula (citoplasma o núcleo), así como el tipo de regulación transcripcional que ejercerá (expresión o silenciamiento de genes) (Sandi, 2003). Entre los genes que son regulados por el GR se encuentran algunos que codifican para proteínas que participan en distintos mecanismos de plasticidad sináptica, tales como el metabolismo energético, el catabolismo de neurotransmisores, la transducción de señales, cambios en la estructura neuronal, el transporte vesicular y el crecimiento neuronal, entre otros (Datson et al., 2008; Giese & Mizuno, 2013; Morsink et al., 2006).

El hipocampo es una de las regiones cerebrales que forman parte del circuito neural activado durante el CMC. Se ha demostrado que en ratas, la región dorsal del hipocampo está involucrada en el procesamiento de la información espacial (Jacobs et al., 2010), mientras que la región ventral participa en el procesamiento de la respuesta emotiva (Fanselow & Dong, 2010; Maren & Holt, 2004; Trivedi & Coover, 2004). A su vez, las subregiones CA1, CA2, CA3 y giro dentado (GD) del hipocampo dorsal y ventral, desempeñan funciones diferentes en las distintas etapas de aprendizaje durante el CMC (Hall et al., 2001; Hunsaker & Kesner, 2008; Ji & Maren, 2008; Kheirbek et al., 2013; Roy et al., 2017).

La adquisición del CMC requiere de la activación del GR hipocampal, especialmente en la región ventral del hipocampo (Donley et al., 2005). Considerando que la distribución del GR es heterogénea en las diferentes subregiones del hipocampo (Sarabdjitsingh et al., 2010), es posible que la activación del GR sea también distinta entre éstas durante la adquisición del CMC. En el presente trabajo se evaluó si la activación del GR, medida a través de su fosforilación, es afectada durante la adquisición del CMC en las diferentes subregiones del hipocampo dorsal y ventral.

Debido a que la expresión de genes, y eventualmente la síntesis de proteínas, forman parte de los procesos plásticos que ocurren durante la consolidación de la memoria de miedo a largo plazo (Ressler et al., 2002), analizamos si la fosforilación del GR está relacionada con la expresión de algunos genes regulados por este receptor y que participan en procesos de plasticidad cerebral en las diferentes subregiones del hipocampo dorsal y ventral. Con esta información se sabrá si la fosforilación del GR es uno de los posibles mecanismos por los que los GCs facilitan la adquisición de la memoria de miedo al contexto en el hipocampo.

2. Antecedentes

El estrés fisiológico es la respuesta que se genera en un individuo ante la presencia de un estímulo aversivo que altera su equilibrio homeostático. Como parte de esta respuesta, el cerebro inicia una serie de procesos fisiológicos y cognitivos que le permiten sobrevivir y adaptarse a ambientes aversivos o amenazantes (Schwabe et al., 2009). La respuesta fisiológica induce un estado de “activación” en el organismo que permite el inicio y el mantenimiento de acciones específicas y coordinadas conocidas como huir, pelear o congelarse, con el fin de evitar o eliminar el estímulo aversivo y regresar al estado de homeostasis (Ursin & Eriksen, 2004). Junto con esta respuesta se advienen procesos cognitivos que permiten la consolidación de la memoria de la información contextual relacionada con el momento en el que se presentó el estímulo aversivo para formar una memoria de miedo que le permita al individuo actuar de forma correcta cuando el estímulo se presente nuevamente.

El estudio de los procesos fisiológicos y moleculares implicados en el establecimiento de la memoria de miedo es importante para el entendimiento de la formación y el desarrollo de psicopatologías del miedo y de la ansiedad, tales como el estrés postraumático y las fobias, con el fin de optimizar los tratamientos disponibles e identificar nuevos blancos terapéuticos (Milton, 2019). Con este objetivo y como parte del entendimiento básico de las conductas aprendidas, se han desarrollado diversos protocolos conductuales o “tareas de aprendizaje” con componentes aversivos que, junto con técnicas fisiológicas, bioquímicas y de biología molecular, han permitido conocer los circuitos neurales y mecanismos de plasticidad celular involucrados en la formación de la memoria de miedo. Dentro de estas tareas se encuentran el condicionamiento de miedo, la evitación inhibitoria y el laberinto acuático. En este trabajo utilizamos el condicionamiento de miedo como modelo de estudio ya que es una tarea que implica aprendizaje puramente asociativo, es controlada completamente por el experimentador y requiere de una sola sesión de entrenamiento para generar una memoria de miedo duradera (Izquierdo et al., 2016; Milton, 2019).

2.1. El condicionamiento de miedo al contexto (CMC)

El CMC genera un aprendizaje de tipo clásico o Pavloviano en el que un contexto inofensivo o neutral, conocido como estímulo condicionado (EC), es asociado con un estímulo aversivo llamado estímulo incondicionado (EI) que genera una respuesta innata de miedo llamada respuesta incondicionada (RI) acompañada de la activación del sistema autónomo y

de la liberación de hormonas. Una vez asociados ambos estímulos, la presentación del EC por sí solo inducirá la generación de la respuesta de miedo, ahora llamada respuesta condicionada (RC) (Roozendaal et al., 2009).

La evaluación de la asociación del EC y del EI se realiza a través de la medición de la RC adecuada al modelo animal que, en el caso de roedores, comúnmente se realiza cuantificando el tiempo que permanece el animal en “estado congelado” o en “congelamiento” (del inglés “freezing”), que es una respuesta innata de miedo en la que se observa la ausencia de movimiento corporal excepto el de los músculos necesarios para la respiración. Dicha respuesta sirve para interrumpir el comportamiento del animal y fijar su atención en el estímulo aversivo, y se ha demostrado que correlaciona directamente con el grado de condicionamiento a lo largo de la tarea (Birbaumer et al., 2005). El congelamiento medido durante la presentación de ambos estímulos (sesión de entrenamiento o de adquisición) sirve para evaluar la memoria de corto plazo, mientras que si se mide posteriormente durante la presentación del EC sin la aplicación del EI (prueba de retención de la memoria), sirve para evaluar la consolidación de la memoria de largo plazo; esta última puede repetirse durante varias sesiones con el fin de observar el proceso de extinción de la respuesta de miedo (Jacobs et al., 2010).

2.1.1. Circuito neural del CMC

El estudio de las regiones que forman parte del circuito neuronal del miedo condicionado se ha hecho mediante el uso de varias estrategias experimentales, entre las que se encuentran las lesiones cerebrales electrolíticas y neurotóxicas en áreas específicas realizadas antes o después del entrenamiento para observar su efecto en las diferentes etapas (adquisición, consolidación, evocación y extinción) del CMC, así como registros electrofisiológicos y la cuantificación de genes de expresión temprana para detectar las áreas cerebrales activadas. Con estos procedimientos se ha modelado un circuito del miedo condicionado, cuyo funcionamiento se centra en la actividad de la amígdala para la generación del comportamiento defensivo (Orsini & Maren, 2012; Roozendaal et al., 2009).

La amígdala es una región cerebral localizada en el lóbulo temporal medio que agrupa más de diez núcleos que a su vez se dividen en subnúcleos (LeDoux, 2007). Existen tres grupos de núcleos importantes: 1) el grupo basolateral (BLA), que incluye al núcleo lateral (LA), al núcleo basal (BA) y al núcleo basal accesorio; 2) el grupo centromedial, compuesto de los núcleos medial y central (CE); 3) y un conjunto de núcleos que incluyen a las células intercaladas (Sah et al., 2003).

Durante la adquisición del CMC, la información relacionada con el EC y el EI llega al núcleo LA, especialmente a su región dorsal, donde se recibe información sensorial de varias modalidades: las aferencias relacionadas con el EC de carácter contextual provienen del hipocampo y de la corteza prefrontal media (Goosens & Maren, 2001), mientras que la información relacionada con el EI es transmitida al núcleo LA desde el tracto espino-talámico y regiones del tálamo posterior, así como desde áreas corticales que procesan estímulos nociceptivos (Medina et al., 2002).

Para la generación de las respuestas de miedo, la información del EC y del EI que ha llegado al LA es transmitida de forma directa o indirecta a través del BA hacia el CE, y de ahí a las regiones ventrolateral y medial del mismo núcleo, siendo este último la vía principal de salida de la amígdala hacia diferentes regiones cerebrales que median la expresión de la RC (LeDoux, 2007), conformada por la activación de procesos fisiológicos tales como la analgesia mediada por el área gris periacueductal, la hipertensión inducida por el hipotálamo lateral, y la activación de la respuesta endócrina (liberación de adrenalina y de glucocorticoides) iniciada en el núcleo paraventricular del hipotálamo, entre otros. Estas respuestas fisiológicas inducirán un estado de “activación” (del inglés “arousal”) en el individuo para tratar de evitar o de eliminar el estímulo aversivo a través de las conductas de alerta, de evitación y de congelamiento, mediadas por el núcleo del lecho de la estría terminal, el núcleo accumbens y la división ventral del área gris periacueductal, respectivamente (Maren, 2011).

Además de la respuesta de miedo generada durante la adquisición del CMC, se activan procesos cognitivos que permiten almacenar o consolidar la información contextual presente durante el evento aversivo y asociarlo con el estímulo nociceptivo. La formación de esta memoria contextual es parte de los mecanismos de adaptación de las especies que les permiten reconocer contextos aversivos similares y ejecutar la respuesta de miedo más adecuada para aumentar la probabilidad de sobrevivir a posteriores encuentros aversivos.

El contexto es el conjunto de elementos discretos de naturaleza material, temporal y espacial presentes de forma constante durante un episodio de aprendizaje (Maren & Holt, 2004). Esta información se adquiere de forma multisensorial y se procesa como una representación contextual compleja que se asocia con el estímulo aversivo para formar la memoria de miedo al contexto (Jacobs et al., 2010). Anteriormente se creía que el hipocampo era la estructura encargada de generar la representación de la información contextual y posteriormente enviarla hacia la amígdala para su consolidación y asociación con el estímulo

aversivo (Fanselow, 2010). Sin embargo, estudios recientes sugieren que además de procesar la información contextual, en el hipocampo también se consolida y se asocia con el estímulo aversivo, manteniendo activas sus conexiones con la amígdala y con estructuras corticales (Chaaya et al., 2018).

2.2. Participación del hipocampo en el CMC

El hipocampo es una estructura bilateral localizada en el lóbulo temporal medio, lateral al tálamo y medial a los cuernos inferiores de los ventrículos laterales. Su porción dorsal se encuentra detrás del septum, mientras que la región ventral abarca la zona temporal del cerebro (O'Keefe & Nadel, 1978). El hipocampo, junto con las regiones corticales adyacentes: giro dentado (GD), subículo y corteza entorrinal, son colectivamente llamados “formación hipocampal”, dentro de la cual pueden distinguirse las subregiones CA1, CA2 y CA3, en las que se observan diferencias en el tamaño y forma celular, así como en los patrones de conexión entre estas (Cooper & Lowenstein, 2002).

El circuito a través del cual se transmite la información dentro del hipocampo es conocido como “circuito trisináptico” en el que aferencias de la corteza entorrinal llegan al GD, posteriormente las fibras musgosas envían información hacia CA3, de donde salen colaterales de Schaffer que se dirigen hacia CA2 y de ahí a CA1, el cual es el principal sitio de salida de la información. Paralelo a este circuito, la corteza entorrinal puede inervar directamente las subregiones CA3, CA2 y CA1 a través de la “vía perforante”. Posteriormente las neuronas de CA1 mandan aferencias directa o indirectamente a través de su relevo en el subículo, hacia otras regiones del cerebro como la amígdala y la corteza prefrontal media, entre otras (Blair & Fanselow, 2014; Danielson et al., 2017).

La formación hipocampal es necesaria para la consolidación de la memoria declarativa o explícita (aquella que almacena hechos y eventos) en humanos, y de la memoria espacial en roedores (Kim & Diamond, 2002). En el CMC, el hipocampo es responsable de formar la representación de la configuración de los estímulos que forman parte del contexto a través del procesamiento de la información espacial, sensorial y temporal del evento aversivo (Lee et al., 2014; Moustafa et al., 2013). Cada subregión hipocampal tiene una función principal durante las diferentes etapas del CMC y se ha propuesto que esta funcionalidad cambia a lo largo del eje longitudinal del hipocampo, que en el caso de la rata involucra al eje dorsoventral (Czerniawski et al., 2009; Fanselow & Dong, 2010).

El hipocampo dorsal (HD) recibe información sensorial derivada de aferencias provenientes de las cortezas temporales y parietales (Blair & Fanselow, 2014; Hawley & Leasure, 2012), y su función principal es el reconocimiento y procesamiento de información contextual (Maren et al., 1997; Sanders et al., 2003; Trivedi & Coover, 2004). Estudios en donde se han lesionado las diferentes subregiones del HD durante la adquisición, muestran que la representación inicial del contexto se realiza en CA3 y posteriormente la codificación del contexto requiere del GD y de CA1 (principalmente en las células “de lugar” cuyo patrón de disparo se relaciona con las características del contexto específico donde ocurrió el condicionamiento de miedo), mientras que para la consolidación y evocación de la memoria se mantiene la actividad de CA1 y del subículo (Daumas et al., 2005; Ji & Maren, 2008; Kheirbek et al., 2013; Lee & Kesner, 2004; Maren, 2001; Phillips & LeDoux, 1992).

El hipocampo ventral (HV) está conectado con estructuras límbicas como la corteza prefrontal, el núcleo del lecho de la estría terminal, la amígdala y el hipotálamo, por lo que a esta región se le relaciona con funciones emotivas y de defensa (Blair & Fanselow, 2014; Hawley & Leasure, 2012; Kjelstrup et al., 2002). Las lesiones en la región ventral de CA1 disminuyen el congelamiento de los animales durante la prueba de retención de la memoria, y se ha observado que el condicionamiento refuerza aferencias monosinápticas que salen desde esta subregión y se dirigen hacia el BA de la amígdala, por lo que la región ventral de CA1 está involucrada principalmente en la consolidación de la información contextual asociada al estímulo aversivo (Hobin et al., 2006; Kim & Cho, 2020; Rodgers et al., 1999), mientras que la evocación de la memoria requiere de la participación de la región ventral del GD (Maren & Holt, 2004; Trivedi & Coover, 2004).

La adquisición del CMC estimula procesos de plasticidad neural en diferentes subregiones del hipocampo. Por ejemplo, en la región dorsal del GD aumenta la microglía y, al igual que la región dorsal de CA1, incrementa el número de células que expresan el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) (Chaaya et al., 2019); en las regiones dorsal y ventral del GD, así como en la región dorsal de CA3, se activa el proceso de neurogénesis, proceso que contribuye al mecanismo de separación de patrones de la información contextual (Huckleberry et al., 2018; Niibori et al., 2012; Singh et al., 2013); se observan cambios en la expresión de genes a lo largo del tiempo después del entrenamiento en CA1 y en CA3 (Hudgins & Otto, 2019; Mei et al., 2005; Mizuno et al., 2020); se inducen procesos epigenéticos como el aumento de la fosforilación de histonas en CA1 (Chwang et al.,

2006; Zovkic & Sweatt, 2013); se genera potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) en CA1 y en el GD (Sacchetti et al., 2001); se reacomodan receptores en las sinapsis, tales como los NMDAR, AMPAR, GABA, canales de iones y otras proteínas requeridas para aumentar la eficiencia sináptica (Bast et al., 2001; Hou et al., 2006; Mitsushima et al., 2011; More et al., 2018; Soler-Cedeño et al., 2019); se reorganizan distintas moléculas del citoesqueleto en procesos axonales y dendríticos en CA1 y en el GD; entre otros mecanismos (Chan et al., 2003; Lamprecht, 2011). Estos procesos de plasticidad regulan la consolidación de la memoria y son modulados por la actividad de moléculas provenientes de otros sistemas, entre las que se encuentran las hormonas del estrés, incluidos los glucocorticoides (GCs), que son liberadas como parte de la respuesta de miedo iniciada en el CE de la amígdala, los cuales además de actuar en los diferentes órganos periféricos, también influyen en la formación y el establecimiento de la memoria de miedo.

Los efectos cognitivos que ejercen los GCs dependen de su concentración y de la etapa de la memoria en la que estas hormonas son liberadas. Si la concentración de GCs aumenta antes, durante o inmediatamente después de la fase de adquisición facilitan la consolidación de la memoria, mientras que si estas hormonas son liberadas antes de la evocación deterioran la expresión de la memoria. El efecto facilitador de la consolidación depende a su vez de la concentración de la hormona en una relación que tiene forma de “-U- invertida”, ya que concentraciones bajas de GCs no ejercen ningún efecto sobre la memoria, concentraciones intermedias facilitan la consolidación y niveles elevados poseen efectos neurotóxicos en el cerebro (Conrad, 2005; Roozendaal, 2002). Estos efectos dependen de la activación de los receptores de los GCs distribuidos en distintas partes del cerebro, por lo que a continuación se explicará más a detalle la vía de acción de los GCs.

2.3. Los glucocorticoides (GCs)

El componente aversivo presente durante el entrenamiento de los animales en el CMC activa la respuesta de estrés, aumentando la concentración de las hormonas adrenalina, noradrenalina y GCs (McGaugh, 2000). Estas hormonas se liberan como parte de la respuesta de miedo generada en la amígdala cuando la información nociceptiva del EI llega al BLA, posteriormente se activa el CE, quien a su vez induce la activación de las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular (PVN, por sus siglas en inglés) del hipotálamo que liberan la hormona liberadora de corticotropina (CRH, por sus siglas en inglés) hacia el núcleo cerúleo para inducir la liberación de noradrenalina desde terminales nerviosas simpáticas, y

de noradrenalina y adrenalina desde la médula adrenal (Atzori et al., 2016; VanItallie, 2002). La activación del PVN también forma parte del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), en el que la CRH liberada junto con vasopresina, viajan desde la eminencia media, vía la circulación porta hasta la hipófisis anterior, donde estimulan sinérgicamente a los corticotropos o células productoras de proopiomelanocortina para secretar la hormona adrenocorticotrópica en la circulación sistémica y llegar a la zona fasciculata de la corteza adrenal, en donde activan a los receptores de melanocortina tipo 2 para iniciar la síntesis y secreción de GCs, los cuales son liberados inmediatamente a la circulación sistémica por difusión (Buckingham, 2006; Joëls & Karst, 2012).

La adrenalina es una sustancia que facilita la consolidación de la memoria en el CMC (Oliveira et al., 2018) pero debido a su carácter polar no atraviesa la barrera hematoencefálica (Weil-Malherbe et al., 1959), por lo que se ha propuesto que su efecto facilitador lo ejerce ya sea indirectamente a través del aumento en el proceso de glucogenólisis que libera glucosa en la sangre para aumentar su concentración en el cerebro donde funciona como mediador en la consolidación de la memoria a largo plazo (Oliveira et al., 2018), o a través de la activación de receptores β -adrenérgicos localizados en aferencias vagales que se dirigen hacia el núcleo del tracto solitario, de donde emergen distintas proyecciones a otras regiones que participan en procesos mnemotécnicos (Clayton & Williams, 2000). Por el contrario, los GCs son de carácter hidrofóbico y entran fácilmente al cerebro y se unen a sus receptores localizados en áreas implicadas en la regulación negativa del eje HHA (hipotálamo, hipófisis y corteza adrenal), así como en aquellas regiones que participan en la consolidación de la memoria de miedo (Roozendaal et al., 2009).

Los principales GCs endógenos son el cortisol y la corticosterona (CORT). Ambos esteroides son producidos en la mayoría de los mamíferos, pero la proporción en la que son secretados varía entre especies: en primates predomina el cortisol y en los roedores se produce principalmente CORT (Buckingham, 2006). Los GCs son liberados a la circulación sistémica en forma circadiana y pulsátil, de tal forma que en el nadir o el “valle”, es decir, bajo condiciones basales, en roedores se encuentran en concentraciones que varían en el rango de 0.173 – 0.346 ng/mL, y aumentan entre un 20% y 30% en el pico más alto del ritmo. Generalmente, este pico se presenta antes del inicio de la actividad del individuo, por lo que, en los animales diurnos como los primates, se genera en las primeras horas del día, y en los nocturnos, como los roedores, se presenta al anochecer. No obstante, durante la respuesta a

estrés los GCs aumentan su concentración directamente proporcional a la intensidad del estímulo estresante, llegando a alcanzar niveles de 100 ng/L (Joëls et al., 2008).

Una vez liberados a la circulación sistémica, los GCs atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica y llegan a todas las células en el cerebro, siendo activos en aquellas células que expresan sus receptores: el receptor a mineralocorticoides (MR, o tipo 1) y el receptor a glucocorticoides (GR, o tipo 2) (Joëls & Karst, 2012). Los MR poseen una gran afinidad a CORT, cortisol y aldosterona ($K_d \approx 0.5-2$ nM), mientras que el GR presenta una afinidad diez veces menor a cortisol y a CORT ($K_d \approx 5$ nM), no se unen con facilidad a la aldosterona y poseen gran afinidad por la hormona sintética dexametasona. Los MR y GR son receptores nucleares que funcionan como factores de transcripción dependientes de ligando y, a pesar de compartir un alto porcentaje de identidad en sus dominios de unión al DNA, se unen a conjuntos de genes diferentes, de los cuales menos del 30% se sobrelapan (Groeneweg et al., 2011).

La diferente afinidad que presentan ambos receptores hacia CORT es la base molecular de las distintas acciones que ejercen los GCs en el cerebro. En condiciones basales, la CORT está unida principalmente a los MRs, los cuales funcionan como sensores de los niveles basales de GCs y participan en la configuración de la respuesta inicial al estrés, afectan la magnitud de respuestas como el catabolismo de lípidos y de proteínas, la regulación de procesos inmunes e inflamatorios, el crecimiento celular y apoptosis, la modulación de la ingesta de alimentos y de la temperatura corporal, entre otras (Viho et al., 2019). Ante un evento aversivo incrementan los niveles de CORT y se saturan los MRs, por lo que la hormona se une a los GRs para la autoregulación negativa del eje HHA y reestablecer la homeostasis fisiológica del organismo, así como para permitir su adaptación a través de la modulación de procesos de memoria que le permitan recordar el evento aversivo y la respuesta fisiológica asociada (Buckingham, 2006; Van Eekelen et al., 1988).

En el CMC, los niveles de CORT en suero de ratas aumentan después del entrenamiento (Cordero et al., 1998). A pesar de que ambos receptores, los MR y los GR, están involucrados en la formación de la memoria de miedo (Brinks et al., 2009; Cordero et al., 1998; Donley et al., 2005; Zhou et al., 2011) la mayoría de los MRs se encuentran saturados al aumentar los niveles de CORT (Sandi, 2003). Debido a que estamos interesados en el estudio de los efectos del aumento de CORT sobre la memoria, este estudio se enfoca en la activación de los GRs.

2.3.1 El receptor a glucocorticoides (GR)

El GR puede mediar efectos rápidos (no genómicos) y lentos (genómicos). Los primeros se efectúan en el rango de minutos a través de mecanismos que involucran la activación de vías de transducción de señales, mientras que las acciones genómicas o lentas son procesos que duran horas y que dependen de la transcripción de genes *de novo* mediada por el GR (Kadmiel & Cidlowski, 2013). Ambos tipos de efectos son importantes para el aprendizaje de la tarea (Groeneweg et al., 2011; Prager & Johnson, 2009) sin embargo, debido a que queremos relacionar el aumento de CORT y la activación del GR con la expresión de genes que participan en procesos de plasticidad neural, en este trabajo nos enfocaremos en los efectos lentos que involucran efectos genómicos.

El GR es una proteína compuesta de ~780 residuos de aminoácidos, perteneciente a la superfamilia de receptores intracelulares que regulan la transcripción genética (Krstic et al., 1997). Es codificado por el gen *nr3c1* (conservado en humanos y roedores), que contiene nueve exones, de los cuales, el exón nueve genera las isoformas GR α y GR β por el método de corte y empalme (“splicing”), cuya diferencia radica en los últimos 40 aminoácidos de su extremo C-terminal. La isoforma GR β reside constitutivamente en el núcleo, es incapaz de unirse a la hormona y actúa como un inhibidor negativo dominante del GR α , antagonizando y moderando su actividad transcripcional, por lo que se ha sugerido que su principal función es la regulación de la sensibilidad de las células a los efectos de los GCs (Gallagher-Beckley & Cidlowski, 2009; Kino et al., 2009). Por otro lado, GR α es la isoforma funcionalmente clásica del GR y a la que nos referiremos en este trabajo; se localiza principalmente en el citoplasma, es capaz de unirse a la hormona y de translocar al núcleo, en donde afectará la expresión de genes ya sea uniéndose directamente al ADN o a través de su interacción con otros factores de transcripción (Lewis-Tuffin & Cidlowski, 2006).

La secuencia del GR posee varios dominios funcionales: un dominio de activación transcripcional “NTD” (por sus siglas en inglés) ubicado en el extremo N-terminal, un dominio central de unión al DNA “DBD”, una región flexible “bisagra” y un dominio de unión a ligando en el extremo C-terminal “LBD”. El dominio NTD funciona como un activador transcripcional llamado AF1 que permite el reclutamiento de co-reguladores y de maquinaria transcripcional. El dominio DBD está conservado en la superfamilia de receptores nucleares y contiene dos motivos “dedos de zinc” que reconocen y se unen a secuencias de nucleótidos específicas conocidas como “elementos de respuesta a glucocorticoides” (GRE, por sus siglas en inglés).

En el dominio LBD existe una segunda región activadora de la transcripción, AF2, y es el sitio de unión de los GCs. Por último, la región DBD/“bisagra” y el LBD contienen una señal de localización nuclear que permite la translocación del GR al núcleo mediante un mecanismo dependiente de importina (Necela & Cidlowski, 2003).

La vía de señalización de los efectos genómicos comienza con la unión de la hormona al GR ubicado principalmente en el citoplasma, en donde se encuentra unido a moléculas chaperonas (principalmente a las proteínas de choque térmico hsp90, hsp70, hsp56, p23 e inmunofilinas) que lo mantienen en una conformación de alta afinidad a la hormona (Joëls & Karst, 2012; Krstic et al., 1997; Scheschowitsch et al., 2017). Con la unión de la hormona las chaperonas se disocian, lo que induce que el GR cambie su conformación y esté disponible para ser fosforilado, lo cual además de alterar su funcionamiento y su localización dentro de la célula (Kadmiel & Cidlowski, 2013), también permitirá que el complejo receptor-hormona transloque al núcleo, en donde regulará la expresión de genes a través de distintos mecanismos de transactivación y de transrepresión, ya sea uniéndose directamente al ADN en sitios GRE (secuencias palindrómicas localizadas en regiones promotoras que pueden ser simples, compuestos o competitivos), o indirectamente por medio de su interacción con otros factores de transcripción o con cofactores a través de los mecanismos de “thetering”, secuestro de factores de transcripción y de unión por competencia (Joëls & Karst, 2012; Krstic et al., 1997; Scheschowitsch et al., 2017).

La fosforilación del GR no solo regula su translocación al núcleo, sino que también determina su especificidad hacia el promotor blanco, su interacción con cofactores, la fuerza y duración de su señalización, así como su estabilidad. Esta modificación es tan importante que se han diseñado anticuerpos para uso en la investigación, que reconocen al GR tanto en su estado no fosforilado como en su conformación fosforilada en aminoácidos específicos (Blind & Garabedian, 2008). A continuación, se describen los sitios de fosforilación más estudiados y su efecto funcional en el GR.

La fosforilación del GR ocurre principalmente en sitios ubicados en el dominio NTD que están conservados en las secuencias del GR del humano y de la rata. En humanos, las serinas (Ser) ubicadas en los sitios 211 y 226 son sitios de fosforilación (Adzic et al., 2009), y sus homólogos en la rata son los residuos Ser232 y Ser246 (Rogatsky et al., 1998). El GR se fosforila en la Ser246 debido a la actividad de la cinasa c-Jun N-terminal (JNK, por sus siglas en inglés) en ausencia de la hormona e incrementa su fosforilación al unirse con su ligando,

mientras que la Ser232 se fosforila debido a la actividad de las cinasas dependientes de ciclina (CDK, por sus siglas en inglés) únicamente con la unión del ligando, por lo que la fosforilación de Ser232 se ha utilizado en la investigación como un marcador de activación del GR. Cuando el GR se fosforila en cualquiera de estas dos serinas se induce su translocación al núcleo (Figura 1), y su efecto en la transcripción de genes dependerá de la serina fosforilada, de tal forma que la fosforilación en la Ser232 induce mecanismos de transactivación de genes, mientras que la fosforilación en la Ser246 inhibe la expresión genética ya sea al unirse a secuencias GRE negativas (nGRE), al promover mecanismos de transrepresión mediante su unión a corepresores, o través del exporte temprano del GR hacia el citoplasma (Wang et al., 2002).

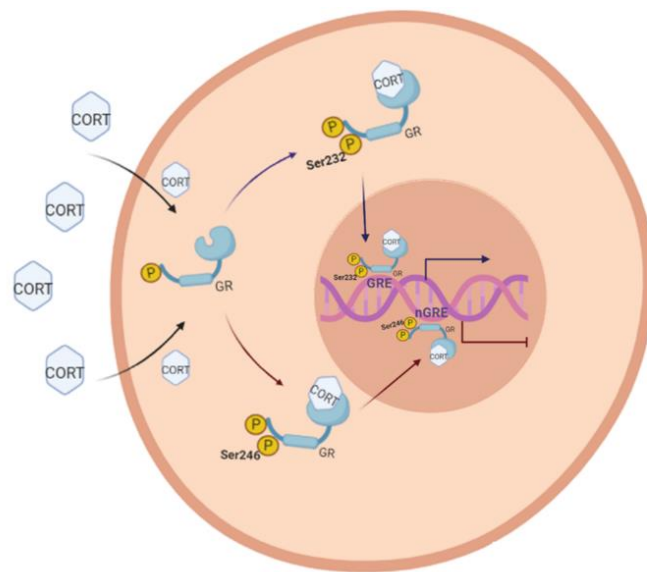


Figura 1.- Efecto de la fosforilación del GR en su localización y función. Al aumentar la concentración de CORT, ésta atraviesa la membrana celular y se une a los GRs localizados en el citoplasma. El GR puede estar fosforilado (P) en ausencia de hormona e incrementar su fosforilación con la unión de CORT. La fosforilación de la serina (Ser) 232 induce que el GR transloque al núcleo y promueva la transcripción, mientras que la fosforilación de la Ser246 induce la translocación del GR al núcleo donde inhibirá la expresión de genes.

El GR regula cientos de genes cuya expresión variará entre tejidos celulares y tipos de células, así como dependiendo del estado fisiológico del animal. Los genes que son regulados se pueden agrupar de acuerdo con su función, entre los que se encuentran aquellos que participan en procesos como proliferación celular, biosíntesis de macromoléculas, cascadas de señalización intracelular, catabolismo de biomoléculas, muerte celular programada, transporte, transcripción y producción de energía, entre otros (Phuc Le et al., 2005). Además de estas funciones, en el cerebro el GR también regula genes que participan en procesos de

plasticidad cerebral tales como la liberación de neurotransmisores, modificación y establecimiento de la estructura neuronal, el crecimiento de neuritas, la formación de espinas dendríticas, el recambio de neurotransmisores, el transporte axonal, la actividad motora y la expresión de moléculas de adhesión celular, entre otros (Datson et al., 2008).

2.3.2 Distribución del GR en el hipocampo y su participación en el CMC

Estudios de hibridación *in situ* para RNA, así como el uso de anticuerpos para la detección de la proteína, han permitido detallar la localización del GR en el hipocampo de rata, principalmente en su región dorsal. En condiciones basales, tanto el gen como la proteína se expresan de forma paralela en las distintas subregiones hipocampales, presentándose abundantemente en CA1 y CA2, moderadamente en las células piramidales de CA3 y CA4, así como en las células musgosas del GD (Van Eekelen et al., 1988; van Eekelen et al., 1987). Al aumentar los niveles de CORT en suero, ya sea debido a la administración sistémica de la hormona o después de un evento aversivo o estresante, el GR se internaliza lentamente al núcleo de células de CA1, CA2 y del GD, observándose un pico de la señal nuclear por inmunohistoquímica 60 min después del incremento de la hormona (Sarabdjitsingh et al., 2009).

La administración sistémica de un antagonista del GR (RU 38486), ya sea 1 h antes o inmediatamente después del entrenamiento de ratas en el CMC disminuye el tiempo de congelamiento de los animales durante la prueba de retención de la memoria, sugiriendo que la activación del GR durante la adquisición de la tarea es necesaria para la consolidación de la memoria de miedo (Oitzl & de Kloet, 1992; Pugh et al., 1997). Un estudio más específico mostró que la administración del mismo antagonista selectivamente en el HD o el HV, deteriora la consolidación de la memoria de miedo solo cuando se administra en el HV y no en el HD (Donley et al., 2005), por lo que el efecto facilitador de los GCs requiere de la activación del GR selectivamente a lo largo del eje dorsoventral del hipocampo, pero se desconoce si esta activación induce su fosforilación, así como su distribución en estado fosforilado a lo largo de este eje.

Dentro de los procesos plásticos que ocurren en el hipocampo durante el CMC relacionados con la activación del GR están la potenciación de las conductancias de calcio dependiente de voltaje (Kerr et al., 1992), la regulación de la señalización de factores neurotróficos (Hansson et al., 2000), la regulación de la morfología de espinas dendríticas apicales en neuronas piramidales de CA1, la regulación de la liberación de glutamato y por lo

tanto la formación de LTP y de la depresión a largo plazo (LTD, por sus siglas en inglés), entre otros (Madalena & Lerch, 2017).

El bloqueo de la unión del GR con el ADN en animales entrenados en una tarea espacial deteriora el aprendizaje dependiente de hipocampo, indicando que no solo se requiere de la activación del GR para facilitar la consolidación de la memoria de miedo, sino que además se requiere que el GR activado regule la transcripción de genes (Oitzl et al., 2001). Dentro de los genes que regula este receptor se encuentran el zipper de leucina inducido por glucocorticoides (GILZ, por sus siglas en inglés), la β -arrestina, la osteocalcina, la deshidrogenasa del dinucleótido adenin nicotinamida (NADH, por sus siglas en inglés), la monoamina oxidasa A, la cinasa-1 regulada por glucocorticoides de suero (SGK1, por sus siglas en inglés), la cinasa MAPK tipo 2, la cinasa 1 del dominio LIM (LIMK1), la proteína 25 asociada al sinaptosoma (SNAP25), BDNF y el gen de expresión temprana c-fos, así como el propio gen que codifica para el GR (*nr3c1*) (Kadmiel & Cidlowski, 2013), sin embargo se desconoce si la adquisición de la tarea CMC cambia la expresión de estos genes a lo largo del eje dorso-ventral del hipocampo.

3. Justificación

La consolidación de la memoria de miedo en el CMC es un proceso facilitado por la activación del GR en el hipocampo. Debido a que la distribución del GR varía entre las distintas subregiones del hipocampo dorsal y ventral, es probable que su activación favorezca su fosforilación de forma diferente entre las subregiones durante la adquisición de la tarea. La translocación del GR al núcleo y su efecto en la transcripción de genes es un mecanismo regulado por su fosforilación principalmente en los residuos Ser232 y Ser246. Debido a que la regulación de la transcripción de genes es uno de los mecanismos plásticos implicados en la consolidación de la memoria, en este trabajo estudiamos si el entrenamiento en la tarea de CMC afecta la expresión de genes regulados por el GR que codifican para proteínas que participan en procesos plásticos durante la consolidación de la memoria.

4. Objetivos

- General

Determinar el efecto del entrenamiento de ratas en el CMC sobre la densidad de GR total, la densidad de sus variantes fosforiladas pSer232 y pSer246, y la expresión de genes regulados por el GR en las subregiones CA1, CA2, CA3 y el GD del HD y el HV.

- Específicos

- 1.- Entrenar ratas en la tarea de CMC con las intensidades de 0.0, 0.5 y 1.5 mA y medir el porcentaje de congelamiento a lo largo de la tarea.
- 2.- Cuantificar la concentración de CORT en suero de ratas entrenadas en el CMC con las intensidades de 0.0, 0.5 y 1.5 mA.
3. Medir la densidad de GR total y de sus variantes fosforiladas pSer232 y pSer246 en las diferentes subregiones del HD y del HV de ratas entrenadas en el CMC con las intensidades de 0.0, 0.5 y 1.5 mA.
- 4.- Cuantificar la expresión de los genes *maoa*, *bdnf*, *snap25*, *ndufv1*, *map2k2* y *limk1* en las subregiones del HD y el HV de ratas entrenadas en el CMC con las intensidades de 0.0, 0.5 y 1.5 mA.

5. Hipótesis

1.- Habrá una mayor cantidad de pSer232 en el HV de las ratas entrenadas en el CMC y aumentará la expresión de los genes estudiados.

2.- Habrá una mayor cantidad de pSer246 en el HD de las ratas entrenadas en el CMC y disminuirá la expresión de los genes estudiados.

6. Materiales y métodos

Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México y se realizaron conforme a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (2001), de acuerdo a las especificaciones para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y a las normas estipuladas en la “Guide for Care and Use of Laboratory Animals del NIH” (National Research Council, 2011).

Sujetos

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (*Ratus norvegicus albinus*) adquiridas de la colonia del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, que pesaron entre 250 y 350 gr (3 meses de edad aproximadamente) al inicio de los experimentos. Una vez en el bioterio del laboratorio, las ratas se mantuvieron en cajas de acrílico individuales (24 x 21 x 45 cm) con cama de aserrín, agua y comida disponible *ad libitum*, en un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 h (luz encendida a las 7:00 am) y a temperatura constante de 21 ± 1 °C. Los animales permanecieron tres días en el bioterio para habituarlos a las nuevas condiciones.

Protocolo conductual de CMC

Los experimentos conductuales se realizaron entre las 8:00 y las 15:00 h para evitar el pico de liberación circadiana de los glucocorticoides en las ratas. Para cada uno de los días en los que las ratas fueron utilizadas, los animales se transportaron de forma individual, del bioterio del laboratorio hacia una sala adyacente al cuarto de trabajo donde permanecieron durante una hora antes de iniciar cada sesión conductual, y otra hora al término de las sesiones, posterior a la cual los animales se regresaron al bioterio.

El condicionamiento de miedo se realizó en una cámara HABITEST modelo H10-11R-TC (Coulbourn Instruments, EUA, 30.48 x 25.4 x 30.48 cm), cuyas paredes frontal y trasera están hechas de acrílico y las paredes laterales de metal. La cámara tiene un piso electrificado de 18 barras de acero inoxidable de 0.5 cm de diámetro, separadas cada 1.0 cm, conectadas a un generador de descargas eléctricas (Coulbourn, Modelo H13-15). Una cámara digital (SenTech, Carrollton, TX, EUA) se colocó en el techo de la cámara, y una luz roja y una blanca se colocaron una frente a la otra en las paredes laterales de la cámara. El generador de cargas y las luces estuvieron conectados a un controlador USB (ACT-710, Actimetrics, Wilmette, IL, EUA) que, junto con la cámara digital, se controlaron a través del programa FreezeFrame

(Actimetrics, Evanston, IL, EUA) instalado en una computadora con el sistema operativo Windows XP (Microsoft, Washington, EUA). La cámara de condicionamiento y sus componentes se colocaron dentro de un cubículo atenuante de sonido (Med Associated Inc, EUA), que a su vez estuvo localizado en una habitación aislada del sonido. Para evitar contaminación auditiva se emitió ruido blanco (60 dB) con una bocina localizada en un extremo de la habitación durante todas las sesiones conductuales.

Cada una de las ratas se manipuló cinco minutos diariamente durante tres días seguidos para habituarlas al transporte y al manejo humano (Figura 2). La sesión de habituación inició 24 h después de la última sesión de manipulación. Esta sesión consistió en colocar a los animales dentro de la cámara de condicionamiento y dejarlas explorar el interior durante 20 min (sesión de habituación). Al día siguiente los animales se colocaron dentro de la cámara para la sesión de entrenamiento que consistió en dejarlos explorar el interior durante los primeros tres minutos (sesión de pre-choque) y al finalizar el tercer minuto y hasta el minuto 10, se aplicó un choque eléctrico (1 s) cada minuto (sesión de choques), que dependiendo de los grupos experimentales fue de 0.0, 0.5 o 1.5 mA (Tabla 1). Un minuto después del último choque eléctrico se retiraron a los animales de la cámara y se regresaron a su caja individual.

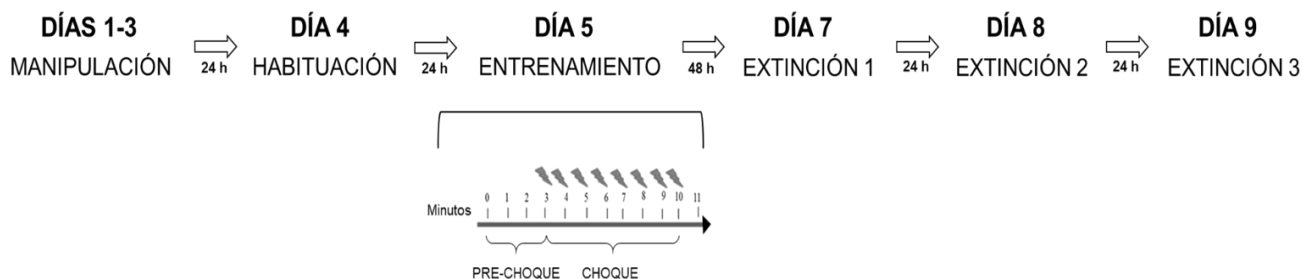


Figura 2.- Protocolo conductual de CMC. Los días 1 - 3 se manipularon a las ratas durante 5 min cada día. Al día siguiente (día 4) se realizó la sesión de habituación y 24 h después (día 5) se realizó la sesión de entrenamiento dejando a las ratas explorar la cámara durante los primeros tres minutos (sesión de pre-choque) y del minuto 3 – 10 se aplicaron choques eléctricos de 1 s en cada minuto (sesión de choque). Dos días después del entrenamiento se realizaron tres sesiones de extinción cada 24 h (días 7- 9).

Para medir el grado de asociación entre el contexto (interior de la cámara de condicionamiento) y el estímulo aversivo (choque eléctrico), 48 h después de la sesión de entrenamiento se realizaron tres sesiones de extinción separadas cada 24 h. Estas sesiones consistieron en regresar a los animales a la cámara de condicionamiento bajo las mismas condiciones en las que se les entrenó sin la aplicación de choques eléctricos durante 11 min.

Entre cada ensayo de todas las sesiones se limpiaron las paredes del interior de la cámara y los barrotes de la rejilla electrificada con una solución de etanol al 10 %.

Tabla 1. Grupos experimentales

Grupo	Número de animales utilizados en cada experimento					
	CMC	Cuantificación de CORT	Western Blot	Inmunohistoquímica	qPCR	ISH
0.0 mA	11	8	4	6	6	6
0.5 mA	11	8	5	7	0	0
1.5 mA	11	8	5	7	5	5
Control (Manipuladas)	0	7	5	7	6	6

En cada una de las sesiones se cuantificó el porcentaje de congelamiento de las ratas, definido como la ausencia de movimiento corporal, excepto el requerido para respirar (Maren & Fanselow, 1997). Para esto, se utilizó el programa Freeze Frame, Actimetrics (Evanston, IL, EUA), que determina el nivel de congelamiento de los animales midiendo cambios en la intensidad de cada pixel entre cuadros sucesivos del archivo de video. El tiempo mínimo requerido para considerarse congelamiento (“*Bout time*”) varió en un rango de 0.5 a 0.75 s, tal como lo recomiendan varios reportes enfocados en analizar diferentes métodos automatizados disponibles para el estudio del condicionamiento de miedo en roedores (Anagnostaras et al., 2000; Kopec et al., 2007; Luyten et al., 2014; Pollak et al., 2010). En este trabajo utilizamos un *Bout time* de 0.75 s para analizar todas las sesiones de la tarea, ya que con este tiempo se detectó la mayoría de los episodios de congelamiento. Para la determinación del umbral de congelamiento se observaron los histogramas del índice de movimiento y se escogió el mínimo nivel de movimiento que el software es capaz de reconocer como congelamiento para cada uno de los sujetos. Este valor se verificó observando los videos a través de un análisis ciego, de forma que no incluyera falsos positivos, es decir, que el software detectara congelamiento cuando realmente el sujeto no lo estaba. Este análisis lo realizó una persona ajena al experimento, observando los videos de cinco animales de cada grupo (seleccionados al azar) y se cuantificó el tiempo de congelamiento de las ratas en todas las sesiones con un cronómetro digital.

Obtención de muestras

Se entrenaron ratas de cada grupo experimental siguiendo el protocolo de CMC descrito en la sección anterior, y se agregó un grupo control de ratas que fueron únicamente manipuladas y por lo tanto nunca estuvieron en contacto con la cámara de condicionamiento (Tabla 1). Se sacrificaron a los animales por el método de decapitación siguiendo dos líneas de tiempo diferentes (Figura 3): 15 min después del entrenamiento para la extracción de sangre (cuantificación de CORT), o 1 h después para la extracción de los cerebros (semicuantificación de la densidad de GR total y fosforilado y cuantificación de la expresión de genes). El grupo control de ratas únicamente manipuladas se sacrificó 48 h después de la última sesión de manipulación, en el mismo día y en el mismo horario que los animales entrenados.



Figura 3.- Protocolo para la obtención de muestras. Los grupos de animales entrenados con 0.0, 0.5 y 1.5 mA se entrenaron y se sacrificaron 15 min después para la recolección de sangre o 1 h después para la extracción de cerebros. Las ratas del grupo control se sacrificaron 48 h después de la última sesión de manipulación, coincidiendo con el día de sacrificio de las ratas entrenadas.

Medición de los niveles de CORT en suero

Para la obtención de suero las muestras sanguíneas se centrifugaron a 2,000 rpm durante 30 min a 4 °C, el sobrenadante fue colectado y nuevamente centrifugado a 250 rpm durante 10 min y se colectó el nuevo sobrenadante. Las muestras de suero fueron analizadas con el método de ELISA utilizando el kit comercialmente disponible Corticosterone EIA Kit (ENZO INC., Pennsylvania, EUA). La descripción en detalle de la composición de las soluciones utilizadas se puede consultar en el Apéndice A. El protocolo consistió en colocar 100 µL de las soluciones estándar y de las muestras de suero diluidas (2.5 partes del reactivo de desplazamiento de esteroides por cada 97.5 partes de la muestra sin diluir), todas por duplicado, seguido de 50 µL de la solución conjugado y de anticuerpo. La placa fue incubada durante 2 h a temperatura ambiente en agitación constante, y posteriormente se le hicieron

tres lavados para eliminar el exceso de esteroides no unidos. Se agregaron 200 μ L del substrato y la reacción se detuvo después de 1 h con la solución de paro. Para la lectura de la densidad óptica de la placa, se utilizó un lector de absorbancia de microplacas (iMark, BIO-RAD, EUA) a 405 nm, con una corrección de entre 570-590 nm. El anticuerpo del kit utilizado presenta reactividad cruzada con corticosterona (100 %), deoxicorticosterona (28.6 %) y progesterona (1.7 %), así como con otros compuestos (<1 %).

Medición de los niveles de GR total y fosforilado

Se sacrificaron a los animales 1 h después de la sesión de entrenamiento, se extrajeron los cerebros y se sumergieron en un contenedor con isopentano, rodeado por una mezcla gelatinosa de hielo seco y de etanol al 96 %, en donde permanecieron durante 1 min. Posteriormente, cada uno de los cerebros fue almacenado de forma individual a -80 °C para su posterior procesamiento por Western-Blot o por inmunohistoquímica.

A) (SDS-PAGE) Western-Blot

Para la extracción del HD y el HV, los cerebros se colocaron durante 1 h dentro de un criostato Leica (Leica Biosystems, IL, EUA) a -25 °C. Posteriormente, cada cerebro se acomodó en una matriz de disección para cerebros (del tamaño aproximado al cerebro de una rata adulta de 175 g a 300 g), con hendiduras coronales de 1 mm. Se realizaron cinco cortes en dirección rostral: el primer corte se hizo entre el cerebelo y el encéfalo (Bregma 8.8 mm), el segundo 3 mm rostral al primero (Bregma 5.8 mm), el tercero 1 mm rostral al segundo (Bregma 4.8 mm), el cuarto 1 mm rostral al tercero (Bregma 3.8 mm) y el quinto 1 mm rostral al cuarto (Bregma 2.8 mm). Del segundo y el tercer corte se obtuvo la rebanada donde se encuentra la mayor parte del HV, mientras que del cuarto y el quinto se obtuvo la rebanada donde se localiza el HD. Se extrajeron los hipocampos de ambos hemisferios con unas tijeras de punta fina y se almacenaron a -80 °C.

El tejido se homogenizó por sonicación (Cole Palmer) con 60 μ L de amortiguador de lisado RIPA (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers MA, EUA) preparado con el inhibidor de proteasas COMPLETE (Cell Signaling), durante 1 min a 4 °C y posteriormente se agitó durante 2 h a 4 °C. Las muestras se centrifugaron a 10,000 g durante 15 min a 4 °C, se aisló el sobrenadante y se mantuvo a 4 °C. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) y se calculó el volumen necesario de cada muestra que correspondiera a 50 μ g de proteína total. La electroforesis se realizó en condiciones reductoras

agregándole a cada muestra la solución amortiguadora (1.0 mL TRIS-HCl 1.5 M pH 8.8, 0.8 mL glicerol, 1.6 mL SDS 10 %, 0.2 mL azul de bromofenol 0.05 %, 4 mL agua destilada) para un volumen total de 20 μ L, y se colocaron en baño María durante 5 min.

Para la electroforesis se realizaron geles de poliacrilamida al 10 %. Como marcador de peso molecular se empleó el estándar de 10 - 250 kD Precision Plus Protein Kaleidoscope (BIO-RAD; CA, EUA). Una vez que el gel estuvo cargado con el marcador y las muestras, a la cámara de electroforesis se le agregó la solución amortiguadora de corrida (15 gr/L TRIS-base 0.025 M, 72 gr/L glicina, 5 gr/L SDS, pH 8.3) y se separaron las proteínas a 100 V (Laemmli, 1970) durante 1 h y 30 min aproximadamente.

Una vez terminada la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD; CA, EUA) con amortiguador de transferencia (25 mM TRIS, 192 mM glicina, 20 % metanol, pH 8.3) y a 200 mA durante 1 h. Al terminar, la membrana se colocó en TBS (100 nM TRIS, 2.5 M NaCl, pH 7.5) y se agitó durante 10 min. Posteriormente, se bloqueó con leche en polvo baja en grasa (BIO-RAD) al 5 % en TBS durante 1 h en agitación. Posteriormente, la membrana se lavó con TTBS (TBS + Tween al 20 %) tres veces durante 10 min cada lavado, en agitación.

Para la detección del GR total, del GR fosforilado en la serina 232 y del GR fosforilado en la serina 246, se utilizaron los anticuerpos primarios GR-H300: sc-8992 (Santa Cruz Biotechnology, INC; CA, EUA), Phospho GR (Ser 211) (Cell Signaling TECHNOLOGY; Danvers, MA, EUA) y Anti-Glucocorticoid receptor (phospho S226) antibody ab93104 (Abcam Inc., Cambridge, MA, EUA), respectivamente. Los tres anticuerpos son policlonales hechos en conejo. Como control de carga, se utilizó el anticuerpo Anti-alpha Tubulin antibody ab24246 (Abcam Inc., Cambridge, MA, EUA), también policlonal hecho en conejo. Todos los anticuerpos se prepararon, por separado, en una solución con TTBS y solución bloqueadora al 1 %, diluidos de la siguiente manera: 1:2000 para el GR-H300, 1:1000 para el GR fosforilado en S232, 1:800 para el GR fosforilado en S246 y 1:5000 para el anticuerpo anti-tubulina. La incubación de la membrana con cada uno de los anticuerpos se realizó durante toda una noche (12 h aproximadamente) en agitación a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, la membrana se lavó tres veces con TTBS, de 10 min cada lavado.

Como anticuerpo secundario se utilizó el anti-IgG de conejo hecho en cabra y conjugado con peroxidasa (Invitrogen), a una dilución de 1:4000 en TTBS y solución bloqueadora al 1 %. La incubación de las membranas con el anticuerpo fue de 2 h en agitación constante a TA.

Posteriormente, se hicieron tres lavados con TTBS y tres con TBS, de 10 min cada uno. Como sustrato de revelado se utilizó el reactivo de detección ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham; Buckinghamshire, UK). El revelado se realizó en un cuarto oscuro, colocando las membranas en un casete de revelado y encima una placa radiográfica Hyperfilm ECL (Amersham; Buckinghamshire, UK). El tiempo de exposición varió de acuerdo con el anticuerpo primario utilizado: 1 min para la detección de GR-H300 y de tubulina, y 10 min para la detección de la pSer232 y pSer246. Inmediatamente después de la exposición al sustrato, la placa se sumergió en el siguiente tren de soluciones (Kodak): 1 min en la solución reveladora, 1 min en agua, 1 min en la solución fijadora y 1 min en agua. La placa se analizó por densitometría utilizando el programa Image Lab (BIO-RAD).

B) Inmunohistoquímica

Para la obtención de las rebanadas de HD y de HV los cerebros se colocaron durante 1 h dentro de un criostato (Leica) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se cortaron en la matriz de disección usada anteriormente de la siguiente manera: el primer corte se realizó entre el cerebelo y el encéfalo (Bregma 8.8 mm), el segundo corte 1 mm rostral al primero (Bregma 7.8 mm), el tercero 3 mm rostral al segundo (Bregma 4.8 mm) y el cuarto 3 mm rostral al tercero (Bregma 1.8 mm). Entre los cortes dos y tres se obtuvo el bloque donde se encuentra el HV, mientras que de los cortes tres y cuatro salió el bloque del HD. Estos bloques se cortaron en rebanadas más delgadas de $20\text{ }\mu\text{m}$ de espesor. Los cortes seriados se montaron en laminillas Superfrost Plus (Fisher Scientific) y se dejaron secar durante 10 min dentro del criostato. Inmediatamente después se colocaron en una cámara húmeda de forma horizontal y se fijó el tejido con una solución de paraformaldehído al 4 % durante 10 min. Se lavaron con TBS (Tris 1.2, NaCl 9g, pH 7.6) tres veces durante 10 min y después se expusieron los epítipes incubando el tejido 30 min en buffer de citratos (2.94 g citrato de sodio, pH 6, Tritón al 0.05%) a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en baño María. Se lavó con TBS tres veces durante 10 min y se incubaron con la solución bloqueadora (BIO-RAD) al 5 % en TBS durante 2 h. Al terminar, los cortes se lavaron con TTBS al (Tritón al 0.1 %, pH 7.6) tres veces durante 10 min.

Para la detección de GR total se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón Anti-Glucocorticoid receptor antibody (BuGR2)-Chip Grade (Abcam Inc., Cambridge, MA, EUA), y para la detección de pSer232 y de pSer246 se utilizaron los mismos anticuerpos que se utilizaron en el Western-blot. Los anticuerpos se prepararon, por separado, en una solución con TTBS y solución bloqueadora al 1 %, diluidos de la siguiente manera: 1:1500 para el

BuGR2, 1:200 para pSer232 y 1:400 para pSer246. Se hicieron incubaciones dobles en cortes seriados de cada área cerebral, de forma que un corte se incubó con el anticuerpo BuGR2 y el anti pSer232, y el otro corte con BuGR2 y el anti pSer246. La incubación de las laminillas se realizó durante toda una noche (12 h aproximadamente) a 4 °C en una cámara húmeda tapada. Al terminar, las muestras se lavaron tres veces con TBS, de 10 min cada lavado. Para disminuir señal de inmunofluorescencia inespecífica, el tejido se incubó con la solución Negro de Sudán B (Sigma) durante 30 min a temperatura ambiente y se lavó tres veces con TBS, de 10 min cada lavado. Al terminar, los cortes se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a los fluoróforos: anti-IgG-Cy3 de cabra anti-conejo y anti-IgG-FITC de conejo anti-mouse (ambos de Invitrogen), diluidos en TTBS y solución bloqueadora al 1 % con una dilución 1:5000 y 1:200, respectivamente. Después las laminillas se lavaron tres veces con TBS. Para marcar los núcleos celulares, las muestras se incubaron con 500 ng/mL de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Invitrogen) diluido en PBS durante 30 min y posteriormente se lavaron tres veces con TBS, de 10 minutos cada lavado. Los cortes se montaron con el medio especial para fluorescencia VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA).

Las laminillas se visualizaron con un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 510 utilizando los láseres de longitud de onda de excitación de 650 nm para Cy3, 500 nm para FITC y 358 nm para DAPI. Se obtuvieron micrográficas (50X) de tres campos diferentes de CA1, CA2, CA3 y del GD, siempre utilizando los mismos parámetros del microscopio. El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa ImageJ.

Medición de la expresión de genes

Se seleccionaron seis genes regulados por el GR tomando en cuenta que codificaran para proteínas que participen en diferentes procesos celulares y moleculares relacionados con plasticidad celular durante la consolidación de algún tipo de memoria espacial, así como en los que se hayan reportado cambios de expresión en tejido cerebral después de 60 min de la administración de GCs o después del entrenamiento en cualquier tarea espacial (Chen et al., 2017; Datson et al., 2008; Giese & Mizuno, 2013; Hou et al., 2006; Morsink et al., 2006), de esta forma podríamos relacionar indirectamente cualquier cambio en la expresión de los genes con los resultados obtenidos de la fosforilación del GR realizados 60 min después del entrenamiento. Los genes seleccionados codifican para las siguientes proteínas: La NADH deshidrogenasa (metabolismo energético), la monoamina oxidasa A (MAO-A, catabolismo de

los neurotransmisores serotonina, dopamina y noradrenalina), la cinasa MAPK tipo 2 (transducción de señales), LIMK1 (regulación de la polimerización de actina), SNAP25 (dinámica vesicular y regulación de la exocitosis de neurotransmisores), y BDNF (factor neurotrófico para el crecimiento y supervivencia).

Para la extracción del HD y el HV, los cerebros de los grupos de animales entrenados con 0.0 mA, 1.5 mA y el control de ratas solo manipuladas, se colocaron durante 1 h dentro de un criostato Leica (Leica Biosystems, IL, EUA) a -25°C . Posteriormente, cada cerebro se separó en ambos hemisferios, de forma que el tejido obtenido del hemisferio izquierdo se utilizó para la cuantificación por qPCR, mientras que el tejido del hemisferio derecho se utilizó para hibridación *in situ* (ISH).

A) qPCR

El hemisferio izquierdo de cada cerebro se acomodó en una matriz de disección para cerebros (del tamaño aproximado al cerebro de una rata adulta de 175 g a 300 g), con hendiduras coronales de 0.5 mm. Se realizaron cinco cortes en dirección rostral: el primero entre el cerebelo y el encéfalo (Bregma 8.8 mm), el segundo 3 mm rostral al primero (Bregma 5.8 mm), el tercero 1 mm rostral al segundo (Bregma 4.8 mm), el cuarto 1 mm rostral al tercero (Bregma 3.8 mm) y el quinto 1 mm rostral al cuarto (Bregma 2.8 mm). Del segundo y el tercer corte se obtuvo la rebanada donde se encuentra la mayor parte del HV, mientras que del cuarto y el quinto se obtuvo la rebanada donde se localiza el HD. El HV y el HD se extrajeron con perforadores de tejido y se almacenaron a -80°C .

Se extrajo el ARN total del HD y del HV por medio del método TriPure. A cada muestra se le agregó 1 mL de TriPure (Roche) y se homogeneizó manualmente con un pistilo sujeto a un motor. El homogenado se aforó a 1 mL con 400 μL de TRIzol y se dejó incubar por 3 min a TA. Posteriormente se adicionó 200 μL de cloroformo 99% (Merk), se agitó durante 30 s y se dejó incubar por 3 min a TA para después centrifugar durante 15 min a 13,000 rpm. De esta mezcla se obtuvieron tres fases: una lipídica (ADN), una hidrofílica (proteínas) y una acuosa (ARN). Se transfirieron 400 μL de la fase acuosa a un tubo libre de RNAsa y se le agregó 500 μL de isopropanol (Merk), se agitó y se incubó por 10 min a TA. Posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C , se eliminó el supernadante, se agregaron 500 μL de etanol (Merk) al 75 %, se mezcló y se centrifugó a 7,000 rpm durante 5 min a 4°C y se eliminó el supernadante. Este último paso se repitió nuevamente. Después de eliminar el supernadante, se dejó secar el interior durante 20 min. El sedimento (ARN) dentro del tubo se

disolvió en 20 µL de agua libre de nucleasa (Merk) y se incubó a 60 °C durante 10 min en baño María. Se mezclaron los tubos y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 30 s. Al terminar, los tubos se mantuvieron en hielo para posteriormente realizar la cuantificación de la concentración del ARN utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific).

Para la obtención del cDNA, se calculó el volumen requerido para contener 1µg del RNA de cada muestra. En placas de 96 pozos (BioRad) se agregó el RNA de cada muestra, el volumen de H₂O requerido para un volumen total de 9 µL, y 1 µL de hexámeros aleatorios. Se incubó la placa a 70 °C durante 10 min y se dejó enfriar a 4 °C. Posteriormente, a cada pozo se le agregó 10 µL de la mezcla compuesta por: 4 µL de buffer de reacción (Promega), 0.5 mL de la enzima transcriptasa reversa (Promega), 0.5 µL de la enzima RNasin (Promega), 1.25 µL de oligos dNTPs 10 nM (Promega), y 3.75 µL de H₂O. En cada placa se incluyeron dos controles: un pozo con RNA de muestras escogidas al azar al que no se le agregó la enzima transcriptasa reversa, y otro pozo al que solo se le adicionó H₂O. La reacción de PCR se realizó en baño María programado para el siguiente ciclo: 10 min a 25 °C, 50 min a 45 °C, 10 min a 70 °C y finalizar en 4 °C. La concentración final de cDNA de cada muestra fue de 50 ng/µL, que posteriormente se diluyó a 1 ng/µL.

El diseño de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes se realizó con la herramienta “*Primer BLAST*” de la base de datos “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI) (Ye et al., 2012). En la Tabla 2 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes				
Gen	# acceso (NCBI)	Forward	Reverse	Longitud del producto (pb)
<i>limk 1</i>	NM_031727.2	GCATGAGGTTGACGCTACTT	GGTGTGAAAGGGAGGTGCTA	186
<i>maoa</i>	NM_033653.1	GGCCAGGAACGGAAATTTGT	TTGGCAGTCAAATCGGTGG	200
<i>map2k2</i>	NM_133283.1	AGAGCCCCATAGTGTCTCAC	TGTCCATCCCATGACCACTG	68
<i>ndufv1</i>	NM_001006972.1	GCAAGCAGATAGAAGGCCAC	CGTTGCATCCGATCCTCAAG	109
<i>bdnf</i>	NM_001270637.1	CCGCACGTGACAAAACGTAA	CTGTCCAAGGTGCTGAATGG	149
<i>snap25</i>	NM_030991.3	GACGCAGACATGCGTAATGA	GTTCGCCTTGCTCATCCAAC	157

Para la amplificación del cDNA se utilizaron placas de 96 pozos (BioRad) y cada muestra se corrió por triplicado. En cada pozo se colocaron 4 µL (4 ng) del cDNA de cada muestra y 6 µL de la mezcla de: 25 µL del oligonucleótico forward, 25 µL del oligonucleótico reverse, 50 µL

de la enzima TaqPol Syber-Green (ThermoFisher) y 50 μ L de H₂O. Posteriormente se centrifugó la placa en una centrifugadora para placas (BioRad) y se colocó en un termociclador CFX96 (BioRAD) programado para realizar el siguiente ciclo de temperaturas de forma automática: 95 °C durante 3 min, 36 ciclos de 90 °C durante 10 s y 60 °C durante 30 s, y finaliza con 95 °C durante 10 s, 65 °C durante 0.1 s y 95 °C durante 5 s. La cuantificación de cada gen se determinó utilizando el método de qPCR relativo de Ct comparativo ($\Delta\Delta$ Ct). El valor de Ct del control endógeno se obtuvo de la media geométrica entre los Cts del gen constitutivo *gadph* (Δ Ct), en donde se obtuvo la resta el Ct del gen blanco menos el Ct endógeno. El $\Delta\Delta$ Ct se obtuvo de restar el Δ Ct del calibrador al Δ Ct de los grupos experimentales.

B) Hibridación *in situ* (ISH)

Para la obtención de las rebanadas sagitales de HD y de HV, el hemisferio derecho de los cerebros se colocó durante 1 h dentro de un criostato (Leica) a – 20 °C. Se realizaron 10 cortes seriados de 20 μ m de espesor comenzando en el lateral 4.20 mm tomando como referencia el Atlas Paxinos. Los cortes se montaron en laminillas Superfrost Plus (Fisher Scientific) y se dejaron secar durante 10 min dentro del criostato, y se mantuvieron a – 80 °C hasta su uso.

La hibridación *in situ* se realizó utilizando el kit QuantiGene ViewRNA ISH Tissue 2-Plex Assay (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA). Las laminillas con el tejido se colocaron en paraformaldehído al 37% en buffer de fosfatos (PBS) durante 18 h a 4 °C. Se hicieron dos lavados con PBS durante 5 min en agitación media, y posteriormente pasaron por un tren de alcoholes: 5 min en etanol al 70 %, 5 min en etanol al 96 % y 5 min en etanol al 100 %. Posteriormente se dejó secar el tejido en una incubadora horizontal (Thermobrite) a 60 °C durante 30 min, se marcó el contorno del tejido con un plumón hidrofóbico y se sumergieron en PBS. A cada laminilla se le colocó la solución con la proteasa y se incubó durante 20 min a 40 °C de forma horizontal en la incubadora húmeda y cerrada. Se hicieron dos lavados en PBS de 1 min y se incubaron 5 min en PFA al 10% a TA. Se hicieron dos lavados en PBS de 1 min en agitación y se incubaron durante 3 h a 40 °C con la solución de trabajo que contiene los oligos. Las hibridaciones se realizaron para reconocer pares de genes: *bdnf* y *snap25*, *limk1* y *maoa*, *mao2k2* y *ndufv1*. Posteriormente se hicieron tres lavados con el buffer de lavado durante 2 min en agitación, y se colocaron en el buffer de almacenaje hasta el día siguiente a TA. Las laminillas se lavaron dos veces en el buffer de lavado durante 1 min y se les agregó la

solución pre-amplificadora durante 25 min a 40 °C. Se hicieron tres lavados con buffer de lavado durante 2 min en agitación, se incubaron 15 min en la solución amplificadora a 40 °C y se lavaron 3 veces en buffer de lavado durante 2 min en agitación. Las laminillas se incubaron con la prueba 6-AP durante 15 min a 40 °C y se lavó 3 veces con buffer de lavado durante 1 min, posteriormente se incubaron 30 min con el substrato Fast Blue durante 30 min a TA en la oscuridad. Se hicieron 3 lavados de 3 minutos con el buffer de lavado y se agregó la solución de paro durante 30 min a TA en la oscuridad. Se hizo 1 lavado de 1 min en PBS y después dos lavados con buffer de lavado durante 1 min. Posteriormente las laminillas se incubaron con la prueba 1-AP durante 15 min a 40 °C, se lavaron 3 veces con buffer de lavado durante 3 min, se les incubó con una solución potenciadora durante 5 min a TA y se eliminó el exceso. Se incubó con el substrato Fast Red durante 30 min a 40 °C y se lavaron las laminillas con PBS. El tejido se fijó con PFA al 10% durante 5 min a TA. Se lavó con PBS durante 1 min y se tiñó con Hematoxilina durante 15 s. Se lavó dos veces con H₂O destilada durante 1 min, posteriormente con agua de la llave durante 3 min y nuevamente con H₂O destilada durante 1 min. Se dejaron secar las laminillas y se montaron con el medio de montaje VectaShield acoplado a DAPI. Se dejaron secar durante 1 noche en una campana de extracción a TA y se almacenaron a 4°C en la oscuridad.

Las laminillas se visualizaron con un microscopio DM6B (Leica) utilizando los láseres de longitud de onda de excitación de 530 nm para Fast Red, 630 nm para Fast Blue y 387 nm para DAPI. Los tiempos de exposición de los láseres fueron de 3 s para Fast Red, 8 s para Fast Blue y 0.1 s para DAPI. Se obtuvieron micrografías (10X) de tres campos diferentes de CA1, CA2, CA3 y del GD del HD y del HV, siempre utilizando los mismos parámetros del microscopio. El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa ImageJ.

Análisis estadístico

Las gráficas y el análisis estadístico de los resultados de las diferentes mediciones se realizaron con el programa SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA., E.U.A).

Para la prueba conductual de condicionamiento de miedo, se graficó la media \pm error estándar (EE) del porcentaje de congelamiento por minuto de cada intensidad de choque en las tres sesiones del condicionamiento (exploración, pre-choque, choques, extinción 1, extinción 2 y extinción 3). También, para cada sesión se agrupó el porcentaje de congelamiento de todos los minutos y se graficó la media \pm EE de cada intensidad. En el análisis estadístico, los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA de dos vías (con el tiempo como Factor

A y la intensidad del choque como Factor B). Como prueba Post-hoc se utilizó Fisher. Los niveles de corticosterona en suero se graficaron utilizando la media \pm EE de la concentración para cada grupo, y los datos se analizaron con la prueba de ANOVA de 1 vía, utilizando Fisher como prueba Post-hoc. Para el análisis de densidades ópticas, la señal del GR total, de pSer232 y pSer246 se ajustaron a la densidad de la tubulina y se normalizaron respecto al grupo control de ratas solo manipuladas. Además, para cada grupo se calculó la proporción entre pSer232 y pSer246. Para las cuatro mediciones se graficó la media \pm EE y se analizaron con la prueba ANOVA de 1 vía y Fisher como prueba Post-hoc.

Para el análisis de inmunohistoquímica del GR total, pSer232 y pSer246, se calculó el porcentaje de células inmunoreactivas a cada señal a partir del total de células contadas con el marcador de núcleos DAPI. Esto se realizó en los tres campos obtenidos de cada una de las subregiones CA1, CA2, CA3 y el GD del HD y el HV, y se calculó el promedio de los tres campos. Además, también se calculó la proporción entre las inmunoreactividades de pSer232 y pSer246 en cada una de las subregiones. Todas las mediciones se analizaron con ANOVA de 2 vías (con las subregiones como el Factor A y la intensidad del choque como Factor B) y se usó Fisher como prueba Post-hoc.

Para el análisis de qPCR, se graficó la media \pm EE de los $\Delta\Delta CT$ de cada gen en el HD y el HV. Para el análisis de las hibridaciones *in situ*, se obtuvo el promedio del porcentaje de área de la señal de cada gen en los tres campos de las células piramidales de CA1, CA2, CA3 y de las células granulares del GD del HD, así como en CA1, CA3 y el GD del HV, y se graficó la media \pm EE. Los resultados obtenidos con ambas técnicas se analizaron con la prueba Kruskal-Wallis de 1 vía y se utilizó Dunn's como prueba Post-hoc.

Para todos los casos la significancia estadística se aceptó con una $P \leq 0.05$

7. Resultados

Análisis de la conducta de los animales entrenados en el CMC

El análisis automatizado de las sesiones por minuto mostró baja respuesta de congelamiento de las ratas durante los 20 min de la sesión de exploración y en los tres minutos de la sesión de pre-choque (Figura 4), por lo que el contexto en el interior de la cámara no fue estresante. En la sesión de choques, los animales entrenados con 0.5 y 1.5 mA aumentaron sus niveles de congelamiento, pero no mostraron diferencias entre ellos, indicando que adquirieron la tarea de la misma forma (Figuras 4 y 5). Para comprobar que los animales

asociaron el estímulo aversivo con el contexto donde fueron entrenados, 48 hr después del entrenamiento se re-expusieron al contexto sin la aplicación del choque. Además, se agregaron dos sesiones adicionales, separadas cada 24 h, con el objetivo de averiguar si las intensidades de choque utilizadas mostraban curvas de extinción diferentes. En la primera sesión de extinción el grupo entrenado con 1.5 mA mostró porcentajes de congelamiento alrededor del 60 %, casi el doble que el grupo entrenado con 0.5 mA. Estos valores fueron disminuyendo a lo largo de las consecutivas sesiones de extinción dependiendo de la intensidad del choque, de tal forma que el grupo entrenado con 0.5 mA extinguió la respuesta desde el minuto 5 de la extinción 1, mientras que el grupo entrenado con 1.5 mA disminuyó a partir del minuto 7 de la sesión de extinción 2.

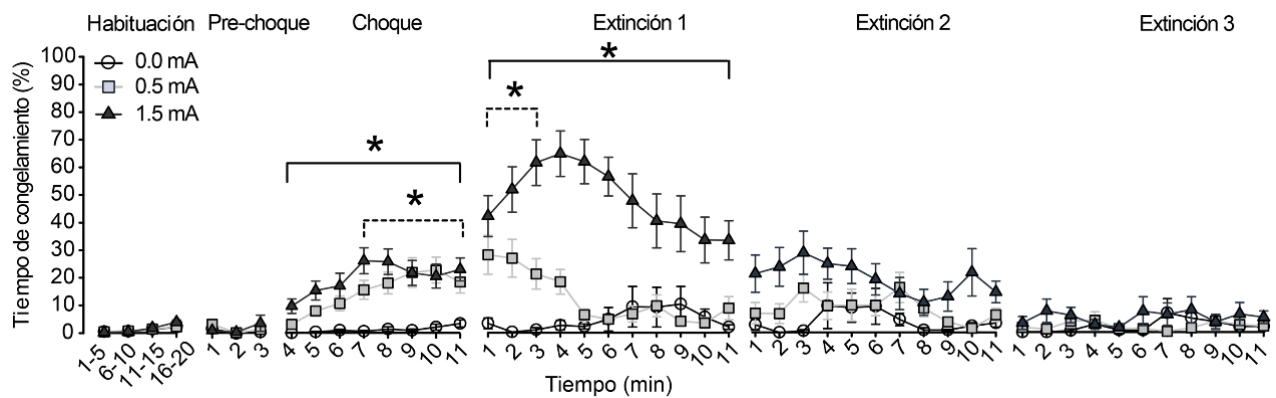


Figura 4. Porcentaje de congelamiento por minuto. Exploración (20 min), pre-choque (minutos 1-3 de la sesión de entrenamiento), choque (minutos 4-10 de la sesión de entrenamiento) y las sucesivas sesiones de extinción 1, 2 y 3 (cada una de 11 minutos). Se utilizó una $n = 24$ en todos los grupos para las sesiones de exploración y de entrenamiento, y una $n = 11$ en las sesiones de extinción. En todos los grupos se graficó la media \pm EE. * $p < 0.05$ mA

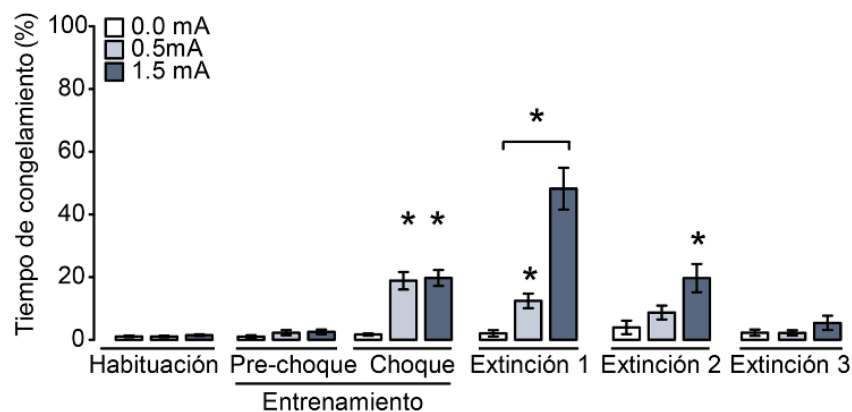


Figura 5. Promedio del porcentaje de congelamiento de cada sesión. Exploración (promedio de los 20 min), pre-choque (promedio de los minutos 1-3 de la sesión de entrenamiento), choque (promedio de los minutos 4-11 de la sesión de entrenamiento), y sesiones de extinción 1, 2 y 3 (promedio de los 11 minutos de cada sesión). En todos los grupos se graficó la media \pm EE. $n = 10$ en todos los grupos. * $p < 0.05$.

El porcentaje de congelamiento obtenido de forma manual, en el que un observador cuantificó “*en ciego*” el tiempo de congelamiento con un cronómetro, observando los videos de 5 ratas de cada grupo escogidas al azar, mostró resultados muy similares a los obtenidos con el software (Figura 6). Sin embargo, estos resultados mostraron una discrepancia respecto al porcentaje de congelamiento obtenido con el software, en la que el grupo entrenado con 0.5 mA no mostró diferencias respecto al grupo de 0.0 mA en la primera sesión de extinción, muy probablemente debido al incremento en el error estándar que presenta este grupo, no obstante se observa que el tiempo de congelamiento del grupo de 0.5 mA tiende a aumentar. Para comparar ambos métodos de medición (manual vs automatizado), se graficaron las medias de los porcentajes de congelamiento obtenidos con un método, contra las medias del otro, junto con su regresión lineal (Figura 7). Se encontró una correlación positiva entre ambos métodos ($r^2 = 0.94$, $p < 0.0001$) indicando que con el software utilizado y los parámetros establecidos (*bout time* y el umbral de congelamiento), se obtienen valores confiables.

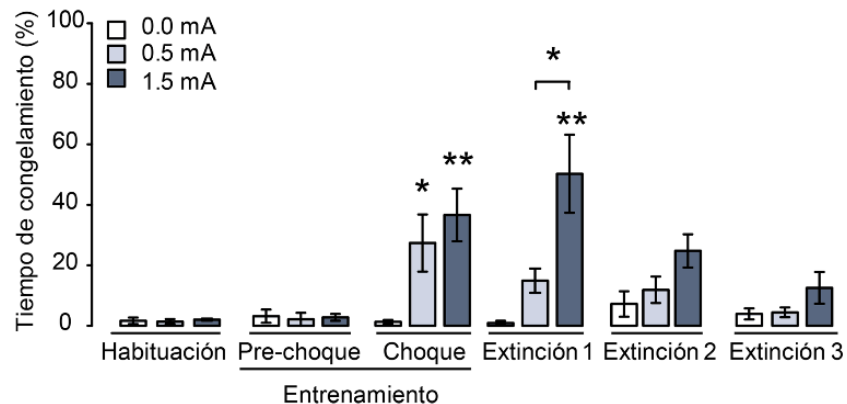


Figura 6. Análisis ciego del porcentaje de congelamiento. Promedio del porcentaje de congelamiento de cada intensidad de choque, 0.0, 0.5 y 1.5 mA, en las sesiones de exploración (promedio de los 20 min), pre-choque (promedio de los minutos 1-3 de la sesión de entrenamiento), choques (promedio de los minutos 4-11 de la sesión de entrenamiento), sesiones de extinción 1, 2 y 3 (promedio de los 11 minutos de cada sesión). En todos los grupos se graficó la media \pm EE. $n = 5$ en todos los grupos. * $p < 0.05$ mA y ** $p < 0.01$.

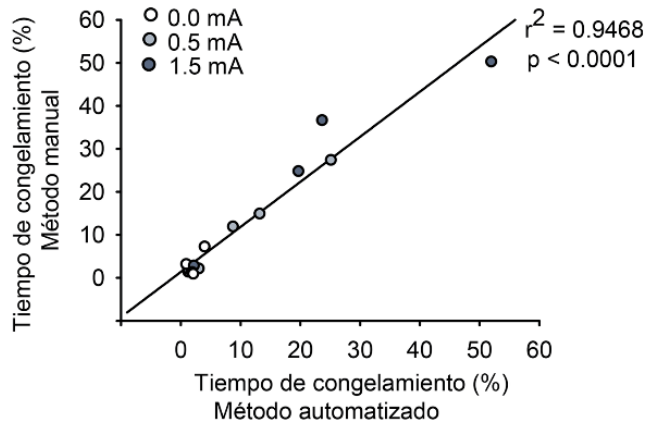


Figura 7. Correlación de los resultados de congelamiento obtenidos con el método manual y el automatizado. Las observaciones mostraron una buena correlación y un buen ajuste lineal.

Medición de los niveles de CORT en suero

Para saber si el protocolo de entrenamiento en el CMC incrementó los niveles de CORT en suero, se sacrificaron animales 15 min después del último minuto del entrenamiento y se midió la concentración de la hormona por el método de ELISA. El análisis de los resultados mostró niveles muy bajos de CORT en el grupo de ratas entrenadas sin choques, de forma muy similar al grupo control de ratas que fueron únicamente manipuladas (Figura 8), por lo que el contexto dentro de la cámara no fue un estímulo estresante. En aquellos animales entrenados con 0.5 o 1.5 mA los niveles de CORT incrementaron en relación con la intensidad del choque, siendo el grupo de 1.5 mA el que liberó la mayor cantidad de hormona.

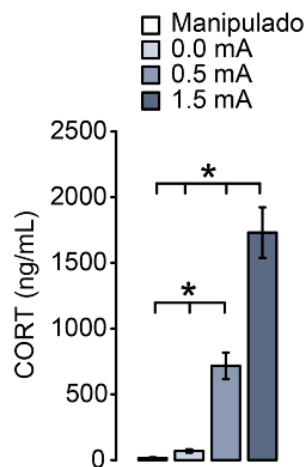


Figura 8. Concentración de CORT en suero de ratas entrenadas. Las mediciones se realizaron 15 min antes del entrenamiento. En todos los grupos se graficó la media \pm EE. $n = 6 - 7$. * $p \leq 0.001$.

Cuantificación del GR por SDS-PAGE Western-Blot

Una aproximación rápida para saber si el entrenamiento en el CMC afectó los niveles proteicos de GR total y de sus dos variantes fosforiladas pSer232 y pSer246 fue a través del uso de la técnica Western-Blot en condiciones desnaturalizantes. El análisis de densitometría mostró que entrenamiento con las diferentes intensidades de choque no afectó la densidad del GR total en el HD y el HV (Figura 9 A) y tampoco se encontraron cambios en las señales de pSer232 y pSer246 (Figuras 9 B y C), aunque existe una tendencia a incrementar la densidad de pSer246 en el hipocampo ventral en el grupo entrenado con 1.5 mA. Algunos reportes indican que la actividad transcripcional del GR realmente depende de la proporción entre las densidades de pSer232 y pSer246, por lo que también se calculó este valor para ambas regiones del hipocampo, sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias entre grupos en ambas regiones del hipocampo (Figura 9 D).

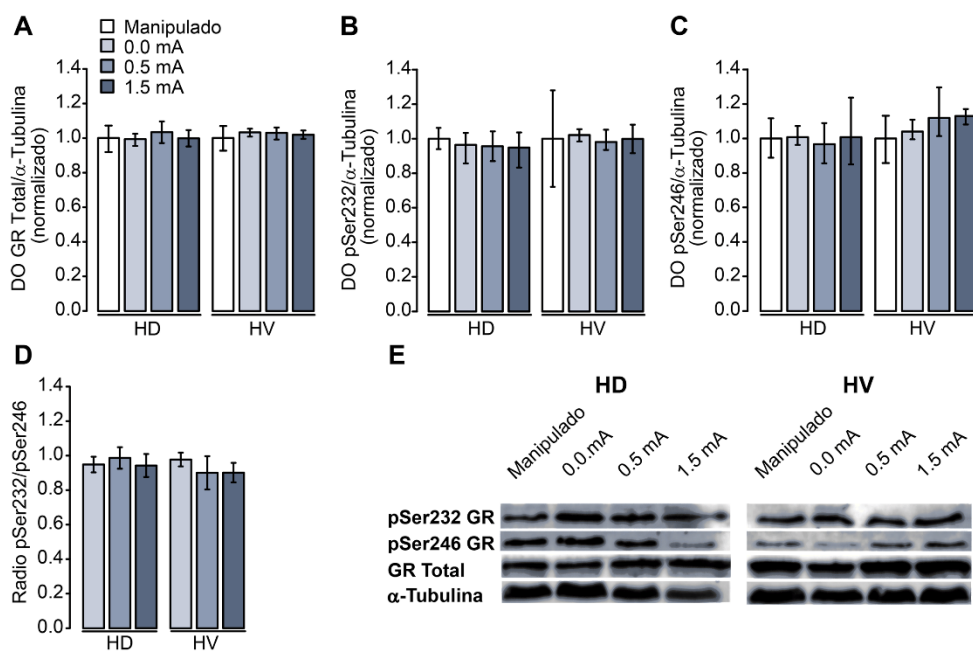


Figura 9. Densitometría del GR total y fosforilado en Ser232 y Ser246. Hipocampo dorsal (HD) y ventral (HV). Los animales fueron sacrificados 1 h después del entrenamiento. A) Niveles de GR total normalizados a α -tubulina. B) Niveles de pSer232 normalizados a α -tubulina. C) Niveles de pSer246 normalizados a α -tubulina. D) Proporción de la densidad de pSer232 respecto a pSer246. E) Blots representativos. Para todos los grupos se graficó la media \pm EE. $n = 5 - 6$.

Cuantificación del GR por inmunofluorescencia

Para conocer la distribución del GR total, de pSer232 y pSer246 en las subregiones CA1, CA2, CA3 y el GD del HD y del HV, se hicieron inmunofluorescencias duales en rebanadas seriadas de cerebro en las que se co-localizó al GR total con pSer232 o pSer246,

y se cuantificó el porcentaje de células inmunoreactivas a cada señal respecto al número total de células de cada subregión. Con esta técnica observamos que la inmunoreactividad de la proteína GR total en las diferentes subregiones del HD y el HV no cambió debido al entrenamiento (Figura 10), confirmando los resultados obtenidos con la técnica de Western-Blot. También pudimos observar que CA1 del HD posee una mayor inmunoreactividad al GR, pero esta no cambió debido al entrenamiento de los animales en el CMC (Figura 10 A).

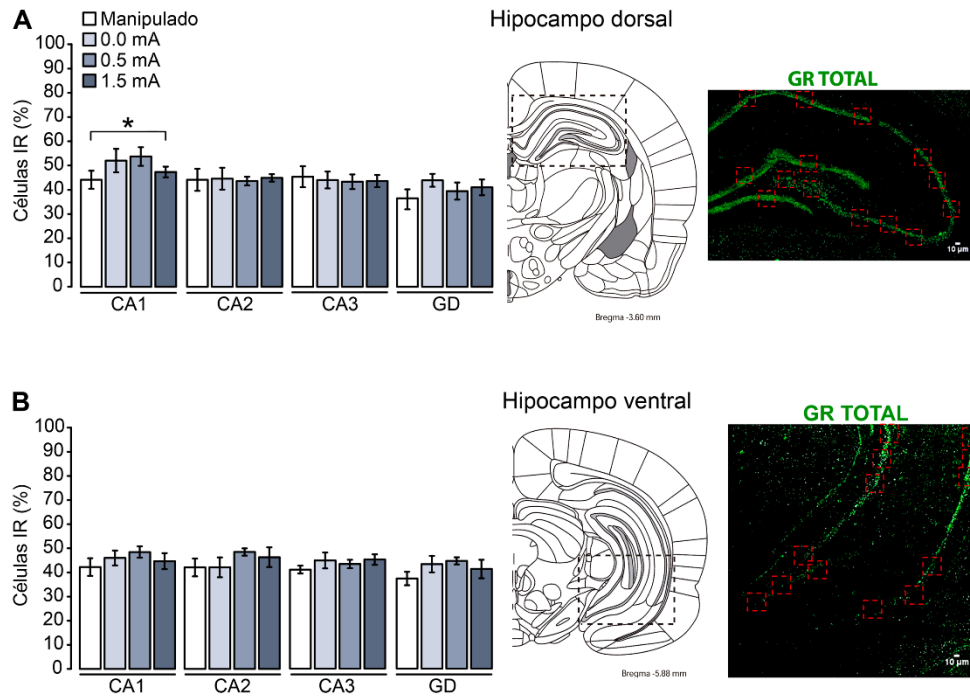


Figura 10. Distribución de la inmunoreactividad del GR total en las diferentes subregiones ventrales y dorsales del hipocampo. A la izquierda se muestra el porcentaje de células inmunoreactivas (IR) al GR total en cada subregión del HD (A) y del HV (B). El porcentaje se obtuvo respecto al total de células teñidas con el marcador de núcleos DAPI. A la derecha de cada gráfica se muestran los diagramas del Atlas Paxinos (1998) del HD y del HV que se consideraron para el análisis y a un costado se muestran microfotografías representativas tomadas de una rata del grupo manipulado, en donde se observa la señal inmunoreactiva del GR total en color verde y las áreas marcadas con recuadros rojos representan los campos utilizados para la cuantificación del número de células de cada subregión CA1, CA2, CA3 y giro dentado (GD). En todos los grupos se graficó la media \pm EE. $n = 6 - 7$. * $p < 0.05$.

Con la técnica de inmunofluorescencia pudimos observar cambios en pSer232 y pSer246 en diferentes subregiones del hipocampo. El entrenamiento en el CMC con 0.5 y 1.5 mA incrementó la densidad de células inmunoreactivas a pSer246 en CA1 del HD (Figura 11 A), pero no se alteró su proporción respecto a pSer232. En cambio, en CA2 se observó una tendencia a aumentar la inmunoreactividad de pSer246 al entrenar a los animales con 1.5 mA, lo que se vió reflejado en un aumento significativo de su proporción respecto a pSer232 (Figura

11 B). No se observaron cambios en la subregión de CA3 para ninguno de los grupos experimentales (Figura 11 C). En el GD observamos un incremento en pSer246 en los animales entrenados con 1.5 mA, y también una mayor proporción de esta fosforilación respecto a pSer232 (Figura 11 D). Estos resultados nos indican que el efecto del entrenamiento en el CMC sobre la fosforilación del GR recae principalmente en la Ser246 en subregiones específicas del HD.

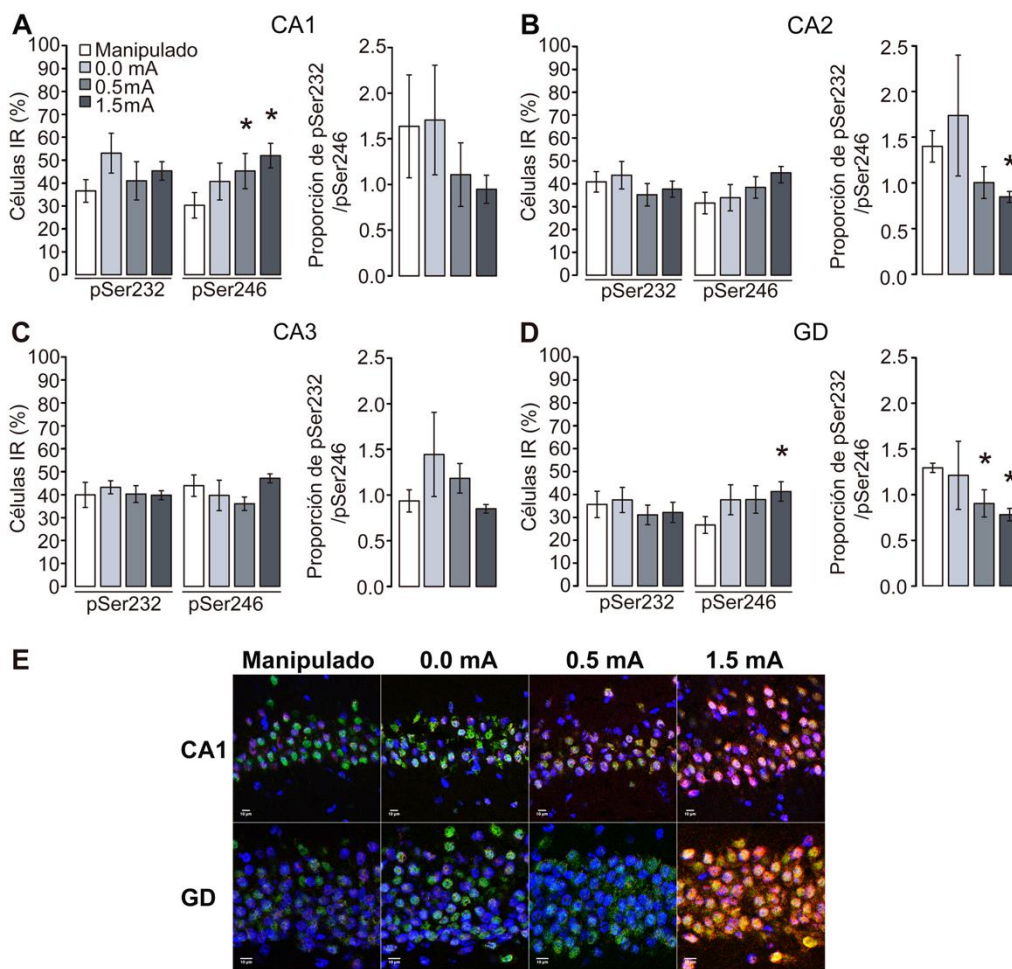


Figura 11. Distribución de la inmunoreactividad del GR fosforilado en Ser232 o Ser246 en las diferentes subregiones dorsales del hipocampo. CA1 (A), CA2 (B), CA3 (C) y el giro dentado (GD) (D). En E se muestran micrografías representativas de las células piramidales de CA1 y de las células granulares del GD para los grupos: control, 0.0, 0.5 y 1.5 mA; la señal en verde corresponde a la proteína GR total, en rojo a la pSer246 y en azul los núcleos. El porcentaje se obtuvo respecto al total de células teñidas con el marcador de núcleos DAPI. Para todos los grupos se graficó la media \pm EE. $n = 6 - 7$; * $p < 0.05$ versus control.

En el HV no se observaron cambios en las subregiones CA1 y CA2 en ninguno de los grupos experimentales (Figuras 12 A y B). La inmunoreactividad de pSer232 incrementó en CA3 en el grupo entrenado con 1.5 mA (Figura 12 C), siendo la única subregión de todo el hipocampo que presentó mayores niveles de una variante fosforilada no solamente respecto

al grupo control, sino también respecto al grupo de 0.0 mA. No obstante, este aumento no fue lo suficientemente alto como para cambiar su proporción respecto a pSer246, aunque existe una tendencia a aumentar ($p = 0.057$). Otra subregión en la que se encontraron cambios fue el GD, en el que aumentó la inmunoreactividad a pSer246 en los grupos entrenados con 0.5 y 1.5 mA (Figura 12 D). Sin embargo, no hubo cambios en la proporción entre ambas serinas.

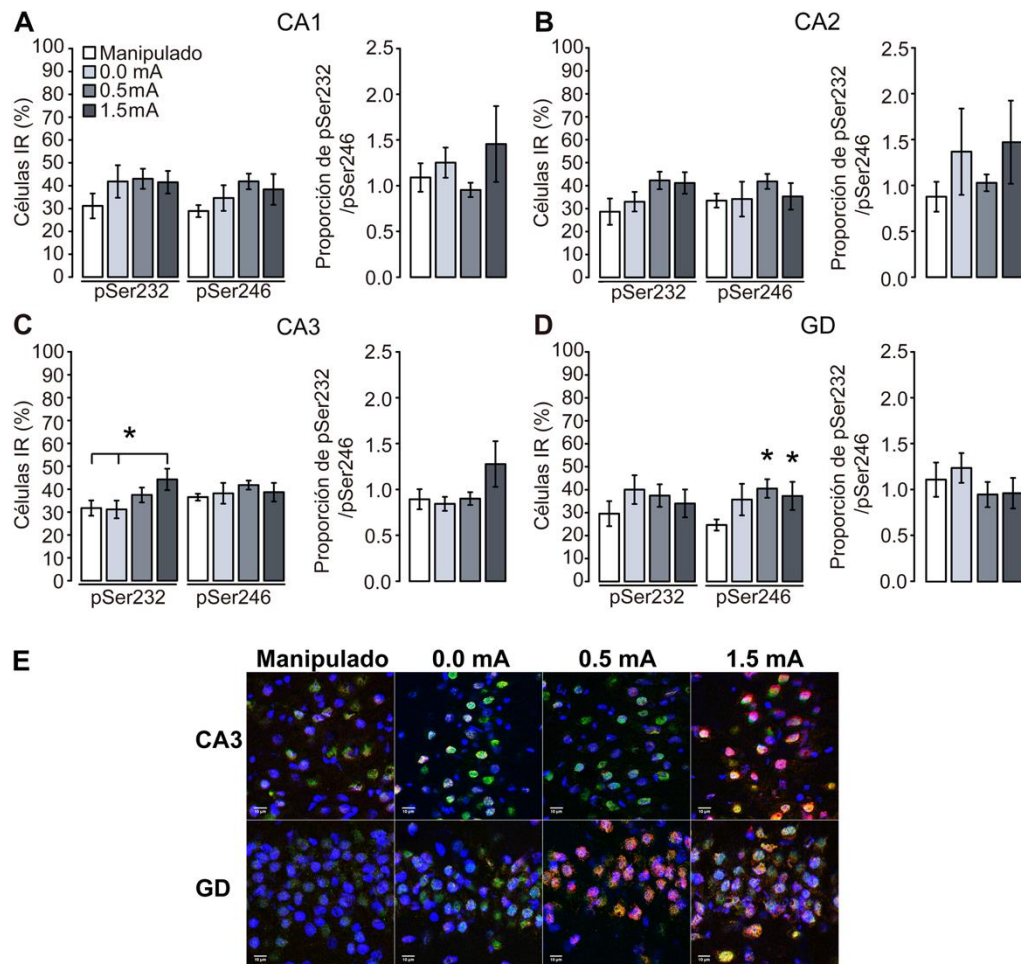


Figura 12. Distribución de la inmunoreactividad del GR fosforilado en Ser232 o Ser246 en las diferentes subregiones ventrales del hipocampo. CA1 (A), CA2 (B), CA3 (C) y el giro dentado (GD) (D). En E se muestran micrografías representativas de las células piramidales de CA3 y de las células granulares del giro dentado (GD) de los grupos control, 0.0, 0.5 y 1.5 mA; la señal en verde corresponde al GR total, en rojo a la pSer232 (en CA3) y pSer246 (en el GD) y en azul los núcleos. El porcentaje se obtuvo respecto al total de células teñidas con el marcador de núcleos DAPI. Para todos los grupos se graficó la media \pm EE. $n = 6 - 7$; * $p < 0.05$ versus control.

Para saber si los cambios observados en la fosforilación del GR se relacionan con cambios en la expresión de genes regulados por el GR, medimos la expresión de seis genes que participaran en procesos de plasticidad cerebral en el hipocampo y que previamente se les ha comprobado que su expresión cambia 1 h después de la administración de GCs o de la

aplicación de un estresor. Para estos experimentos se descartó el grupo de 0.5 mA, ya que todos los cambios que se observaron en la fosforilación del GR en las distintas subregiones del HD y del HV se presentaron únicamente en el grupo entrenado con 1.5 mA, sugiriendo que con esta intensidad también se podrían inducir cambios genómicos.

Primero analizamos los resultados obtenidos con la técnica de qPCR y posteriormente revisamos si hubo cambios en subregiones específicas con el análisis de hibridación *in situ*. El único gen que cambió su expresión con la técnica de hibridación *in situ* fue *limk1*, que disminuyó su expresión en CA1 del HD en los animales entrenados con 1.5 mA (Figura 13), pero esta diferencia no se observó con la cuantificación de la expresión por qPCR probablemente debido a un efecto de dilución al juntar todas las subregiones. Por el contrario, con la técnica de qPCR los genes que codifican para *maoa* y para *ndufv1* incrementaron su expresión en el HD de los animales entrenados con 1.5 mA en comparación con el grupo control de ratas únicamente manipuladas (Figura 13), pero con la técnica de hibridación *in situ* no se observaron cambios en ningún subcampo para estos dos genes, lo que indica que es la suma de la expresión de cada gen en todas las subregiones lo que conlleva a observar el incremento neto en su expresión. Para el gen *snap25* no se tienen resultados de qPCR porque los oligos adquiridos presentaron baja eficiencia en la reacción de amplificación, por lo que solo se tienen datos de hibridación *in situ*.

En el HV aumentó la expresión del gen que *maoa* en el grupo entrenado con 1.5 mA respecto al grupo entrenado con 0.0 mA (Figura 14), pero su expresión no cambió respecto al grupo control sino respecto al grupo entrenado sin choques. No encontramos cambios en la expresión de este gen en las diferentes subregiones, por lo que similar al HD, es la suma de la expresión del gen *maoa* en todas las subregiones lo que conlleva a observar el incremento en su expresión por qPCR.

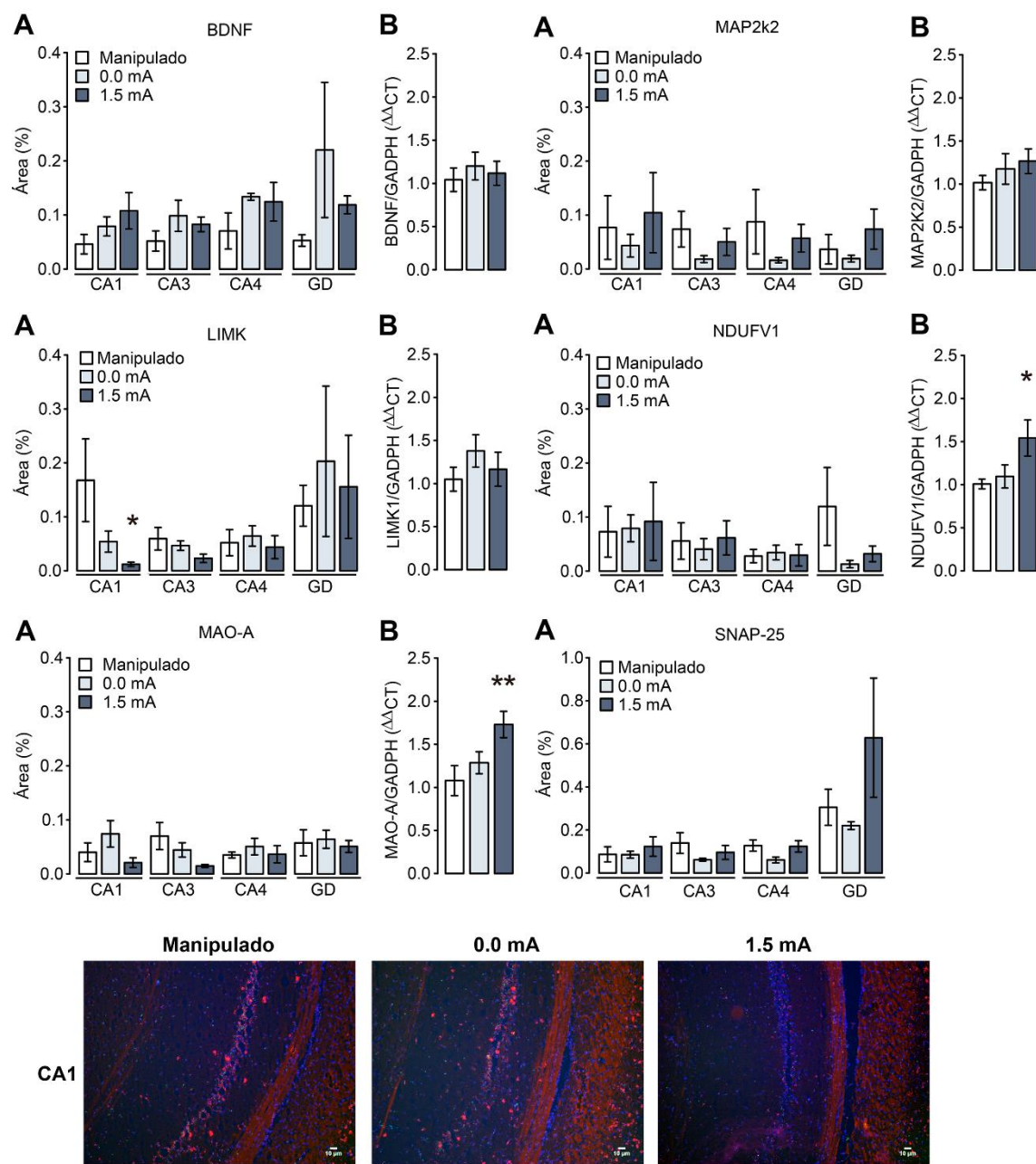


Figura 13. Expresión de genes regulados por el GR en las diferentes subregiones dorsales del hipocampo. A) Resultados de hibridación *in situ* de cada uno de los seis genes en las subregiones CA1, CA2, CA3 y el giro dentado (GD). B) Resultados de qPCR de cinco de los seis genes. En la parte inferior se muestran las micrografías representativas de la hibridación *in situ* del gen *limk1* (rojo) y los núcleos (azul) en CA1 de los grupos Manipulado, 0.0 y 1.5 mA. En todos los grupos se graficó la media \pm EE. $n = 5 - 6$; ** $p < 0.05$ del grupo 1.5 mA versus el grupo solo manipulado.

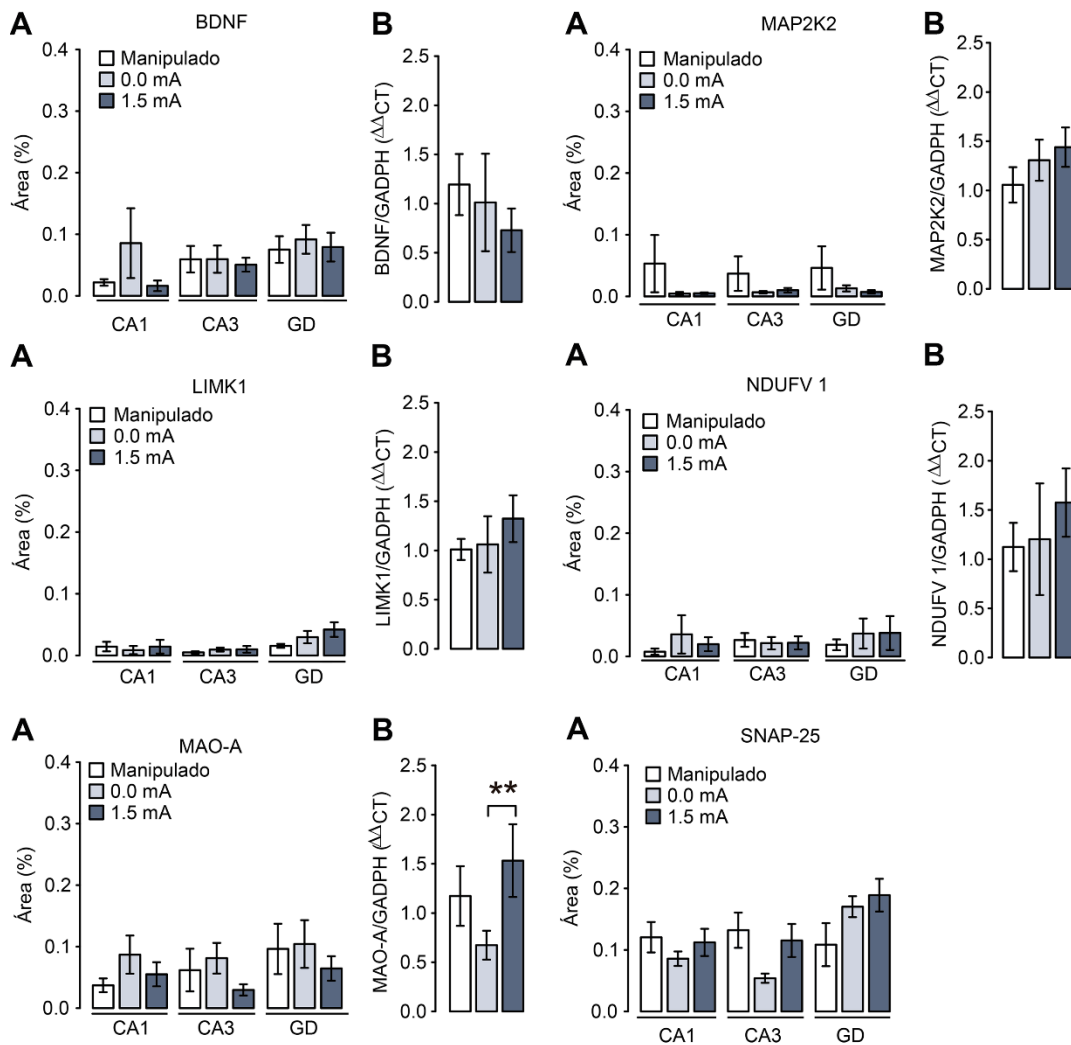


Figura 14. Expresión de genes regulados por el GR en las diferentes subregiones ventrales del hipocampo. A) Resultados de hibridación *in situ* de cada uno de los seis genes en las subregiones de CA1, CA3 y del giro dentado (GD). B) Resultados de qPCR de cinco de los seis genes. Para todos los grupos se graficó la media \pm EE. $n = 5 - 6$; ** $p < 0.05$ entre los grupos 0.0 y 1.5 mA.

8. Discusión

En el presente trabajo encontramos que el entrenamiento en la tarea de CMC incrementó la concentración de CORT en suero y aumentó la fosforilación del GR en regiones específicas del HD y del HV sin alterar la densidad del GR total. La fosforilación en la Ser246 incrementó en la región dorsal de CA1, así como en la región dorsal y ventral del GD; mientras que la densidad de GR fosforilado en Ser232 aumentó en la región ventral de CA3. Además, encontramos que el entrenamiento aumentó la expresión del gen *maoa* en el HD y en el HV, y disminuyó la expresión de *limk1* específicamente en CA1 del HD. En la Figura 15 se muestra un diagrama donde se resumen los hallazgos más importantes.

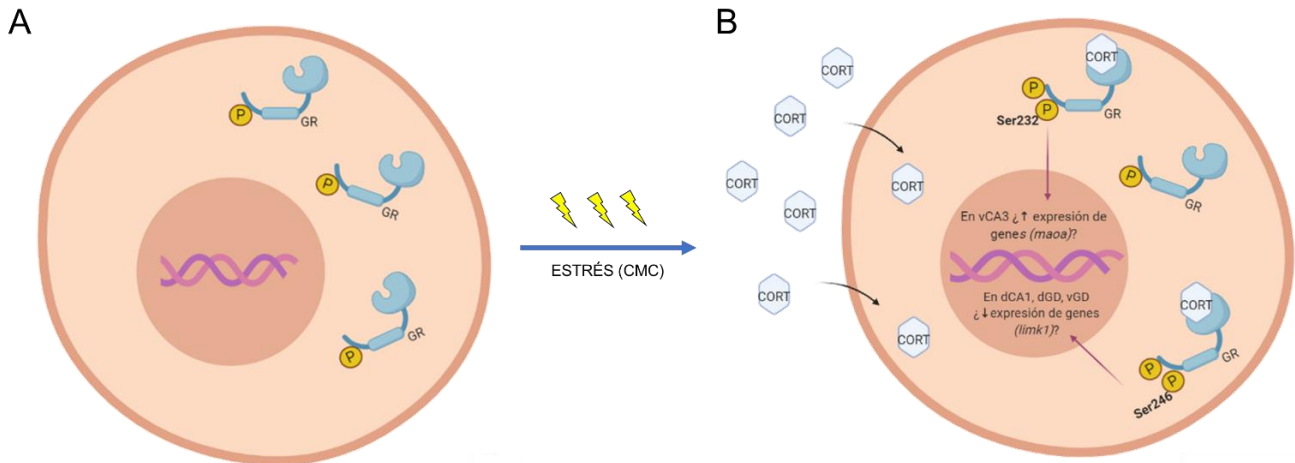


Figura 15. Modelo propuesto de los efectos del entrenamiento en el CMC sobre la fosforilación del GR. A) En condiciones basales (no estrés), la mayoría de los GRs se encuentran en el citoplasma, fosforilados sin la unión de la hormona (Gallihier-Beckley & Cidlowski, 2009). B) Después de un evento estresante (entrenamiento en el CMC) aumenta la concentración de CORT en suero (Cordero et al., 1998), atraviesa la membrana celular y se une a los GR. Esta unión induce la fosforilación del GR en la Ser232 en CA3 ventral, y en Ser246 en la región dorsal de CA1 y en la región ventral y dorsal del giro dentado (GD). La fosforilación del GR en cualquiera de estas dos serinas induce la translocación del complejo receptor-hormona al núcleo (Gallihier-Beckley & Cidlowski, 2009), en donde regulará la expresión de genes que participan en procesos de plasticidad neural, probablemente *maoa* y *limk1*.

Los animales entrenados en el CMC adquirieron, retuvieron y extinguieron la tarea. Se observó que el grado de retención y el proceso de extinción estuvieron relacionados con la intensidad del choque, tal como se ha descrito en varios reportes (Cordero et al., 1998; Fanselow & Bolles, 1979; Luyten et al., 2011). Los niveles de congelamiento obtenidos en la sesión de Extinción 1 para las diferentes intensidades de choque fueron muy similares a los reportados en diferentes estudios previos, de tal forma que trabajos donde utilizan 0.5 mA, reportan valores de congelamiento en el rango de 20 % hasta el 40 % (Kim et al., 1993; Phillips & LeDoux, 1992; Suvrathan et al., 2013), y con la intensidad de 1.5 mA se reportan valores de entre 60 y 80 % (Levenson et al., 2002; Wiltgen et al., 2006). La variabilidad en los porcentajes de congelamiento obtenidos en estos reportes puede deberse a diferencias entre sus protocolos. Por ejemplo, no todos los protocolos incluyeron una sesión de exploración previa a la sesión de entrenamiento, lo que se puede reflejar en mayores niveles de congelamiento debido a la exposición a un ambiente novedoso; la cantidad y la duración de los choques durante la sesión de entrenamiento; el intervalo post-entrenamiento para la medición de la retención de la memoria; el programa y los parámetros utilizados para el análisis

computarizado; las características de los aparatos utilizados para el condicionamiento (cámara de condicionamiento, estimulador, cubículo atenuante, etc.); estrés debido a una cirugía previa; diferencias entre cepas de ratas; entre otras. Los resultados conductuales obtenidos en este trabajo poseen las características necesarias para la validación del paradigma, es decir, se observó una curva de aprendizaje de los animales entrenados con choque, en la que se distinguieron las etapas de adquisición, retención y extinción de la memoria de miedo, así como el efecto de la intensidad del choque en la retención y en el proceso de extinción.

Además de provocar diferentes niveles de congelamiento en los animales, las dos intensidades de choque utilizadas en el entrenamiento también estimularon de forma distinta la liberación de CORT hacia la circulación, siendo proporcional a la intensidad del choque. Este efecto ya se ha reportado anteriormente utilizando la misma tarea (Cordero et al., 1998), así como en otros paradigmas de aprendizaje en cuyos protocolos se utilizan diferentes intensidades del estímulo aversivo en el entrenamiento de animales (Armario et al., 1986; Drugan et al., 2005; Pitman et al., 1988; Rodgers et al., 1999; Sandi et al., 1997; Woodson et al., 2003). Se sabe que la cantidad de CORT en suero es mayor que en los tejidos a los que llega, en parte por su unión a proteínas de transporte. En el caso del hipocampo de rata, la concentración de hormona libre después de un evento estresante (exposición a un ambiente novedoso o nado forzado) tarda aproximadamente 20 min en elevarse en la región dorsal y 90 min en la región ventral, llegando a concentraciones 20 % menores que las que se observan en suero (Dorey et al., 2012; Droste et al., 2008). Tomando en cuenta esto, esperaríamos que los niveles de hormona en el hipocampo de las ratas que se entrenaron en este trabajo fueran alrededor de 500 ng/mL y de 1000 ng/mL para los grupos entrenados con 0.5 y 1.5 mA, respectivamente. Además, en un trabajo en donde se utilizó un modelo de ratas adrenalectomizadas, la inyección de corticosterona de forma intraperitoneal (3 mg/Kg) elevó los niveles de corticosterona en suero a 500 ng/mL y se demostró, a través del uso de inmunofluorescencia para detectar al GR en las subregiones del hipocampo dorsal, que esta concentración de hormona liberada fue suficiente para activar al GR y observar su señal en el núcleo 60 min después de la inyección (Sarabdjitsingh et al., 2009). Tomando en cuenta estos resultados, era muy probable que los niveles de hormona en suero que cuantificamos en los grupos de animales entrenados con las dos intensidades de choque fueran suficientes para llegar al hipocampo, así como para unirse y activar a los GR.

El GR es un factor de la transcripción que se autorregula de forma negativa en ciertas áreas cerebrales después de la unión de la hormona, entre ellas el hipocampo (Sapolsky et al., 1986). Sin embargo, la disminución de la expresión de la proteína se ha observado en reportes previos a partir de 5 h o más después de la administración de hormona o después de la aplicación de un estímulo aversivo o estresante (Blind & Garabedian, 2008; Chen et al., 2008). Varios trabajos han reportado que la densidad óptica de la proteína GR total no cambia a los 60 min, ya sea *in vitro* después de la incubación de células con el agonista del GR, la dexametasona (Lambert et al., 2013; Wang et al., 2002), o *in vivo* después del entrenamiento de animales en la tarea de condicionamiento de miedo (Xing et al., 2014). Con las técnicas de Western-Blot y de inmunohistoquímica que utilizamos en este trabajo coincidimos en que la densidad de proteína del GR total no es afectada 60 min después del entrenamiento en el CMC, en ninguna de las subregiones del HD y del HV. Sin embargo, si alargáramos este periodo, muy probablemente encontraríamos una disminución de la densidad del GR.

Los resultados que obtuvimos de densidad óptica y de inmunoreactividad de las serinas fosforiladas fueron muy contrastantes, en parte debido a que para la técnica de Western-Blot se extrajo el HD y el HV completos, sin separar el tejido correspondiente a las subregiones CA1, CA2, CA3 y GD, ya que estas son muy pequeñas y su extracción por separado conllevaría a la contaminación de la muestra con regiones cercanas. Un trabajo previo reportó cambios en la densidad óptica de ambas serinas fosforiladas diferenciando entre fracciones nucleares y citoplásmicas del hipocampo de ratas sometidas a estrés agudo (inmovilidad durante 30 min), observando un aumento en la proporción pSer232/GR-total tanto en citoplasma como en el núcleo a través de Western-Blot (Adzic et al., 2009), sin embargo, no se diferenció entre las regiones dorsal y ventral del hipocampo, ni entre CA1, CA2, CA3 y GD. Nuestros resultados de inmunohistoquímica complementan los ya reportados, ya que cuantificamos las células inmunoreactivas a pSer232 o pSer246 en cada subregión hipocampal, logrando observar cambios en ambas fosforilaciones.

Fue muy interesante observar que los cambios observados en la fosforilación del GR solo se presentaron en el grupo de animales que fueron entrenados con la intensidad alta (1.5 mA), por lo que la fosforilación puede ser uno de los mecanismos moleculares que subyacen a la generalización de la respuesta de miedo, un fenómeno que en humanos se ha observado entre con estímulos muy aversivos (Dunsmoor et al., 2017). La generalización del aprendizaje del miedo es una conducta natural que permite a un organismo reaccionar de forma adecuada

ante un estímulo novedoso, basado en su experiencia con un estímulo similar. Sin embargo, cuando esta reacción se genera ante estímulos que no son aversivos, entonces se crea una sobre-generalización, que además de desperdiciar fuentes de energía, puede desencadenar la formación de traumas o fobias. Se ha observado que el entrenamiento de animales en la tarea de condicionamiento utilizando choques de intensidad alta, induce que se congelen en contextos diferentes a los que fueron entrenadas, es decir, generalizan (Baldi et al., 2004), por lo que la intensidad de 1.5 mA utilizada en este trabajo como intensidad alta podría estar desencadenando la formación de este fenómeno.

La fosforilación en Ser246 aumentó en la región ventral y dorsal del GD. El efecto de la fosforilación en esta serina es el silenciamiento de genes (Gallagher-Beckley & Cidlowski, 2009; Schoneveld et al., 2004; Wang et al., 2002) y, a pesar de que la consolidación de la memoria implica la síntesis de proteínas como uno de los mecanismos de plasticidad, a través del uso de diferentes técnicas moleculares para medir cambios en la expresión de genes se ha demostrado que uno de los efectos principales del CMC en el hipocampo dorsal es el silenciamiento de genes, especialmente de aquellos que codifican para proteínas que forman parte de la maquinaria de traducción de otras proteínas (Cho et al., 2015; Morsink et al., 2006). El GD es el sitio de entrada de la información hacia el hipocampo, especialmente su región ventral. Su función es la separación de patrones de la información, para diferenciarlos antes de que sean enviados a CA3 y posteriormente a CA1. Lesiones en la región dorsal del GD antes del entrenamiento en el CMC, dañan la adquisición y la evocación de la memoria de miedo (Lee & Kesner, 2004), mientras que lesiones neurotóxicas en la región ventral del GD (específicamente en la zona caudal) y el subículo, deterioran la adquisición del CMC (Maren & Holt, 2004). La inactivación del GR en el HD y el HV, con un antagonista (RU 38486) justo antes del entrenamiento, demostró que solo la inactivación en el HV (abarcando CA1, CA3 y el GD), deteriora la consolidación de la memoria de miedo, mientras que el antagonista aplicado en el HD no afectó la memoria de los animales (Donley et al., 2005), sugiriendo que el efecto de los GCs en el hipocampo, es específica de la activación de los GR en la región ventral durante el condicionamiento. Esta subregión ha sido asociada a funciones emotivas debido a que posee conexiones directas provenientes de la amígdala (Blair & Fanselow, 2014), por lo que el aumento de pSer246 en el GD podría estar reduciendo la expresión de genes en ciertas células para facilitar el proceso de selección de solo aquellas células que son necesarias para transmitir información (espacial y emotiva) hacia CA3. Además, debido a que

lesiones en el BLA de la amígdala reducen la translocación nuclear del GR en el GD y en CA1 (Jeon et al., 2012), la fosforilación del GR en el hipocampo puede estar siendo modulada desde la amígdala.

CA1 dorsal es el principal sitio de salida de la formación hipocampal hacia otras áreas del cerebro, incluidas las cortezas retrosplenial y el cíngulo anterior, las cuales están involucradas principalmente en el procesamiento cognitivo de información espacial y visual (Fanselow & Dong, 2010; Lee & Kesner, 2004). La inhibición neurotóxica u optogénica en CA1 dorsal bloquea los procesos de adquisición y de evocación del CMC, por lo que las neuronas de esta región codifican el contexto resultante de la exploración espacial (Blair & Fanselow, 2014; Goshen et al., 2011; Ji & Maren, 2008; Lee & Kesner, 2004; Maren & Holt, 2004; Nomura et al., 2012). El aumento que observamos en la fosforilación del GR en la pSer246 probablemente está silenciando genes en células de CA1 dorsal que no son necesarias para la consolidación de la memoria espacial, y así seleccionar solo aquellos genes que permitirán almacenar la representación de la información contextual que se enviará hacia otras regiones cerebrales.

La única subregión en la que observamos cambios en la inmunoreactividad de pSer232 fue CA3 en su región ventral. CA3 es un sitio de asociación y de circulación de la información dentro del hipocampo, y lesiones en su región ventral causan déficits en la expresión del congelamiento 24 o 48 h después del entrenamiento (Hunsaker & Kesner, 2008; Hunsaker et al., 2009). Se sabe que pSer232 induce la expresión de genes regulados por el GR (Gallagher-Beckley & Cidlowski, 2009; Schoneveld et al., 2004; Wang et al., 2002), por lo que el aumento que observamos en la fosforilación de esta serina probablemente está induciendo la expresión de genes que codifican para proteínas que se requieren para establecer el trazo neural de la información y generar memoria de largo plazo.

De los seis genes a los que se les cuantificó su expresión en las diferentes subregiones del hipocampo, solo observamos cambios en *limk1* y *maoa*. La disminución de la expresión de *limk1* en CA1 dorsal se puede relacionar con el incremento en pSer246 que observamos en esta misma subregión, por lo que probablemente este sea uno de los genes cuya expresión está siendo silenciada por el GR fosforilado en pSer246. La proteína para la cual codifica este gen es una cinasa que regula la dinámica de polimerización de la actina a través de la fosforilación y la consiguiente inactivación del factor de despolimerización. Trabajos en los que se utiliza un modelo de ratón que no expresa el gen *limk*, muestran una disminución en la LTP

hipocampal, así como la facilitación de la memoria de miedo (Lamprecht, 2011). Por lo que *limk1* podría ser uno de los genes que están siendo inhibidos por el GR fosforado en la Ser246 para inducir la polimerización de actina y aumentar la conectividad sináptica entre neuronas de CA1 para facilitar la consolidación de la memoria de miedo.

La regulación de la expresión del miedo es un proceso importante para evitar la generalización de miedo que podría desencadenar la aparición de desórdenes de miedo, como el síndrome de estrés postraumático (PSTD, por sus siglas en inglés). Se ha reportado que el funcionamiento de la enzima MAO-A es relevante en este aspecto, ya que participa en la homeostasis de neurotransmisores monoaminérgicos, tales como serotonina, noradrenalina y dopamina, y se ha reportado que la deficiencia de esta enzima resulta en el aumento de la respuesta de miedo condicionado y en la disminución de la discriminación del contexto (sobre-generalización), por lo que una de sus funciones es evitar una respuesta exacerbada de miedo ante un evento muy emotivo o aversivo (Singh et al., 2013). En línea con estos antecedentes, nosotros encontramos que el grupo de animales entrenados con la intensidad más alta de choque (1.5 mA) fue el único en mostrar un aumento en la expresión del gen *maoa* en el HD y el HV, sin embargo, no encontramos diferencias entre subregiones hipocampales, lo que sugiere que se requiere un aumento de su expresión a lo largo del eje dorsoventral del hipocampo como un mecanismo de regulación de la actividad hipocampal.

La fosforilación del GR y su participación en procesos celulares que facilitan la consolidación de la memoria de miedo, así como su relación con desórdenes de miedo y de ansiedad y por lo tanto la implicación clínica que esto conlleva (Anacker et al., 2011; Guidotti et al., 2013), demuestra la importancia de continuar estudiando los mecanismos de activación y de acción del GR, así como el resto de los participantes moleculares asociados con la síntesis, liberación, actividad y regulación de los GCs. Los resultados obtenidos en este trabajo generan varias perspectivas, entre las que se encuentran estudiar a la distribución y actividad de las cinasas que fosforilan al GR; realizar un análisis de expresión génica para ubicar mayor número de genes que están siendo regulados por el GR durante el condicionamiento; así como estudiar cuáles son los mecanismos transcripcionales por los que el GR activa o inhibe la expresión génica durante la adquisición y la consolidación de la memoria, incluyendo su interacción con el DNA, con cofactores (activadores y/o inhibidores), así como con otros factores de la transcripción.

9. Conclusión

La adquisición de la tarea de CMC no afecta la densidad GR total en el hipocampo dorsal y ventral, pero sí induce su fosforilación en la Ser232 en la región ventral de CA3, así como la fosforilación en Ser246 en la región dorsal y ventral del GD y en la región dorsal de CA1. Estos resultados sugieren que uno de los mecanismos de plasticidad por el que los GCs podrían estar modulando la consolidación de la memoria de miedo es a través de la fosforilación en serinas específicas del GR y así regular la expresión de genes relacionados con procesos plásticos dependiendo de la función mnemónica de las diferentes subregiones del hipocampo.

10. Contribución del estudiante en el proyecto

Este trabajo se realizó en colaboración con los laboratorios Neurobiología del aprendizaje a cargo de la Dra. Gina Quirarte, Neurobiología de la Memoria a cargo del Dr. Roberto Prado, y Bioquímica de Hormonas a cargo del Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, todos pertenecientes al Instituto de Neurobiología de la UNAM. Estandaricé la prueba de CMC, así como diseñé y realicé todos los experimentos bajo la co-tutoría de la Dra. Gina Quirarte y de la Dra. Maricela Luna (Investigadora asociada del laboratorio de Bioquímica de Hormonas). Los resultados conductuales los obtuve en el laboratorio Neurobiología del aprendizaje y Neurobiología de la Memoria bajo la enseñanza de la M. V. Z. Norma Serafín; y las mediciones bioquímicas (ELISA, Western-Blot e inmunohistoquímica) las llevé a cabo en el laboratorio Bioquímica de Hormonas bajo la enseñanza de la M. en C. Martha Carranza. Además, realicé una estancia de tres meses en el laboratorio de Endocrinología a cargo del Prof. Onno Meijer, perteneciente al Centro Médico de la Universidad de Leiden (LUMC), Holanda, en donde hice el análisis de expresión de genes con los métodos de qPCR y de hibridación *in situ*.

Durante los estudios de doctorado expuse los resultados de este trabajo en varios congresos, tanto en modalidad de poster como en presentación oral, los cuales están detallados en el Anexo B.

11. Referencias

- Adzic, M., Djordjevic, J., Djordjevic, A., Niciforovic, A., Demonacos, C., Radojicic, M., & Krstic-Demonacos, M. (2009). Acute or chronic stress induce cell compartment-specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alter its transcriptional activity in Wistar rat brain. *The Journal of Endocrinology*, 202(1), 87-97. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0509>
- Anacker, C., Zunszain, P. A., Cattaneo, A., Carvalho, L. A., Garabedian, M. J., Thuret, S., Price, J., & Pariante, C. M. (2011). Antidepressants increase human hippocampal neurogenesis by activating the glucocorticoid receptor. *Molecular Psychiatry*, 16(7), 738-750. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.26>
- Anagnostaras, S. G., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., & Silva, A. J. (2000). Computer-assisted behavioral assessment of pavlovian fear conditioning in mice. *Learning & Memory* 7(1), 58-72. <https://doi.org/10.1101/lm.7.1.58>
- Armario, A., Montero, J. L., & Balasch, J. (1986). Sensitivity of corticosterone and some metabolic variables to graded levels of low intensity stresses in adult male rats. *Physiology & Behavior*, 37(4), 559-561. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(86\)90285-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(86)90285-4)
- Atzori, M., Cuevas-Olguin, R., Esquivel-Rendon, E., Garcia-Oscos, F., Salgado-Delgado, R. C., Saderi, N., Miranda-Morales, M., Treviño, M., Pineda, J. C., & Salgado, H. (2016). Locus ceruleus norepinephrine release: A central regulator of CNS spatio-temporal activation? *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 8, 25-25. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00025>
- Baldi, E., Lorenzini, C. A., & Bucherelli, C. (2004). Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 81(3), 162-166. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.02.004>
- Bast, T., Zhang, W. N., & Feldon, J. (2001). The ventral hippocampus and fear conditioning in rats - different anterograde amnesias of fear after tetrodotoxin inactivation and infusion of the gaba(a) agonist muscimol. *Experimental Brain Research*, 139(1), 39-52. <https://doi.org/10.1007/s002210100746>
- Birbaumer, N., Veit, R., Lotze, M., Erb, M., Hermann, C., Grodd, W., & Flor, H. (2005). Deficient fear conditioning in psychopathy: A functional magnetic resonance imaging study. *Archives of General Psychiatry*, 62(7), 799-805. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.7.799>
- Blair, H. T., & Fanselow, M. S. (2014). Fear and memory: A view of the hippocampus through the lens of the amygdala. In D. Derdikman & J. Knierim (Eds.), *Space, time and memory in the hippocampal formation* (pp. 465-496): Springer, Vienna.
- Blind, R. D., & Garabedian, M. J. (2008). Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 109(1-2), 150-157. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.01.002>
- Brinks, V., Berger, S., Gass, P., de Kloet, E. R., & Oitzl, M. S. (2009). Mineralocorticoid receptors in control of emotional arousal and fear memory. *Hormones and Behavior*, 56(2), 232-238. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.05.003>
- Buckingham, J. C. (2006). Glucocorticoids: Exemplars of multi-tasking. *British Journal of Pharmacology*, 147 Suppl 1, S258-268. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706456>
- Chaaya, N., Battle, A. R., & Johnson, L. R. (2018). An update on contextual fear memory mechanisms: Transition between amygdala and hippocampus. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 92, 43-54. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.05.013>

- Chaaya, N., Jacques, A., Belmer, A., Beecher, K., Ali, S. A., Chehrehasa, F., Battle, A. R., Johnson, L. R., & Bartlett, S. E. (2019). Contextual fear conditioning alter microglia number and morphology in the rat dorsal hippocampus. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 214-214. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00214>
- Chan, C.-S., Weeber, E. J., Kurup, S., Sweatt, J. D., & Davis, R. L. (2003). Integrin requirement for hippocampal synaptic plasticity and spatial memory. *The Journal of Neuroscience*, 23(18), 7107-7116. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-18-07107.2003>
- Chen, H., Lombès, M., & Le Menuet, D. (2017). Glucocorticoid receptor represses brain-derived neurotrophic factor expression in neuron-like cells. *Molecular Brain*, 10(1), 12-12. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0295-x>
- Chen, W., Dang, T., Blind, R. D., Wang, Z., Cavasotto, C. N., Hittelman, A. B., Rogatsky, I., Logan, S. K., & Garabedian, M. J. (2008). Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *Molecular Endocrinology*, 22(8), 1754-1766. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0219>
- Cho, J., Yu, N.-K., Choi, J.-H., Sim, S.-E., Kang, S. J., Kwak, C., Lee, S.-W., Kim, J.-i., Choi, D. I., Kim, V. N., & Kaang, B.-K. (2015). Multiple repressive mechanisms in the hippocampus during memory formation. *Science*, 350(6256), 82. <https://doi.org/10.1126/science.aac7368>
- Chwang, W. B., O'Riordan, K. J., Levenson, J. M., & Sweatt, J. D. (2006). ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. *Learning & Memory*, 13(3), 322-328. <https://doi.org/10.1101/lm.152906>
- Clayton, E. C., & Williams, C. L. (2000). Adrenergic activation of the nucleus tractus solitarius potentiates amygdala norepinephrine release and enhances retention performance in emotionally arousing and spatial memory tasks. *Behavioural Brain Research*, 112(1), 151-158. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(00\)00178-9](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00178-9)
- Conrad, C. D. (2005). The relationship between acute glucocorticoid levels and hippocampal function depends upon task aversiveness and memory processing stage. *Nonlinearity in Biology, Toxicology, Medicine*, 3(1), 57-78. <https://doi.org/10.1080/15401420490900245>
- Cooper, E. C., & Lowenstein, D. H. (2002). Hippocampus. In *Encyclopedia of life sciences* (pp. 1-9): Nature Publishing Group.
- Cordero, M. I., Merino, J. J., & Sandi, C. (1998). Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 112(4), 885-891. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.112.4.885>
- Czerniawski, J., Yoon, T., & Otto, T. (2009). Dissociating space and trace in dorsal and ventral hippocampus. *Hippocampus*, 19(1), 20-32. <https://doi.org/10.1002/hipo.20469>
- Danielson, N. B., Turi, G. F., Ladow, M., Chavlis, S., Petrantonakis, P. C., Poirazi, P., & Losonczy, A. (2017). In vivo imaging of dentate gyrus mossy cells in behaving mice. *Neuron*, 93(3), 552-559.e554. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.019>
- Datson, N. A., Morsink, M. C., Meijer, O. C., & de Kloet, E. R. (2008). Central corticosteroid actions: Search for gene targets. *European Journal of Pharmacology*, 583(2-3), 272-289. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.070>
- Daumas, S., Halley, H., Francés, B., & Lassalle, J.-M. (2005). Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: Differential involvement of dorsal ca3 and ca1 hippocampal subregions. *Learning & Memory*, 12(4), 375-382. <https://doi.org/10.1101/lm.81905>

- Donley, M. P., Schulkin, J., & Rosen, J. B. (2005). Glucocorticoid receptor antagonism in the basolateral amygdala and ventral hippocampus interferes with long-term memory of contextual fear. *Behavioural Brain Research*, 164(2), 197-205. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.06.020>
- Dorey, R., Piérard, C., Chauveau, F., David, V., & Béracochéa, D. (2012). Stress-induced memory retrieval impairments: Different time-course involvement of corticosterone and glucocorticoid receptors in dorsal and ventral hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 37(13), 2870-2880. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.170>
- Droste, S. K., de Groote, L., Atkinson, H. C., Lightman, S. L., Reul, J. M. H. M., & Linthorst, A. C. E. (2008). Corticosterone levels in the brain show a distinct ultradian rhythm but a delayed response to forced swim stress *Endocrinology*, 149(7), 3244-3253. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0103>
- Drugan, R. C., Eren, S., Hazi, A., Silva, J., Christianson, J. P., & Kent, S. (2005). Impact of water temperature and stressor controllability on swim stress-induced changes in body temperature, serum corticosterone, and immobility in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 82(2), 397-403. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.09.011>
- Dunsmoor, J. E., Kroes, M. C. W., Braren, S. H., & Phelps, E. A. (2017). Threat intensity widens fear generalization gradients. *Behavioral Neuroscience*, 131(2), 168-175. <https://doi.org/10.1037/bne0000186>
- Fanselow, M. S. (2010). From contextual fear to a dynamic view of memory systems. *Trends in Cognitive Sciences*, 14(1), 7-15. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2009.10.008>
- Fanselow, M. S., & Bolles, R. C. (1979). Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93(4), 736-744. <https://doi.org/10.1037/h0077609>
- Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65(1), 7-19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>
- Gallagher-Beckley, A. J., & Cidlowski, J. A. (2009). Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB Life*, 61(10), 979-986. <https://doi.org/10.1002/iub.245>
- Giese, K. P., & Mizuno, K. (2013). The roles of protein kinases in learning and memory. *Learning & Memory* 20(10), 540-552. <https://doi.org/10.1101/lm.028449.112>
- Goosens, K. A., & Maren, S. (2001). Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. *Learning & Memory* 8(3), 148-155. <https://doi.org/10.1101/lm.37601>
- Goshen, I., Brodsky, M., Prakash, R., Wallace, J., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C., & Deisseroth, K. (2011). Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell*, 147(3), 678-689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.033>
- Groeneweg, F. L., Karst, H., de Kloet, E. R., & Joëls, M. (2011). Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *The Journal of Endocrinology*, 209(2), 153-167. <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0472>
- Guidotti, G., Calabrese, F., Anacker, C., Racagni, G., Pariante, C. M., & Riva, M. A. (2013). Glucocorticoid receptor and FKBP5 expression is altered following exposure to chronic stress: Modulation by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology*, 38(4), 616-627. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.225>
- Hall, J., Thomas, K. L., & Everitt, B. J. (2001). Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: Selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *The*

- Journal of Neuroscience*, 21(6), 2186-2193. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-06-02186.2001>
- Hansson, A. C., Cintra, A., Belluardo, N., Sommer, W., Bhatnagar, M., Bader, M., Ganten, D., & Fuxe, K. (2000). Gluco- and mineralocorticoid receptor-mediated regulation of neurotrophic factor gene expression in the dorsal hippocampus and the neocortex of the rat. *European Journal of Neuroscience*, 12(8), 2918-2934. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00185.x>
- Hawley, D. F., & Leasure, J. L. (2012). Region-specific response of the hippocampus to chronic unpredictable stress. *Hippocampus*, 22(6), 1338-1349. <https://doi.org/10.1002/hipo.20970>
- Hobin, J. A., Ji, J., & Maren, S. (2006). Ventral hippocampal muscimol disrupts context-specific fear memory retrieval after extinction in rats. *Hippocampus*, 16(2), 174-182. <https://doi.org/10.1002/hipo.20144>
- Hou, Q.-L., Gao, X., Lu, Q., Zhang, X.-H., Tu, Y.-Y., Jin, M.-L., Zhao, G.-P., Yu, L., Jing, N.-H., & Li, B.-M. (2006). SNAP-25 in hippocampal CA3 region is required for long-term memory formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347(4), 955-962. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.184>
- Huckleberry, K. A., Shue, F., Copeland, T., Chitwood, R. A., Yin, W., & Drew, M. R. (2018). Dorsal and ventral hippocampal adult-born neurons contribute to context fear memory. *Neuropsychopharmacology*, 43(12), 2487-2496. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0109-6>
- Hudgins, C., & Otto, T. (2019). Hippocampal arc protein expression and conditioned fear. *Neurobiology of Learning and Memory*, 161, 175-191. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.04.004>
- Hunsaker, M. R., & Kesner, R. P. (2008). Dissociations across the dorsal-ventral axis of CA3 and CA1 for encoding and retrieval of contextual and auditory-cued fear. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(1), 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.08.016>
- Hunsaker, M. R., Tran, G. T., & Kesner, R. P. (2009). A behavioral analysis of the role of CA3 and CA1 subcortical efferents during classical fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 123(3), 624-630. <https://doi.org/10.1037/a0015455>
- Izquierdo, I., Furini, C. R. G., & Myskiw, J. C. (2016). Fear memory. *Physiological Reviews*, 96(2), 695-750. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2015>
- Jacobs, N. S., Cushman, J. D., & Fanselow, M. S. (2010). The accurate measurement of fear memory in pavlovian conditioning: Resolving the baseline issue. *Journal of Neuroscience Methods*, 190(2), 235-239. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.04.029>
- Jeon, B., Hwang, Y. K., Lee, S. Y., Kim, D., Chung, C., & Han, J. S. (2012). The role of basolateral amygdala in the regulation of stress-induced phosphorylated extracellular signal-regulated kinase expression in the hippocampus. *Neuroscience*, 224, 191-201. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.035>
- Ji, J., & Maren, S. (2008). Differential roles for hippocampal areas CA1 and CA3 in the contextual encoding and retrieval of extinguished fear. *Learning & Memory* 15(4), 244-251. <https://doi.org/10.1101/lm.794808>
- Joëls, M., & Karst, H. (2012). Corticosteroid effects on calcium signaling in limbic neurons. *Cell Calcium*, 51(3-4), 277-283. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.11.002>
- Joëls, M., Karst, H., DeRijk, R., & de Kloet, E. R. (2008). The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends in Neurosciences*, 31(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.10.005>

- Kadmiel, M., & Cidlowski, J. A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(9), 518-530. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.07.003>
- Kerr, D. S., Campbell, L. W., Thibault, O., & Landfield, P. W. (1992). Hippocampal glucocorticoid receptor activation enhances voltage-dependent Ca²⁺ conductances: Relevance to brain aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(18), 8527-8531. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.18.8527>
- Kheirbek, M. A., Drew, L. J., Burghardt, N. S., Costantini, D. O., Tannenholz, L., Ahmari, S. E., Zeng, H., Fenton, A. A., & Hen, R. (2013). Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Neuron*, 77(5), 955-968. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.038>
- Kim, J. J., & Diamond, D. M. (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(6), 453-462. <https://doi.org/10.1038/nrn849>
- Kim, J. J., Rison, R. A., & Fanselow, M. S. (1993). Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short-term and long-term contextual fear. *Behavioral Neuroscience*, 107(6), 1093-1098. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.107.6.1093>
- Kim, W. B., & Cho, J.-H. (2020). Encoding of contextual fear memory in hippocampal–amygdala circuit. *Nature Communications*, 11(1), 1382. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15121-2>
- Kino, T., Manoli, I., Kelkar, S., Wang, Y., Su, Y. A., & Chrousos, G. P. (2009). Glucocorticoid receptor (GR) β has intrinsic, GR α -independent transcriptional activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381(4), 671-675. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.110>
- Kjelstrup, K. G., Tuvnes, F. A., Steffenach, H.-A., Murison, R., Moser, E. I., & Moser, M.-B. (2002). Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10825-10830. <https://doi.org/10.1073/pnas.152112399>
- Kopec, C. D., Kessels, H. W. H. G., Bush, D. E. A., Cain, C. K., LeDoux, J. E., & Malinow, R. (2007). A robust automated method to analyze rodent motion during fear conditioning. *Neuropharmacology*, 52(1), 228-233. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.07.028>
- Krstic, M. D., Rogatsky, I., Yamamoto, K. R., & Garabedian, M. J. (1997). Mitogen-activated and cyclin-dependent protein kinases selectively and differentially modulate transcriptional enhancement by the glucocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 17(7), 3947-3954. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.7.3947>
- Lambert, W. M., Xu, C. F., Neubert, T. A., Chao, M. V., Garabedian, M. J., & Jeanneteau, F. D. (2013). Brain-derived neurotrophic factor signaling rewrites the glucocorticoid transcriptome via glucocorticoid receptor phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 33(18), 3700-3714. <https://doi.org/10.1128/MCB.00150-13>
- Lamprecht, R. (2011). The roles of the actin cytoskeleton in fear memory formation. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 39-39. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00039>
- LeDoux, J. (2007). The amygdala. *Current Biology*, 17(20), R868-R874. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.005>
- Lee, I., & Kesner, R. P. (2004). Differential contributions of dorsal hippocampal subregions to memory acquisition and retrieval in contextual fear-conditioning. *Hippocampus*, 14(3), 301-310. <https://doi.org/10.1002/hipo.10177>

- Lee, K. J., Park, S.-B., & Lee, I. (2014). Elemental or contextual? It depends: Individual difference in the hippocampal dependence of associative learning for a simple sensory stimulus. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8(217). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00217>
- Levenson, J., Weeber, E., Selcher, J. C., Kategaya, L. S., Sweatt, J. D., & Eskin, A. (2002). Long-term potentiation and contextual fear conditioning increase neuronal glutamate uptake. *Nature Neuroscience*, 5(2), 155-161. <https://doi.org/10.1038/nn791>
- Lewis-Tuffin, L. J., & Cidlowski, J. A. (2006). The physiology of human glucocorticoid receptor β (hgr β) and glucocorticoid resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1069(1), 1-9. <https://doi.org/10.1196/annals.1351.001>
- Luyten, L., Schroyens, N., Hermans, D., & Beckers, T. (2014). Parameter optimization for automated behavior assessment: Plug-and-play or trial-and-error? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 28-28. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00028>
- Luyten, L., Vansteenwegen, D., van Kuyck, K., Deckers, D., & Nuttin, B. (2011). Optimization of a contextual conditioning protocol for rats using combined measurements of startle amplitude and freezing: The effects of shock intensity and different types of conditioning. *Journal of Neuroscience Methods*, 194(2), 305-311. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.11.005>
- Madalena, K. M., & Lerch, J. K. (2017). The effect of glucocorticoid and glucocorticoid receptor interactions on brain, spinal cord, and glial cell plasticity. *Neural Plasticity*, 2017, 8640970. <https://doi.org/10.1155/2017/8640970>
- Maren, S. (2001). Neurobiology of pavlovian fear conditioning. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 897-931. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.897>
- Maren, S. (2011). Seeking a spotless mind: Extinction, deconsolidation, and erasure of fear memory. *Neuron*, 70(5), 830-845. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.023>
- Maren, S., Aharonov, G., & Fanselow, M. S. (1997). Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and pavlovian fear conditioning in rats. *Behavioural Brain Research*, 88(2), 261-274. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(97\)00088-0](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(97)00088-0)
- Maren, S., & Fanselow, M. S. (1997). Electrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal hippocampus, or entorhinal cortex produce anterograde deficits in contextual fear conditioning in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 67(2), 142-149. <https://doi.org/10.1006/nlme.1996.3752>
- Maren, S., & Holt, W. G. (2004). Hippocampus and pavlovian fear conditioning in rats: Muscimol infusions into the ventral, but not dorsal, hippocampus impair the acquisition of conditional freezing to an auditory conditional stimulus. *Behavioral Neuroscience*, 118(1), 97-110. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.1.97>
- McGaugh, J. L. (2000). Memory—a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248-251. <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248>
- Medina, J. F., Repa, J. C., Mauk, M. D., & LeDoux, J. E. (2002). Parallels between cerebellum- and amygdala-dependent conditioning. *Nature Reviews. Neuroscience*, 3(2), 122-131. <https://doi.org/10.1038/nrn728>
- Mei, B., Li, C., Dong, S., Jiang, C. H., Wang, H., & Hu, Y. (2005). Distinct gene expression profiles in hippocampus and amygdala after fear conditioning. *Brain Research Bulletin*, 67(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.03.023>
- Milton, A. L. (2019). Fear not: Recent advances in understanding the neural basis of fear memories and implications for treatment development. *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-1948. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20053.1>

- Mitsushima, D., Ishihara, K., Sano, A., Kessels, H., & Takahashi, T. (2011). Contextual learning requires synaptic AMPA receptor delivery in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*, 12503-12508. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104558108>
- Mizuno, K., Jeffries, A. R., Abel, T., & Giese, K. P. (2020). Long-lasting transcription in hippocampal area CA1 after contextual fear conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory*, *172*, 107250. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107250>
- More, J., Casas, M. M., Sánchez, G., Hidalgo, C., & Haeger, P. (2018). Contextual fear memory formation and destabilization induce hippocampal RyR2 calcium channel upregulation. *Neural Plasticity*, *2018*, 5056181-5056181. <https://doi.org/10.1155/2018/5056181>
- Morsink, M. C., Steenbergen, P. J., Vos, J. B., Karst, H., Joëls, M., De Kloet, E. R., & Datson, N. A. (2006). Acute activation of hippocampal glucocorticoid receptors results in different waves of gene expression throughout time. *Journal of Neuroendocrinology*, *18*(4), 239-252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2006.01413.x>
- Moustafa, A. A., Gilbertson, M. W., Orr, S. P., Herzallah, M. M., Servatius, R. J., & Myers, C. E. (2013). A model of amygdala-hippocampal-prefrontal interaction in fear conditioning and extinction in animals. *Brain and Cognition*, *81*(1), 29-43. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2012.10.005>
- National Research Council. (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals* (8th ed.). Washington, DC: National Academy of Sciences.
- Necela, B. M., & Cidlowski, J. A. (2003). Crystallization of the human glucocorticoid receptor ligand binding domain: A step towards selective glucocorticoids. *Trends in Pharmacological Sciences*, *24*(2), 58-61. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)00046-9](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)00046-9)
- Niibori, Y., Yu, T.-S., Epp, J. R., Akers, K. G., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2012). Suppression of adult neurogenesis impairs population coding of similar contexts in hippocampal CA3 region. *Nature Communications*, *3*(1), 1253. <https://doi.org/10.1038/ncomms2261>
- Nomura, H., Nonaka, A., & Matsuki, N. (2012). Population activity in the dorsal hippocampal CA1 encoding the surrounding environment is absent during contextual fear memory expression. *Neuroscience*, *220*, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.06.043>
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. (2001). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. (pp. 65). México: SENASICA.
- O'Keefe, J., & Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Clarendon Press.
- Oitzl, M. S., & de Kloet, E. R. (1992). Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behavioral Neuroscience*, *106*(1), 62-71. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.106.1.62>
- Oitzl, M. S., Reichardt, H. M., Joëls, M., & de Kloet, E. R. (2001). Point mutation in the mouse glucocorticoid receptor preventing DNA binding impairs spatial memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(22), 12790-12795. <https://doi.org/10.1073/pnas.231313998>
- Oliveira, A., Martinho, R., Serrão, P., & Moreira-Rodrigues, M. (2018). Epinephrine released during traumatic events may strengthen contextual fear memory through increased hippocampus mRNA expression of Nr4a transcription factors. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*, 334. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00334>

- Orsini, C. A., & Maren, S. (2012). Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(7), 1773-1802. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.12.014>
- Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 106(2), 274-285. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.106.2.274>
- Phuc Le, P., Friedman, J. R., Schug, J., Brestelli, J. E., Parker, J. B., Bochkis, I. M., & Kaestner, K. H. (2005). Glucocorticoid receptor-dependent gene regulatory networks. *PLOS Genetics*, 1(2), e16. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010016>
- Pitman, D. L., Ottenweller, J. E., & Natelson, B. H. (1988). Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: Chronic stress and habituation. *Physiology & Behavior*, 43(1), 47-55. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(88\)90097-2](https://doi.org/10.1016/0031-9384(88)90097-2)
- Pollak, D. D., Monje, F. J., & Lubec, G. (2010). The learned safety paradigm as a mouse model for neuropsychiatric research. *Nature Protocols*, 5(5), 954-962. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.64>
- Prager, E. M., & Johnson, L. R. (2009). Stress at the synapse: Signal transduction mechanisms of adrenal steroids at neuronal membranes. *Science Signaling*, 2(86), re5-re5. <https://doi.org/10.1126/scisignal.286re5>
- Pugh, C. R., Fleshner, M., & Rudy, J. W. (1997). Type II glucocorticoid receptor antagonists impair contextual but not auditory-cue fear conditioning in juvenile rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 67(1), 75-79. <https://doi.org/10.1006/nlme.1996.3741>
- Reis, F. M. C. V., Almada, R. C., Fogaça, M. V., & Brandão, M. L. (2015). Rapid activation of glucocorticoid receptors in the prefrontal cortex mediates the expression of contextual conditioned fear in rats. *Cerebral Cortex*, 26(6), 2639-2649. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv103>
- Ressler, K. J., Paschall, G., Zhou, X.-I., & Davis, M. (2002). Regulation of synaptic plasticity genes during consolidation of fear conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 22(18), 7892-7902. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-18-07892.2002>
- Revest, J.-M., Di Blasi, F., Kitchener, P., Rougé-Pont, F., Desmedt, A., Turiault, M., Tronche, F., & Piazza, P. V. (2005). The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids. *Nature Neuroscience*, 8(5), 664-672. <https://doi.org/10.1038/nn1441>
- Rodgers, R. J., Haller, J., Holmes, A., Halasz, J., Walton, T. J., & Brain, P. F. (1999). Corticosterone response to the plus-maze: High correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiology & Behavior*, 68(1), 47-53. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(99\)00140-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(99)00140-7)
- Rodrigues, S. M., & Sapolsky, R. M. (2009). Disruption of fear memory through dual-hormone gene therapy. *Biological Psychiatry*, 65(5), 441-444. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.09.003>
- Rogatsky, I., Waase, C. L., & Garabedian, M. J. (1998). Phosphorylation and inhibition of rat glucocorticoid receptor transcriptional activation by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). Species-specific differences between human and rat glucocorticoid receptor signaling as revealed through GSK-3 phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 14315-14321. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.23.14315>
- Roosendaal, B. (2002). Stress and memory: Opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(3), 578-595. <https://doi.org/10.1006/nlme.2002.4080>

- Roozendaal, B., McEwen, B. S., & Chattarji, S. (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 423-433. <https://doi.org/10.1038/nrn2651>
- Roy, D. S., Kitamura, T., Okuyama, T., Ogawa, S. K., Sun, C., Obata, Y., Yoshiki, A., & Tonegawa, S. (2017). Distinct neural circuits for the formation and retrieval of episodic memories. *Cell*, 170(5), 1000-1012.e1019. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.013>
- Sacchetti, B., Lorenzini, C. A., Baldi, E., Bucherelli, C., Roberto, M., Tassoni, G., & Brunelli, M. (2001). Long-lasting hippocampal potentiation and contextual memory consolidation. *European Journal of Neuroscience*, 13(12), 2291-2298. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01609.x>
- Sah, P., Faber, E. S. L., De Armentia, M. L., & Power, J. (2003). The amygdaloid complex: Anatomy and physiology. *Physiological Reviews*, 83(3), 803-834. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2003>
- Sanders, M. J., Wiltgen, B. J., & Fanselow, M. S. (2003). The place of the hippocampus in fear conditioning. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 217-223. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01283-4](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01283-4)
- Sandi, C. (2003). Implicación de los glucocorticoides en la consolidación de la memoria. *Revista de Neurología*, 37(9), 843-848. <https://doi.org/10.33588/rn.3709.2003407>
- Sandi, C., Loscertales, M., & Guaza, C. (1997). Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *European Journal of Neuroscience*, 9(4), 637-642. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01412.x>
- Sapolsky, R. M., Krey, L. C., & McEwen, B. S. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging: The glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocrine Reviews*, 7(3), 284-301. <https://doi.org/10.1210/edrv-7-3-284>
- Sarabdjitsingh, R. A., Meijer, O. C., & de Kloet, E. R. (2010). Specificity of glucocorticoid receptor primary antibodies for analysis of receptor localization patterns in cultured cells and rat hippocampus. *Brain Research*, 1331, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.052>
- Sarabdjitsingh, R. A., Meijer, O. C., Schaaf, M. J. M., & de Kloet, E. R. (2009). Subregion-specific differences in translocation patterns of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in rat hippocampus. *Brain Research*, 1249, 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.10.048>
- Scheschowitsch, K., Leite, J. A., & Assreuy, J. (2017). New insights in glucocorticoid receptor signaling-more than just a ligand-binding receptor. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 16. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00016>
- Schoneveld, O. J. L. M., Gaemers, I. C., & Lamers, W. H. (2004). Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1680(2), 114-128. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2004.09.004>
- Schwabe, L., Bohringer, A., & Wolf, O. T. (2009). Stress disrupts context-dependent memory. *Learning & Memory*, 16(2), 110-113. <https://doi.org/10.1101/lm.1257509>
- Schwabe, L., Joëls, M., Roozendaal, B., Wolf, O. T., & Oitzl, M. S. (2012). Stress effects on memory: An update and integration. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36(7), 1740-1749. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.07.002>
- Singh, C., Bortolato, M., Bali, N., Godar, S. C., Scott, A. L., Chen, K., Thompson, R. F., & Shih, J. C. (2013). Cognitive abnormalities and hippocampal alterations in monoamine oxidase A and B knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(31), 12816-12821. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308037110>
- Soler-Cedeño, O., Torres-Rodríguez, O., Bernard, F., Maldonado, L., Hernández, A., & Porter, J. T. (2019). Plasticity of NMDA receptors at ventral hippocampal synapses in the

- infralimbic cortex regulates cued fear. *eNeuro*, ENEURO.0354-0318.2019. <https://doi.org/10.1523/eneuro.0354-18.2019>
- Suvrathan, A., Bennur, S., Ghosh, S., Tomar, A., Anilkumar, S., & Chattarji, S. (2013). Stress enhances fear by forming new synapses with greater capacity for long-term potentiation in the amygdala. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1633), 20130151-20130151. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0151>
- Trivedi, M. A., & Coover, G. D. (2004). Lesions of the ventral hippocampus, but not the dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and inhibitory avoidance on the elevated T-maze. *Neurobiology of Learning and Memory*, 81(3), 172-184. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.02.005>
- Ursin, H., & Eriksen, H. R. (2004). The cognitive activation theory of stress. *Psychoneuroendocrinology*, 29(5), 567-592. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(03\)00091-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(03)00091-X)
- Van Eekelen, J. A. M., Jiang, W., De Kloet, E. R., & Bohn, M. C. (1988). Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*, 21(1), 88-94. <https://doi.org/10.1002/jnr.490210113>
- van Eekelen, J. A. M., Kiss, J. Z., Westphal, H. M., & de Kloet, E. R. (1987). Immunocytochemical study on the intracellular localization of the type 2 glucocorticoid receptor in the rat brain. *Brain Research*, 436(1), 120-128. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91563-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91563-0)
- VanItallie, T. B. (2002). Stress: A risk factor for serious illness. *Metabolism*, 51(6 Suppl 1), 40-45. <https://doi.org/10.1053/meta.2002.33191>
- Viho, E. M. G., Buurstede, J. C., Mahfouz, A., Koorneef, L. L., van Weert, L. T. C. M., Houtman, R., Hunt, H. J., Kroon, J., & Meijer, O. C. (2019). Corticosteroid action in the brain: The potential of selective receptor modulation. *Neuroendocrinology*, 109(3), 266-276. <https://doi.org/10.1159/000499659>
- Wang, Z., Frederick, J., & Garabedian, M. J. (2002). Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 26573-26580. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110530200>
- Weil-Malherbe, H., Axelrod, J., & Tomchick, R. (1959). Blood-brain barrier for adrenaline. *Science*, 129(3357), 1226-1227. <https://doi.org/10.1126/science.129.3357.1226>
- Wiltgen, B. J., Sanders, M. J., Anagnostaras, S. G., Sage, J. R., & Fanselow, M. S. (2006). Context fear learning in the absence of the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 26(20), 5484-5491. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2685-05.2006>
- Woodson, J. C., Macintosh, D., Fleshner, M., & Diamond, D. M. (2003). Emotion-induced amnesia in rats: Working memory-specific impairment, corticosterone-memory correlation, and fear versus arousal effects on memory. *Learning & Memory*, 10(5), 326-336. <https://doi.org/10.1101/lm.62903>
- Xing, X., Wang, H., Liang, J., Bai, Y., Liu, Z., & Zheng, X. (2014). Mineralocorticoid receptors in the ventral hippocampus are involved in extinction memory in rats. *PsyCh Journal*, 3(3), 201-213. <https://doi.org/10.1002/pchj.58>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Zhou, M., Kindt, M., Joëls, M., & Krugers, H. J. (2011). Blocking mineralocorticoid receptors prior to retrieval reduces contextual fear memory in mice. *PloS One*, 6(10), e26220-e26220. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026220>

Zovkic, I. B., & Sweatt, J. D. (2013). Epigenetic mechanisms in learned fear: Implications for PTSD. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 77-93. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.79>

12. Apéndice A

Composición de sustancias utilizadas para la cuantificación de corticosterona en suero por el método de ELISA:

- Anticuerpo anti CORT: Solución amarilla de anticuerpo policlonal de oveja anti CORT
- Solución conjugado: Solución azul de fosfatasa alcalina conjugada con CORT
- Solución de paro: Solución de trifosfato de sodio en agua
- Solución estándar: Solución de 200,000 pg/mL de CORT
- Solución sustrato: Solución de p-nitrofenil fosfato en buffer

13. Apéndice B

Productos académicos obtenidos de los estudios de doctorado

- Participación en congresos
 - Septiembre 2013: Congreso “LVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas” con el poster “Diferentes Intensidades de choque eléctrico y la liberación de corticosterona en plasma de ratas entrenadas en la tarea de condicionamiento de miedo al contexto”.
 - Noviembre 2014: Congreso “44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience” con el poster “The corticosterone release and the number of activated glucocorticoid receptor in the amygdala are related with stress levels”
 - Julio 2015: Congreso “9th World Congress of the International Brain Research Organization (IBRO),” con el poster “Glucocorticoid receptor activation in the amygdala and corticosterone release are related to stress levels during contextual fear conditioning”
 - Noviembre 2016: Congreso “46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience” con el poster “Glucocorticoid receptor phosphorylation in the amygdala and hippocampus after acquisition of contextual fear conditioning”
 - Mayo 2018: Congreso “12th Annual Canadian Neuroscience Meeting” con el poster “Glucocorticoid receptor phosphorylation along the dorsoventral axis of the hippocampus after an aversive learning
 - Agosto 2018: Congreso “LXI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas” con la presentación oral “Fosforilación del receptor a glucocorticoides en el hipocampo ventral y dorsal en un aprendizaje aversivo”.

- Estancia de investigación
Septiembre-diciembre 2017: Laboratorio “Regenerative and Vascular Medicine” del departamento de Endocrinología, en el Centro Médico de la Universidad de Leiden, Holanda.

- Publicaciones
 1. Ponce-Lina, R., Serafín, N., Carranza, M., Arámburo, C., Prado-Alcalá, R. A., Luna, M., & Quirarte, G. L. (2020). Differential Phosphorylation of the Glucocorticoid Receptor in Hippocampal Subregions Induced by Contextual Fear Conditioning Training. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14, 12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00012> (Apéndice C)
 2. (en preparación) Ponce-Lina, R., Serafín, N., Prado-Alcalá, R., Meijer, O., Quirarte, G, 2021. Expression of glucocorticoid receptor-regulated genes in the hippocampus and the amygdala during fear memory acquisition. *Short Communication*



Differential Phosphorylation of the Glucocorticoid Receptor in Hippocampal Subregions Induced by Contextual Fear Conditioning Training

Renata Ponce-Lina¹, Norma Serafin¹, Martha Carranza², Carlos Arámburo², Roberto A. Prado-Alcalá¹, Maricela Luna^{2*} and Gina L. Quirarte^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Antonella Gasbani,
University of L'Aquila, Italy

Reviewed by:

Marco Wood,
University of California, Irvine,
United States
Harman J. Krugers,
University of Amsterdam,
Netherlands

*Correspondence:

Maricela Luna
lunam@unam.mx
Gina L. Quirarte
ginaqui@unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Learning and Memory, a section of
the journal *Frontiers in Behavioral
Neuroscience*

Received: 01 November 2019

Accepted: 20 January 2020

Published: 13 February 2020

Citation:

Ponce-Lina R, Serafin N, Carranza M,
Arámburo C, Prado-Alcalá RA,
Luna M and Quirarte GL
(2020) Differential Phosphorylation of
the Glucocorticoid Receptor in
Hippocampal Subregions Induced by
Contextual Fear
Conditioning Training.
Front. Behav. Neurosci. 14:12.
doi: 10.3389/fnbeh.2020.00012

¹Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México, ²Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México

Aversive events induce the release of glucocorticoid stress hormones that facilitate long-term memory consolidation, an effect that depends on the activation of glucocorticoid receptors (GRs). GRs are distributed widely in the hippocampus. The dorsal region of the hippocampus has been related to cognitive functions and the ventral region to stress and emotion. GR acts as a transcription factor which after hormone binding becomes phosphorylated, affecting its cellular distribution and transcriptional activity. Two functionally well-described GR phosphorylation sites are serine 232 (pSer232), which enhances gene expression, and serine 246 (pSer246), having the opposite effect. Since gene expression is one of the plastic mechanisms needed for memory consolidation, we investigated if an aversive learning task would induce GR phosphorylation in the dorsal (DH) and the ventral (VH) hippocampus. We trained rats in contextual fear conditioning (CFC) using different foot-shock intensities (0.0, 0.5, or 1.5 mA). One subgroup of animals trained with each intensity was sacrificed 15 min after training and blood was collected to quantify corticosterone (CORT) levels in serum. Another subgroup was sacrificed 1 h after training and brains were collected to evaluate the immunoreactivity (IR) to GR, pSer232 and pSer246 by SDS-PAGE/Western blot in DH and VH, and by immunohistochemistry in dorsal and ventral CA1, CA2, CA3, and dentate gyrus (DG) hippocampal regions. The conditioned freezing response increased in animals trained with 0.5 and 1.5 mA during training and extinction sessions. The degree of retention and CORT levels were directly related to the intensity of the foot-shock. Although total GR-IR remained unaffected after conditioning, we observed a significant increase of pSer246-IR in the dorsal region of CA1 and in both dorsal and ventral DG. The only region in which pSer232-IR was significantly elevated was ventral CA3. Our results indicate that fear conditioning training is related to GR phosphorylation in specific

subregions of the hippocampus, suggesting that its transcriptional activity for gene expression is favored in ventral CA3, whereas its repressor activity for gene-silencing is increased in dorsal CA1 and in both dorsal and ventral DG.

Keywords: memory, glucocorticoids, corticosterone, serine 232, serine 246

INTRODUCTION

Organisms associate aversive stimuli with different cues present in the environment as part of adaptation mechanisms (Korte, 2001; Steimer, 2002). The molecular processes involved in this type of learning and subsequent memory formation are commonly studied with the use of different learning tasks such as contextual fear conditioning (CFC), in which a neutral stimulus (conditioned stimulus, CS), in this case a particular context, is associated with an aversive stimulus (unconditioned stimulus, US), usually a foot-shock (Jacobs et al., 2010).

It is known that the hippocampus is involved in the neural circuit of CFC. Several reports have established a functional differentiation along the dorsoventral axis of the rat hippocampus during fear conditioning, in such a way that the dorsal region is involved in the association of the contextual CS with the US (Phillips and LeDoux, 1992; Maren, 2001), whereas the ventral region is selective for the association of discrete cues with the US, and it has direct connections with the amygdala, which is also related to stress and anxiety (Maren and Holt, 2004; Trivedi and Coover, 2004; Yoon and Otto, 2007; Jacobs et al., 2010).

An increase of blood corticosterone (CORT) hormone levels is seen after CFC as a component of the stress response triggered by the aversive US. This increase, which is dependent on the foot-shock intensity (Cordero et al., 1998), leads to CORT binding to mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid (GR) receptors. Although both receptors are involved in processing of fear memories (Cordero and Sandi, 1998; Donley et al., 2005; Brinks et al., 2009; Zhou et al., 2011), MRs are supposed to be saturated at this point due to their higher affinity to the hormone than that of GRs (Sandi, 2003); since we are interested in the study of the effects of CORT levels on memory after a stressful experience, the present study focuses on the activation of GRs.

Blocking the activation of GRs (by administration of antagonists or by genetic mutation of the GR) in several brain areas, including the amygdala, the hippocampus, and the prefrontal cortex impairs memory consolidation of CFC (Pugh et al., 1997; Donley et al., 2005; Revest et al., 2005; Rodrigues and Sapolsky, 2009), and of other learning tasks with an aversive component, such as water maze and inhibitory avoidance (Roozendaal and McGaugh, 1997). It is known that the dorsal hippocampus (DH) is involved in spatial information processing, and that the administration of a GR antagonist before or immediately after training into the ventral hippocampus (VH) impairs contextual fear memory consolidation (Donley et al., 2005). Considering that GR distribution is heterogeneous throughout CA1, CA2, CA3 and the dentate gyrus (DG) regions (Sarabdjitsingh et al., 2010), it might be possible that the

requirement of GR activation for memory consolidation is not only different in DH from VH, but also among the different hippocampal subregions.

The GR is a transcription factor that, upon hormone binding, can be phosphorylated at several serine residues which are highly conserved in humans and rodents (Blind and Garabedian, 2008; Kadmiel and Cidlowski, 2013). In rats, a higher amount of phosphorylated serine 232 (pSer232) induces activation and nuclear translocation of the receptor and increases its transcriptional activity. By contrast, the phosphorylation of the serine 246 (pSer246) induces the opposite effect by promoting nuclear exportation of the GR or by its binding to co-repressors inside the nucleus, thus repressing transcription (Rogatsky et al., 1998; Wang et al., 2002; Adzic et al., 2009).

Because gene expression is involved in memory plasticity (Martin et al., 2000; Lamprecht and LeDoux, 2004; Sutton and Schuman, 2006), it is likely that the phosphorylation status of GR is altered during the acquisition process of CFC, affecting, in turn, its transcriptional activity. In this study we used semi-quantitative techniques to evaluate the amount of total GR protein, as well as the relative proportion of pSer232, and pSer246 variants in different subregions of the DH and VH of rats trained in CFC. Infusions of sodium channel blockers (Quiroz et al., 2003) and of transcription and translation inhibitors (Medina et al., 2019) into DH produce a strong amnesic effect when moderate foot-shock intensities are used for training of inhibitory avoidance, while no such effect is observed when a relatively strong foot-shock is used, suggesting that the involvement of the hippocampus in aversive memory is dependent upon the intensity of the learning experience. In order to know if GR phosphorylation depends upon the strength of training, we also evaluated the phosphorylated status of the GR in rats trained with low and high foot-shock intensity. This information will help us understand the molecular processes whereby glucocorticoids (GCs) exert their effects on fear memory consolidation.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Male adult Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), obtained from the breeding colony of the Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, were carried to the vivarium of our laboratory and placed in individual acrylic home-cages (24 × 21 × 45 cm), with *ad libitum* water and food, with a light/dark cycle of 12/12 h (lights on at 7:00 am) and constant temperature of 23 ± 1°C in the room. These experimentally naïve animals were maintained

undisturbed for 3 days to allow them to adapt to the new housing conditions. Animals weighed between 250 and 350 g at the beginning of the experiments. All animals were treated in accordance with the (NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, 2001), following the specifications for the production, care and use of animals in the laboratory, as well as the recommendations of the Guide for Care and Use of Laboratory Animals of the National Research Council (National Research Council, 2011). The protocols for these experiments were approved by the Ethics Committee of the Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Habituation, Contextual Fear Conditioning, and Extinction

Apparatus

The CFC chamber (H10-11R-TC, Coulbourn Instruments, Whitehall, PA, USA, 30.48 × 25.4 × 30.48 cm) has transparent acrylic back and front walls, and steel side panels. The grid floor has electrifiable stainless steel-bars (0.5 cm in diameter, separated by 1.0 cm) connected to a shock generator (H13-15, Coulbourn). A digital camera (SenTech, Carrollton, TX, USA) was located on the ceiling of the chamber, and a red light and a white light were located on the opposite sidewalls. Both the shock generator and the lights were connected to a USB interface (ACT-710, Actimetrics, Wilmette, IL, USA), which, along with the camera, were controlled by the FreezeFrame (Actimetrics) software installed in a computer running Microsoft Windows XP. To avoid auditory disturbances, a speaker emitting white noise (60 dB) was present during all behavioral procedures. The chamber was located inside a sound-attenuating cubicle (Med Associates Inc., USA) located in a sound-attenuated room.

Behavioral Procedures

All the behavioral procedures were performed between 0800 h and 1400 h to avoid the peak of glucocorticoid release in the experimental subjects. One hour before each session, rats were placed in a rack near the room in which conditioning took place, and at the end of the sessions they were returned to the rack and remained there for 1 h, and then were carried back to the vivarium. Each animal was handled for 5 min during three consecutive days. On the next day, on the habituation session, each rat was allowed to explore the chamber for 20 min, with all the apparatuses turned on. Twenty-four hours after habituation, during the training session, the rats could explore the chamber for 3 min (pre-shock), and immediately after the third minute, one foot-shock (1 s) per minute was delivered eight times.

Rats were randomly assigned to one of three independent groups that received 0.0 ($n = 29$), 0.5 ($n = 31$), or 1.5 ($n = 31$) mA foot-shocks. One minute after the last foot-shock, animals were returned to their home cages. To evaluate if memory strength was related to the foot-shock intensity, one subgroup of animals that had been trained with each foot-shock intensity ($n = 11$ per subgroup) was returned to the same chamber 48 h post-training and remained there for 11 min without foot-shock (extinction). The remaining animals were sacrificed after training

for biochemical procedures, as described below. The interior of the chamber was cleaned with 10% ethanol after each subject had occupied it.

All sessions were recorded and analyzed for freezing behavior, defined as the absence of movements except for those required for breathing (Maren and Fanselow, 1997), using the FreezeFrame software (Actimetrics). The bout length (change in pixels/frame) was set to 0.75 s and the threshold for freezing behavior was determined individually for each rat. During training, the freezing response was measured 10 s after each foot-shock to avoid the hyperactivity that is produced immediately after the administration of the foot-shocks.

Biochemical Procedures

As stated above, each of the 0.0 mA, 0.5 mA, and 1.5 mA trained groups was divided into four subgroups that were tested for extinction ($n = 11$ per group), or for CORT measurement ($n = 8$ per group), Western blotting ($n = 4, 5,$ and 5 per group, respectively), or for immunohistochemistry ($n = 6, 7,$ and 7 per group, respectively); these rats were sacrificed by decapitation, and their brains were collected. Three additional control groups of non-stressed animals that were handled but not shocked (Handled groups) were also used for CORT measurement ($n = 7$), Western blotting ($n = 5$), and immunohistochemistry ($n = 7$); these Handled groups were sacrificed 2 days after the last session of handling, on the same day and time that the trained rats were sacrificed.

Corticosterone Measurement

For CORT measurement the trained rats were sacrificed 15 min after training and trunk blood was collected. Blood samples were centrifuged at 2,000 rpm for 30 min at 4°C and were collected and stored at -80°C until they were analyzed. Serum CORT levels were measured using a commercial kit (Corticosterone ELISA kit, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA). The provided steroid displacement reagent was used to dilute the serum samples, such that 2.5 parts of steroid displacement reagent were present for every 97.5 parts of the undiluted sample. The remainder of the protocol was conducted in accordance with the manufacturer's instructions. Absorbance at 405 nm was read using a microplate reader (iMark, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Semi-quantification of Total GR and Phosphorylated GR Variants

Western Blotting

For Western blotting the trained rats were sacrificed 1 h after training and their brains were immediately frozen in cold isopentane and stored at -80°C. DH and VH were punched out from both hemispheres with fine-tip scissors at -21°C in a cryostat (Leica), and the samples were individually stored in separate tubes. Each sample was homogenized with a sonicator (Cole Palmer) in 60 μ l RIPA lysis buffer (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) containing a COMPLETE protease inhibitor cocktail (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) and shaken for 2 h at 4°C. Homogenates were centrifuged at 10,000 g for 15 min

at 4°C and supernatants were collected. Protein concentration was determined by Bradford assay (Bradford, 1976), and 50 µg of total protein of each sample was resolved by SDS-PAGE electrophoresis in 10% polyacrylamide gels under reducing conditions at 100 V (Laemmli, 1970), and then transferred for 1 h at 200 mA to membranes of nitrocellulose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were blocked in 5% nonfat dry milk (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in Tris-buffered saline (TBS) during 2 h, and then incubated overnight at room temperature with either a rabbit anti-GR phospho-S211 antibody (1:1,000; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA, Cat. #4161) that recognizes rat pSer232, or a rabbit anti-GR phospho-S226 antibody (1:800; Abcam Inc., Cambridge, MA, USA, Cat. #ab93104) that recognizes rat pSer246. Blots were incubated with a goat anti-rabbit secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:4,000; Invitrogen) for 2 h at room temperature. Immunoreactive bands were developed by chemiluminescence using ECL (Amersham Biosciences, Montreal) on hyper film (Amersham; Buckinghamshire, UK). For determination of total GR and loading control (α -tubulin), membranes were stripped in a buffer containing 62.5 mM TRIS-HCl, pH 6.7, SDS 2% and 100 mM β -mercaptoethanol, at 65°C for 30 min, washed several times with Tween-TBS (TTBS), reblocked for 2 h, and incubated overnight at room temperature with either an anti-GR-H300 antibody (1:2,000; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA, Cat. #sc-8992) or an anti- α -tubulin antibody (1:5,000; Abcam, Cat. #ab24246). Secondary antibody and chemiluminescence development protocols were similar to those described above. Immunoreactive protein bands were quantified by densitometric analysis using Image Lab (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) software.

Immunohistochemistry

For the immunohistochemical procedure the rats were sacrificed by decapitation 1 h after training, and their brains were collected. Brains were immediately frozen in cold isopentane and stored at -80°C. Brains were sectioned coronally at 20 µm thickness on a cryostat (Leica). Sections containing DH and VH were mounted on Superfrost slides (Thermo Fisher) and immediately fixed with 4% fresh paraformaldehyde for 10 min. Epitope exposure took place in citrate buffer (10 mM sodium citrate, Triton 0.05%, pH 6) at 80°C for 30 min. The sections were blocked in 5% nonfat dry milk for 2 h and serial sections were double-labeled for total GR and for either of the two phosphorylated GR variants, using a mouse anti-GR monoclonal antibody (1:1,500; Abcam, Cat. #ab2768) and either a rabbit anti-pSer211-GR antibody (1:200; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA, Cat. #4161) that recognizes rat pSer232, or a rabbit anti-pSer226-GR antibody (1:400; Abcam, Cat. #ab93104) that recognizes rat pSer246, incubated overnight at 4°C in a humid chamber. To reduce background noise, slides were incubated with 1% Sudan Black (Sigma) for 30 min. Secondary antibodies employed were as follows: rabbit anti-mouse conjugated with FITC (1:200; Invitrogen, Cat. #31561) and goat anti-rabbit conjugated with Cy3 (1:5,000; Invitrogen, Cat. #A10520).

Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 500 ng/mL; Invitrogen). Slides were covered with mounting medium VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Images were acquired with a confocal microscope LSM 510 (Carl Zeiss) at 50× magnification in one focal plane, with lasers at excitation wavelengths of 488 nm (for FITC), 561 nm (for Cy3), and a Coherent-XR multiphotonic laser at 350 nm (for DAPI). Three frames were acquired for CA1, CA2, CA3, and the DG for both DH and VH, using the same microscope parameters. The data were analyzed with ImageJ (NIH, USA) software.

Statistical Analyses

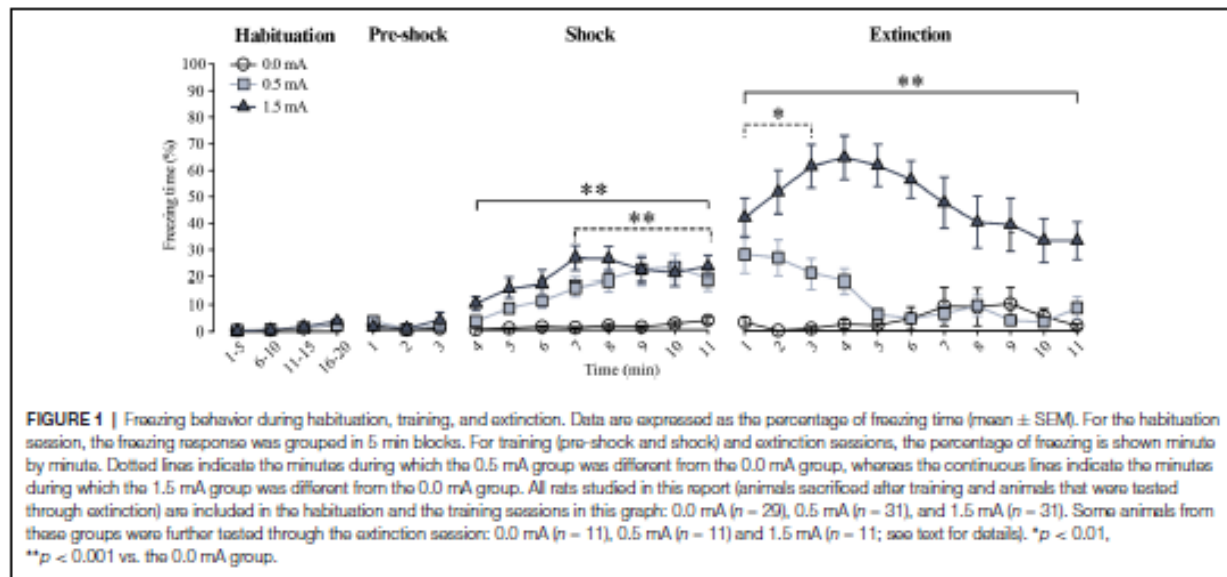
Behavioral data were presented as the minute by minute percentage of freezing (mean \pm SEM) in each session and was analyzed with a two-way ANOVA, with time as Factor A and foot-shock intensity as Factor B. CORT serum levels and optical densities (Western blot densitometry) were analyzed with a one-way ANOVA. Percentage of immunoreactive cells was analyzed with a two-way ANOVA, with the hippocampal area as Factor A and the foot-shock intensity as Factor B. When appropriate, the Fisher LSD was used as a *post hoc* test for pairwise comparisons. A *P*-value of less than 0.05 was considered statistically significant. The data were analyzed with SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA, USA).

RESULTS

Contextual Fear Conditioning

The percentage of freezing time in rats exposed to CFC is shown in Figure 1. No freezing behavior was seen during the habituation session in any of the groups ($F_{(2,1760)} = 2.895$, $p = 0.056$); on the second session, lack of freezing was also observed during the first 3 min where the animals were re-exposed to the context before foot-shock administration ($F_{(2,264)} = 1.237$, $p = 0.292$), indicating that the context inside the chamber was not stressful. When the foot-shocks were administered significant foot-shock ($F_{(2,704)} = 86.076$, $p < 0.001$) and time ($F_{(7,704)} = 6.242$, $p < 0.001$) effects became evident, as well as a significant foot-shock \times time interaction ($F_{(14,704)} = 1.907$, $p < 0.05$). The Fisher LSD showed that, when compared to the 0.0 mA group, the freezing response of the 1.5 mA group was evident right after the first foot-shock ($p < 0.001$ vs. 0.0 mA), whereas the 0.5 mA group started freezing significantly after the seventh foot-shock ($p < 0.001$ vs. 0.0 mA). The 1.5 and 0.5 mA groups differed from each other on minutes 6 and 7 ($p < 0.001$), where the animals trained with the 1.5 mA intensity showed a higher freezing response.

To find out whether the higher foot-shock intensity produced a stronger memory of the task, we investigated resistance to extinction of freezing on the third 11-min session, run 48 h after training, as resistance to extinction is an objective measure of the strength of learning. During this session there were significant time ($F_{(10,330)} = 2.043$, $p < 0.05$) and foot-shock ($F_{(2,330)} = 169.441$, $p < 0.001$) effects, as well as a significant time \times foot-shock interaction ($F_{(20,330)} = 2.262$, $p < 0.01$). The Fisher LSD showed that the 1.5 mA group had a higher



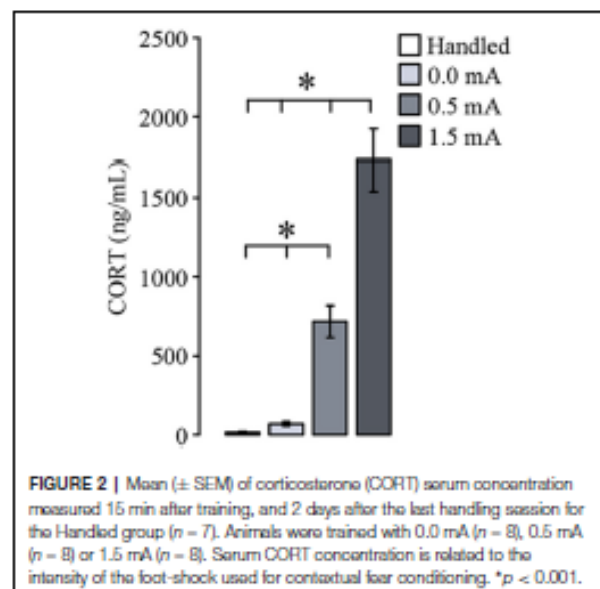
freezing response than the 0.0 mA and the 0.5 mA groups at the first ($p < 0.001$) and second ($p < 0.001$) minutes, respectively; these differences remained throughout the rest of the session; the 0.5 mA group only differed from the 0.0 mA group during the first 3 min of this session ($p < 0.01$). These results showed that animals trained with 0.5 and 1.5 mA learned the task, and that memory retention of the CFC was stronger and lasted longer in the group trained with the higher foot-shock intensity.

Corticosterone Quantification

To verify that CORT levels in serum are increased after CFC (Cordero et al., 1998), we quantified the concentration of this hormone 15 min after training. The ANOVA showed a significant difference among the groups ($F_{(3,27)} = 50.819$, $p \leq 0.001$). As depicted in Figure 2, both the groups trained with 0.0 mA and the Handled group showed very low serum CORT concentrations, indicating that the context inside the chamber was not a stressor. As we had expected, the groups trained with 0.5 and 1.5 mA showed a higher amount of CORT than the Handled ($p < 0.001$ for each comparison) and the 0.0 mA ($p < 0.001$ for each comparison) groups, and we also found that CORT levels in serum were positively related to the intensity of the foot-shock, because there was a statistical difference between the 0.5 and 1.5 mA groups ($p < 0.001$). These results show that the training session led to a significant increase of CORT in serum that was related to the intensity of training.

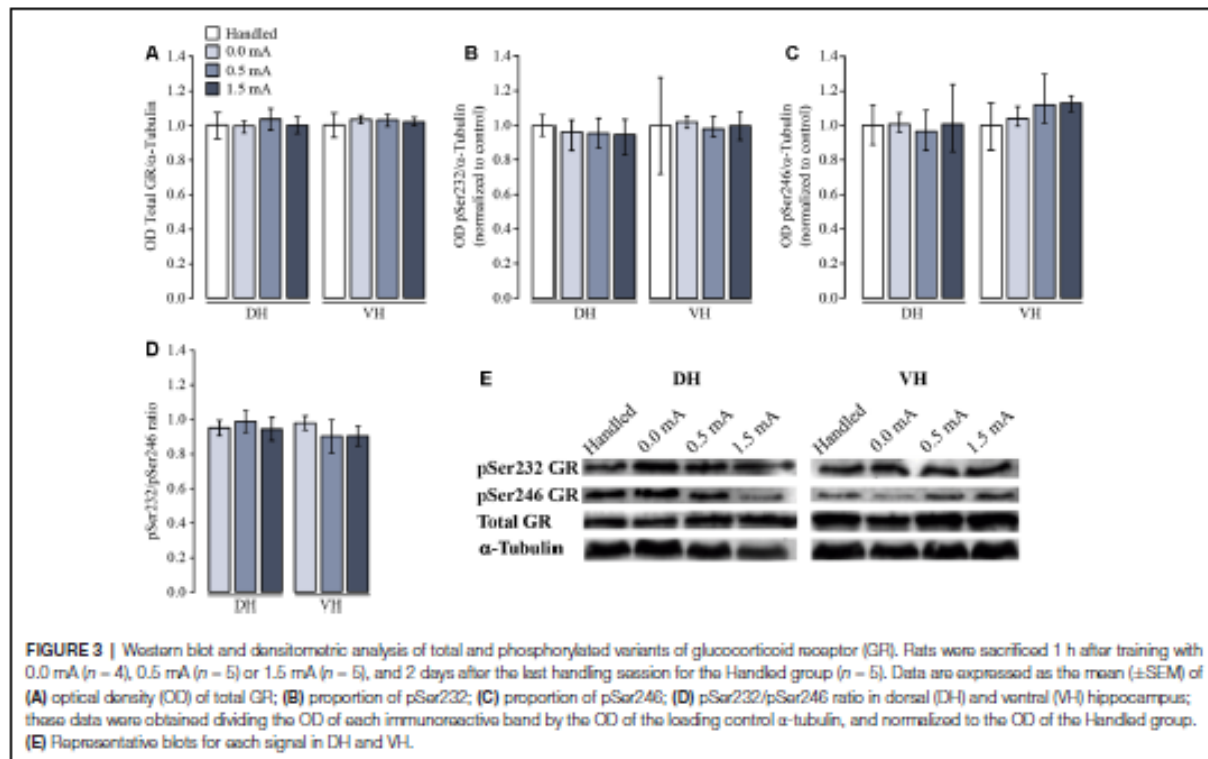
Proportion of Total and Phosphorylated Variants of GR in Hippocampal Regions

As a first approach to studying a possible effect of CFC training upon the total amount and the relative proportion and distribution of GR, pSer232, and pSer246, we performed a densitometric analysis by Western blotting of DH and VH



samples. Total GR immunoreactivity (IR) did not differ among groups in either DH ($F_{(3,20)} = 0.468$, $p = 0.708$) or VH ($F_{(3,20)} = 1.52$, $p = 0.240$; Figures 3A,E). The proportion of pSer232-IR was not altered in DH ($F_{(3,20)} = 0.357$, $p = 0.785$) nor in VH ($F_{(3,20)} = 0.481$, $p = 0.699$) after training (Figures 3B,E). Likewise, the proportion of pSer246-IR did not change after training in either DH ($F_{(3,12)} = 0.091$, $p = 0.963$) or VH ($F_{(3,8)} = 1.609$, $p = 0.262$; Figures 3C,E).

Some reports indicate that the resulting transcriptional activity of the GR depends on the proportion between the two phosphorylated variants. For this reason, we also calculated the ratio between pSer232-IR and pSer246-IR for all treatments and

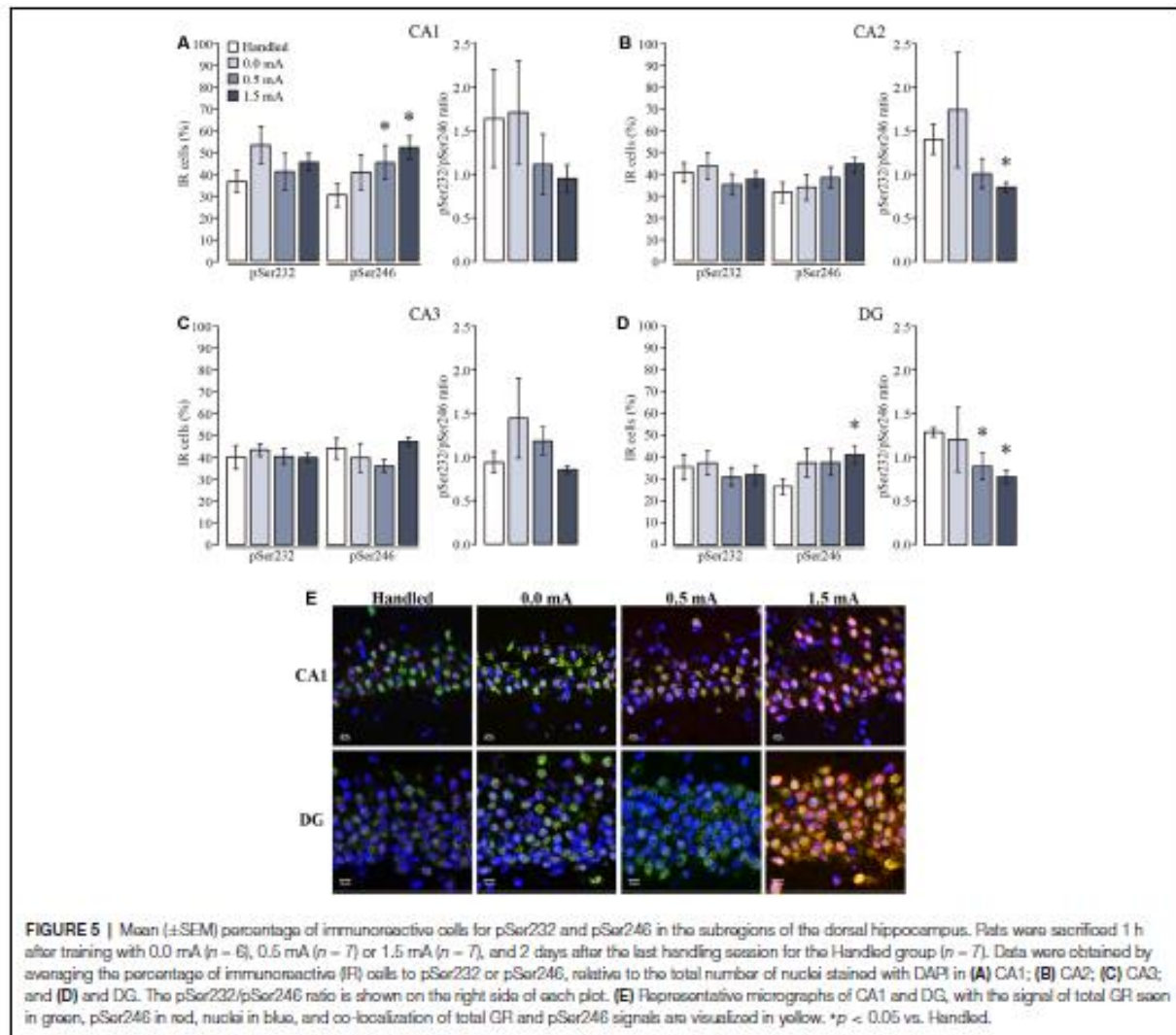
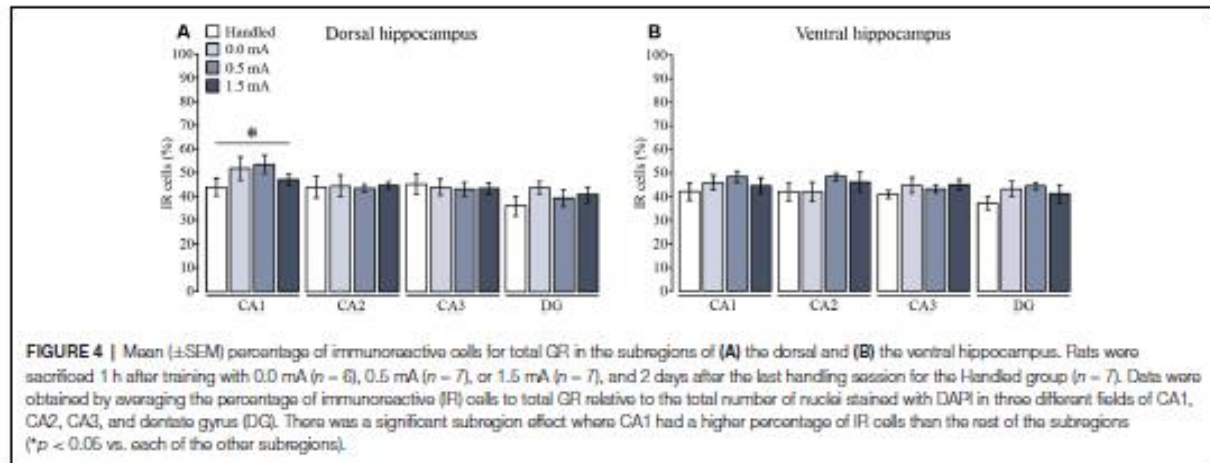


we did not find a significant effect in either the DH ($F_{(2,9)} = 0.166$, $p = 0.849$) or the VH ($F_{(2,6)} = 0.414$, $p = 0.679$; **Figure 3D**).

Cellular Distribution of Total and Phosphorylated Variants of GR in Dorsal and Ventral Hippocampal Subregions

In order to make a more localized analysis of the cellular distribution of Total GR, pSer232, and pSer246 IR throughout the DH and VH regions, we measured the specific distribution of total GR and phosphorylated GR variants in the different subregions of DH and VH, and a semi-quantitative analysis was made by counting the number of immunoreactive cells for each specific antibody in CA1, CA2, CA3, and DG. We found a significant subregion effect on the number of immunoreactive cells for total GR among the DH subregions ($F_{(3,96)} = 4.53$, $p = 0.005$). Fisher LSD showed that CA1 had more immunoreactive cells for total GR than CA2, CA3 and DG ($p < 0.05$ for each comparison; **Figure 4A**); but there was no significant effect of the foot-shock ($F_{(3,96)} = 0.748$, $p = 0.526$), nor a significant interaction between the percentage of immunoreactive cells and the treatments ($F_{(9,96)} = 0.558$, $p = 0.828$). Moreover, this approach confirmed that there was no change in total GR-IR in any of the VH subregions ($F_{(3,92)} = 1.34$, $p = 0.266$) and also the effect of the foot-shock intensity was not significant ($F_{(3,92)} = 2.470$, $p = 0.067$), so there was no interaction among ventral subregions and shock intensity ($F_{(9,92)} = 0.330$, $p = 0.963$; **Figure 4B**).

In the DH all groups showed that immunoreactive cells for pSer232 were not different among subregions ($F_{(3,92)} = 2.403$, $p = 0.073$), and were not affected by the treatments ($F_{(3,92)} = 1.042$, $p = 0.378$), and the interaction between those factors was not significant ($F_{(9,92)} = 0.333$, $p = 0.962$; **Figures 5A–D**). Likewise, the percentage of immunoreactive cells for pSer246 did not differ among subregions ($F_{(3,92)} = 1.428$, $p = 0.240$), but it was affected by treatments ($F_{(3,92)} = 4.429$, $p = 0.006$), although the interaction between both factors was not significant ($F_{(9,92)} = 0.767$, $p = 0.647$). Fisher LSD showed that 0.5 and 1.5 mA groups had more immunoreactive cells for pSer246 in CA1 as compared with the Handled group ($p < 0.05$; **Figure 5A**), while no differences were found in the percentage of immunoreactive cells for pSer246 in CA2 nor in CA3 among treatments (**Figures 5B,C**). Although the ratio between the IR of both phosphorylated GR variants also decreased in the group trained with 1.5 mA in CA2 ($p < 0.05$), we did not observe a significant increase of immunoreactive cells for pSer246 in this group; instead we observed a tendency to increase in comparison to the Handled group (**Figure 5B**). In DG there were more immunoreactive cells for pSer246 in the 1.5 mA group than in the Handled group ($p < 0.05$; **Figure 5D**). Interestingly, we found an effect of training on the ratio of pSer232 relative to pSer246 ($F_{(3,92)} = 3.488$, $p = 0.019$); multiple comparisons between groups showed that this ratio decreased after training with 0.5 and 1.5 mA as compared with the Handled group ($p < 0.05$ for each comparison). As shown in the micrograph (**Figure 5E**), it was an increase in the IR to pSer246 in CA1 and



in DG after training, as well as a greater colocalization with total GR-IR inside the cell nuclei.

In the VH, percentage of immunoreactive cells for pSer232 of each group did not change among subregions ($F_{(3,92)} = 0.523$, $p = 0.667$), but were affected due to the treatments ($F_{(3,92)} = 3.657$, $p = 0.015$), although the interaction between both factors was not significant ($F_{(9,92)} = 0.580$, $p = 0.810$; **Figures 6A–D**). *Post hoc* analysis showed no differences in immunoreactive cells for pSer232 in CA1 nor in CA2 among treatments (**Figures 6A,B**). This analysis also showed an increase in immunoreactive cells for pSer232 in CA3 in the 1.5 mA trained group when compared with the Handled and the 0.0 mA groups ($p < 0.05$ for each comparison; **Figure 6C**). Similarly, the cellular distribution of pSer246-IR of each group did not change among subregions ($F_{(3,92)} = 0.603$, $p = 0.615$), but it was affected by the treatment ($F_{(3,92)} = 3.842$, $p = 0.012$), although there was no significant interaction between both factors ($F_{(9,92)} = 0.336$, $p = 0.961$). Multiple comparisons among groups showed that the 0.5 and 1.5 mA groups had higher percentage of immunoreactive cells for pSer246 than the Handled group in the DG ($p < 0.05$ for each comparison; **Figure 6D**). The ratio between pSer232 and pSer246 IR of each group did not change among subregions ($F_{(3,91)} = 0.730$, $p = 0.537$, nor due to treatments ($F_{(3,91)} = 1.831$, $p = 0.147$). As shown in the micrograph (**Figure 6E**), there was an increase in the IR to pSer232 and pSer246 in CA3 and in DG after training, respectively, as well as a greater co-localization with total GR-IR inside the nuclei of cells.

DISCUSSION

The protocol used for CFC in this study demonstrated that the degree of retention of the task was directly related to the intensity of the foot-shock, as described elsewhere (Fanselow and Bolles, 1979; Cordero et al., 1998; Luyten et al., 2011), inducing freezing percentages very similar to those reported in the literature with the same shock intensities (Phillips and LeDoux, 1992; Kim et al., 1993; Levenson et al., 2002; Wiltgen et al., 2006; Suvrathan et al., 2014).

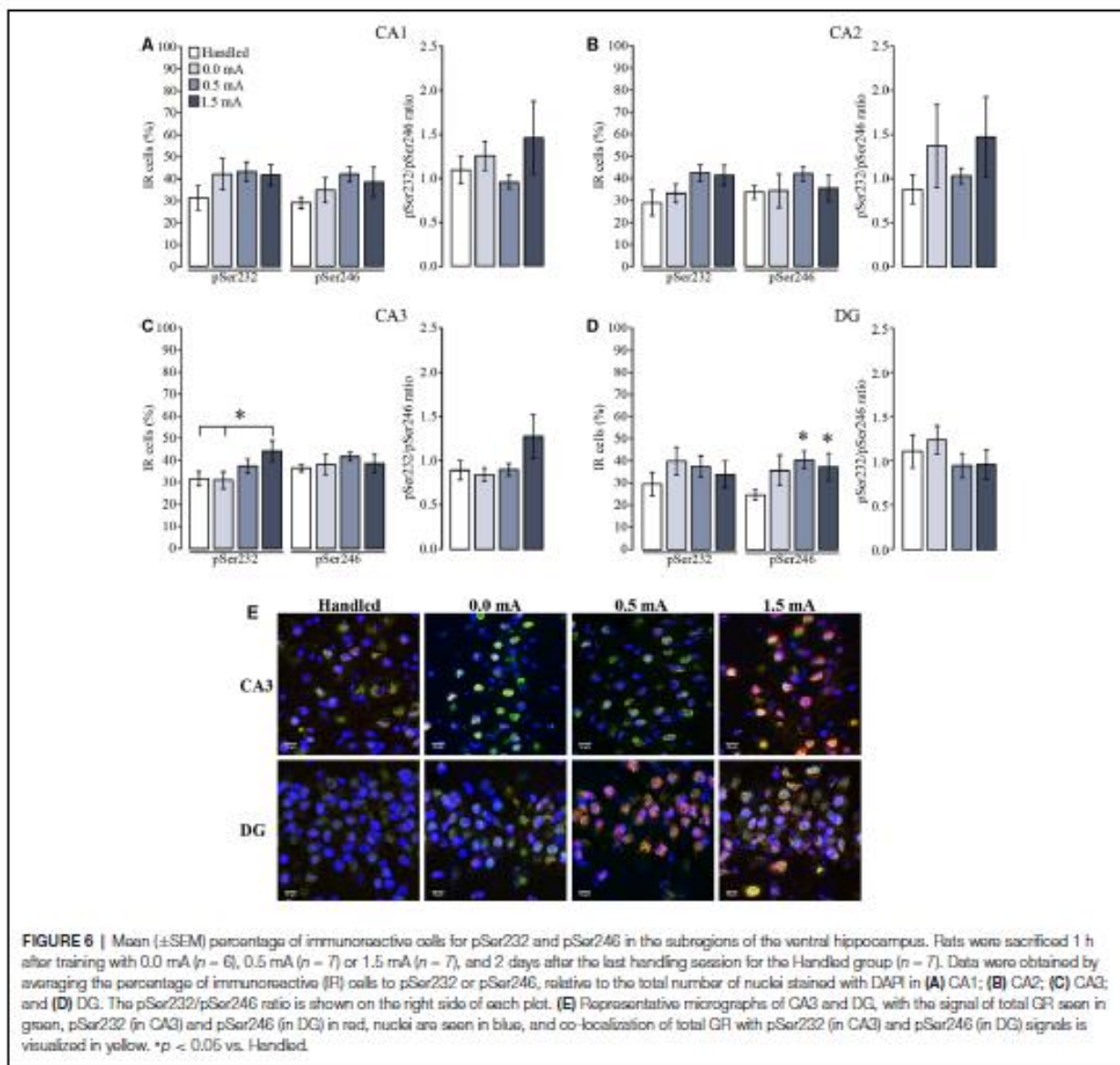
In addition to causing different levels of freezing during retention, the two shock intensities used for CFC training also stimulated CORT release into the bloodstream that was proportional to the intensity of the shock. This effect had been observed previously with this task (Cordero et al., 1998), as well as in other learning paradigms whose protocols used different intensities of aversive stimulation for training (Armario et al., 1986; Pitman et al., 1988; Sandi et al., 1997; Rodgers et al., 1999; Heiderstadt et al., 2000; Woodson et al., 2003; Drugan et al., 2005; González-Franco et al., 2017). The concentration of CORT observed after training with the two foot-shock intensities reached levels higher than those reported by Sarabdjitsingh et al. (2009), where intraperitoneal CORT injection of 3 mg/kg led to plasma CORT levels greater than 400 ng/mL, which was enough to induce GR translocation to the nucleus of CA1 cells of the DH, so it was highly likely that GR translocation occurred in the hippocampal cells of the rats trained in the present study. Furthermore, the concentration of free CORT after a stressful task (exposure to a novel environment or forced swimming) takes

approximately 20 min to reach its peak in the DH and 90 min in the VH (Droste et al., 2008; Dorey et al., 2012). In this work, we sacrificed animals 60 min after training and we also observed changes in the distribution of the phosphorylated GR variants IR in some of the DH and VH subregions.

Semi-quantification of total GR by Western blotting and by immunohistochemical techniques showed that levels of this protein were not affected 60 min after training in CFC in any of the hippocampal subregions. Several studies have also reported that the optical density (OD) of the total GR protein does not change, either *in vitro* after incubation of U2OS and HEK 293 cell lines with the GR agonist dexamethasone (Wang et al., 2002; Lambert et al., 2013), nor *in vivo* after training animals in fear conditioning (Xing et al., 2014). However, increasing this interval would be likely to induce a decrease in GR concentration in certain subregions of the hippocampus, since GR is a transcription factor that negatively self-regulates in certain brain areas after binding its hormone ligand (Sapolsky et al., 1986).

GR phosphorylation is a post-translational mechanism that affects the location of the receptor within the cell, and therefore regulates its function. Phosphorylation in Ser232 or Ser246 induces the GR to translocate into the nucleus, and regulates (promotes or inhibits) the expression of diverse functional groups of genes, depending on the position of the phosphorylated serine and the time elapsed after activation of the GR. The genes that are regulated by GR can be classified into several functional groups that are involved in cellular metabolism (NADH dehydrogenase subunits 1, 3 and 4, cytochrome b, and lactate dehydrogenase B), regulation of transcription and gene translation mechanisms (chaperone Hsp90, nerve growth factor-induced factor A, and cyclin L1), signal transduction (serotonin 1A receptor, adenosine A1 receptor, and oxytocin receptors), intra- and extracellular trafficking and transport of molecules (synaptosomal-associated protein 25, synaptotagmin I, and choline transporter), neurotransmitter catabolism (monoamine oxidase A), neuron growth (brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor and neurotrophin-3) among other functions (Morsink et al., 2006; Datson et al., 2008; Kadmiel and Cidlowski, 2013). Because phosphorylation is an important step for the transcriptional function of GR, we evaluated changes in pSer232 and pSer246 in the DH and VH.

We obtained contrasting results in the semi-quantification of immunoreactive cells to pSer232 and pSer246 after Western blotting and immunohistochemical analysis, partly because with the first technique we only differentiated between DH and VH, and not among CA1, CA2, CA3, and DG subregions, since they are very small and their extraction would likely lead to contamination of the sample with tissues of neighboring regions. A previous report showed changes in the proportion of both phosphorylated GR variants in nuclear and cytoplasmic fractions of the hippocampus of rats exposed to acute stress (immobility for 30 min; Adzic et al., 2009); however, in this report no differentiation was made between the DH and VH, nor between the CA1, CA2, CA3 or DG subregions. In our case, we investigated possible changes in the phosphorylated variants of GR as related to the functionality of the different hippocampal subregions (as discussed below), so we complemented the results



obtained with Western blotting with immunohistochemistry in brain slices, allowing us to quantify their presence and distribution by counting the number of the immunoreactive cells in each hippocampal region using specific antibodies to total GR, pSer232 and pSer246.

We observed that rats trained with the higher foot-shock intensity also showed more hippocampal subregions with increased GR phosphorylation. Several studies report that training with aversive stimuli of high intensities results in memory generalization (a fear response that is triggered by stimuli similar to the CS; Baldi et al., 2004; Dunsmoor et al., 2017; dos Santos Corrêa et al., 2019). In fact, dos Santos Corrêa et al. (2019) speculated that high CORT levels released after training

would over-activate the hippocampus to code non-specific contextual features, leading to fear generalization. Our results complement these results by showing that high CORT levels are related to increased GR phosphorylation in the hippocampus, which could lead to the generalization phenomenon.

We observed an increased percentage of immunoreactive cells to pSer246 in the dorsal and ventral regions of the DG and the dorsal region of CA1 after training. The effect of GR phosphorylation on this serine is gene-silencing (Wang et al., 2002; Schoneveld et al., 2004; Galliher-Beckley and Cidlowski, 2009; Hudson et al., 2013). Different molecular techniques to measure changes in gene expression have been shown that one of the first molecular events that occurs in the acquisition of CFC

is inhibition of gene expression in the hippocampus, including those genes that are regulated by the GR (angiotensinogen, mineralocorticoid receptor, some ribosomal proteins, lactate dehydrogenase B, and monoamine oxidase A among others), especially within the first 60 min after training or administration of CORT (Morsink et al., 2006; Federighi et al., 2013; Cho et al., 2015). However, these reports did not localize the effect of training on gene-silencing within the different hippocampal subregions. Our work suggests that this effect could be focused mainly on DG.

The DG is the site of entry of information to the hippocampus, especially its ventral region. Its function is to separate out information patterns and to differentiate them before signals are sent to CA3 and then to CA1. Lesions in the dorsal region of the DG impair the acquisition and retrieval of fear memory (Lee and Kesner, 2004), while neurotoxic lesions to the ventral region (specifically in the caudal area) and the subiculus diminish the acquisition of CFC (Maren and Holt, 2004). In addition, GR inactivation in the DH or VH with the CORT antagonist RU 38486 just before training impairs fear memory consolidation in the VH (including CA1, CA3, and DG), whereas in the DH it does not affect memory (Donley et al., 2005), suggesting that the effect of GCs on the hippocampus is specific to the activation of GRs in the VH during conditioning. Moreover, DG has been associated with emotional functions because it has direct connections from the amygdala (Blair and Fanselow, 2014). Our results suggest that training in CFC induces GR phosphorylation in Ser246 as a selective mechanism to induce the expression of certain genes to allow cells to transmit specific information (spatial and emotional) of the learning episode to other regions within the hippocampus.

On the other hand, dorsal CA1 is the main information exit site of the hippocampal formation to other areas of the brain, including the retrosplenial and the anterior cingulate cortices, which are mainly involved in the cognitive processing of spatial-visual information and in memory processing (Lee and Kesner, 2004; Fanselow and Dong, 2010). Neurotoxic lesions or optogenetic inhibition in dorsal CA1 block the acquisition and retrieval processes of CFC, indicating that its neurons also encode the context during space exploration (Lee and Kesner, 2004; Maren and Holt, 2004; Ji and Maren, 2008; Goshen et al., 2011; Nomura et al., 2012; Blair and Fanselow, 2014). With these antecedents, it can be proposed that the increase in pSer246 in CA1 could inhibit the expression of genes that are not necessary for the acquisition of fear memory, weakening the transmission of mnemonic information to other brain regions for storage.

In addition, lesion of the basolateral nucleus of the amygdala results in the reduction of nuclear translocation of the GR in the DG and in CA1 (Jeon et al., 2012). Since the functioning of this nucleus is an important component of the neural circuit of fear conditioning, where the sensory information converges and conditioned and unconditioned stimuli are also associated (Phillips and LeDoux, 1992; Goossens and Maren, 2001; Cardinal et al., 2002), the increase in pSer246 that we observed in the DG and CA1 might be modulated by the basolateral amygdala.

We only observed changes in the percentage of immunoreactive cells for pSer232 in CA3 of VH. This area

is an association site and a pathway for flowing of information within the hippocampus. Lesions in the ventral CA3 cause deficits in the expression of freezing 24 and 48 h after training (Hunsaker and Kesner, 2008); therefore, this region appears to be important for memory retrieval. It is known that pSer232 induces the expression of GR-regulated genes (corticotropin-releasing hormone receptor 1, nerve growth factor-induced factor A, ribosomal protein S5, and LIM domain kinase 1, among others) by promoting the recruitment of co-activators, as well as the necessary machinery for transcription (Wang et al., 2002; Schoneveld et al., 2004; Datson et al., 2008; Galliher-Beckley and Cidlowski, 2009); however, the increase in the expression of GR-regulated genes occurs 3 h after GR activation (Morsink et al., 2006), so probably the increase in pSer232 that we observed 60 min after training in the CA3 cell nuclei is one of the initial steps towards the expression of genes that code for proteins that will be required for the establishment of long-term memory. In addition, it has been shown that various antidepressants modulate the expression and phosphorylation of GR, altering its translocation to the nucleus and the expression of genes regulated by GR (Anacker et al., 2011; Guidotti et al., 2013). Therefore, we anticipate that the study of phosphorylation, as well as other post-translational modifications that occur in the GR after hormone binding as a result of emotional or stressful learning, will provide key information for understanding the disorders of stress and anxiety, as well as for the generation of new pharmacological strategies.

Our results give rise to new questions: Will the phosphorylation of GR also be observed during the extinction of the fear memory, or does it only occur during its acquisition? Will the acquisition, consolidation, and/or the extinction of fear memory be affected if GR phosphorylation is inhibited on Ser232 and/or Ser246 in those subregions of the hippocampus where we observed changes? Which genes are being modified due to the phosphorylation of GR on these particular serines?

CONCLUSION

Our data suggest that one of the mechanisms by which GCs modulate the acquisition of fear memory is through phosphorylation of the GR on Ser232 and Ser246 in specific subregions of the DH and VH, which could regulate the expression of glucocorticoid-responsive genes, which also participate in neuronal plasticity processes.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Ethics Committee of the Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RP-L, ML, and GQ designed research. RP-L, NS, and MC performed research. RP-L, CA, RP-A, ML, and GQ analyzed the data. RP-L, NS, MC, CA, RP-A, ML, and GQ wrote the manuscript.

FUNDING

RP-L is a doctoral student of Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and

REFERENCES

- Adzic, M., Djordjevic, J., Djordjevic, A., Nikiforovic, A., Demonacos, C., Radojcic, M., et al. (2009). Acute or chronic stress induce cell compartment-specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alter its transcriptional activity in Wistar rat brain. *J. Endocrinol.* 202, 87–97. doi: 10.1677/joe-08-0509
- Anacker, C., Zunszain, P. A., Cattaneo, A., Carvalho, L. A., Garabedian, M. J., Thuret, S., et al. (2011). Antidepressants increase human hippocampal neurogenesis by activating the glucocorticoid receptor. *Mol. Psychiatry* 16, 738–750. doi: 10.1038/mp.2011.26
- Armario, A., Montero, J. L., and Balasch, J. (1986). Sensitivity of corticosterone and some metabolic variables to graded-levels of low intensity stresses in adult male-rats. *Physiol. Behav.* 37, 559–561. doi: 10.1016/0031-9384(86)90285-4
- Baldi, E., Lorenzini, C. A., and Bucherelli, C. (2004). Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 81, 162–166. doi: 10.1016/j.nlm.2004.02.004
- Blair, H. T., and Fanselow, M. S. (2014). "Fear and memory: a view of the hippocampus through the lens of the amygdala," in *Space, Time and Memory in the Hippocampal Formation*, eds D. Derdikman and J. J. Knierim (Vienna: Springer-Verlag Wien), 465–496.
- Blind, R. D., and Garabedian, M. J. (2008). Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 109, 150–157. doi: 10.1016/j.jsmb.2008.01.002
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999
- Brtnks, V., Berger, S., Gass, P., de Kloet, E. R., and Otzel, M. S. (2009). Mineralocorticoid receptors in control of emotional arousal and fear memory. *Horm. Behav.* 56, 232–238. doi: 10.1016/j.yhbeh.2009.05.003
- Cardinal, R. N., Parkinson, J. A., Hall, J., and Everitt, B. J. (2002). Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum and prefrontal cortex. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 321–352. doi: 10.1016/s0149-7634(02)00007-6
- Cho, J., Yu, N. K., Chot, J. H., Sim, S. E., Kang, S. J., Kwak, C., et al. (2015). Multiple repressive mechanisms in the hippocampus during memory formation. *Science* 350, 82–87. doi: 10.1126/science.1257368
- Cordero, M. I., Merino, J. J., and Sandt, C. (1998). Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 112, 885–891. doi: 10.1037/0735-7044.112.4.885
- Cordero, M. I., and Sandt, C. (1998). A role for brain glucocorticoid receptors in contextual fear conditioning: dependence upon training intensity. *Brain Res.* 786, 11–17. doi: 10.1016/s0006-8993(97)01420-0
- Datson, N. A., Morstink, M. C., Meijer, O. C., and de Kloet, E. R. (2008). Central corticosteroid actions: search for gene targets. *Eur. J. Pharmacol.* 583, 272–289. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.11.070
- Donley, M. P., Schalkin, J., and Rosen, J. B. (2005). Glucocorticoid receptor antagonism in the basolateral amygdala and ventral hippocampus interferes with long-term memory of contextual fear. *Behav. Brain Res.* 164, 197–205. doi: 10.1016/j.bbr.2005.06.020
- Dorey, R., Pterard, C., Chauveau, F., David, V., and Beracochea, D. (2012). Stress-induced memory retrieval impairments: different time-course involvement of corticosterone and glucocorticoid receptors in dorsal and ventral hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 37, 2870–2880. doi: 10.1038/npp.2012.170
- dos Santos Corrêa, M., Vaz, B. D. S., Gritsanti, G. D. V., de Paiva, J. P. Q., Tiba, P. A., and Fornari, R. V. (2019). Relationship between footshock intensity, post-training corticosterone release and contextual fear memory specificity over time. *Psychoneuroendocrinology* 110:104447. doi: 10.1016/j.psyneuen.2019.104447
- Droste, S. K., de Groot, L., Atkinson, H. C., Lightman, S. L., Reul, J., and Linthorst, A. C. E. (2008). Corticosterone levels in the brain show a distinct ultradian rhythm but a delayed response to forced swim stress. *Endocrinology* 149, 3244–3253. doi: 10.1210/en.2008-0103
- Drugan, R. C., Eren, S., Hazi, A., Silva, J., Christianson, J. P., and Kent, S. (2005). Impact of water temperature and stressor controllability on swim stress-induced changes in body temperature, serum corticosterone and immobility in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82, 397–403. doi: 10.1016/j.pbb.2005.09.011
- Dunsmoor, J. E., Kroes, M. C. W., Braren, S. H., and Phelps, E. A. (2017). Threat intensity widens fear generalization gradients. *Behav. Neurosci.* 131, 168–175. doi: 10.1037/bne0000186
- Fanselow, M. S., and Bolles, R. C. (1979). Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93, 736–744. doi: 10.1037/h0077609
- Fanselow, M. S., and Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65, 7–19. doi: 10.1016/j.neuron.2009.11.031
- Federighi, G., Traina, G., Macchi, M., Ciampini, C., Bernardi, R., Baldi, E., et al. (2013). Modulation of gene expression in contextual fear conditioning in the rat. *PLoS One* 8:e80037. doi: 10.1371/journal.pone.0080037
- Gallher-Beckley, A. J., and Cidlowski, J. A. (2009). Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IU/BMB Life* 61, 979–986. doi: 10.1002/iub.245
- González-Franco, D. A., Ramírez-Amaya, V., Joseph-Bravo, P., Prado-Alcalá, R. A., and Quirarte, G. I. (2017). Differential arc protein expression in dorsal and ventral striatum after moderate and intense inhibitory avoidance training. *Neurobiol. Learn. Mem.* 140, 17–26. doi: 10.1016/j.nlm.2017.02.001
- Goossens, K. A., and Maren, S. (2001). Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal and central amygdaloid nuclei in rats. *Learn. Mem.* 8, 148–155. doi: 10.1101/lm.37601
- Goshen, I., Brodsky, M., Prakash, R., Wallace, J., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C., et al. (2011). Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell* 147, 678–689. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.033
- Guidotti, G., Calabrese, F., Anacker, C., Racagni, G., Partante, C. M., and Riva, M. A. (2013). Glucocorticoid receptor and FKBP5 expression is altered following exposure to chronic stress: modulation by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology* 38, 616–627. doi: 10.1038/npp.2012.225
- Heiderstadt, K. M., McLaughlin, R. M., Wright, D. C., Walker, S. E., and Gomez-Sanchez, C. E. (2000). The effect of chronic food and water restriction on open-field behaviour and serum corticosterone levels in rats. *Lab. Anim.* 34, 20–28. doi: 10.1258/002367700780578028
- Hudson, W. H., Youn, C., and Ortlund, E. A. (2013). The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 53–58. doi: 10.1038/nsmb.2456

- Hunsaker, M. R., and Kesner, R. P. (2008). Dissociations across the dorsal-ventral axis of CA3 and CA1 for encoding and retrieval of contextual and auditory-cued fear. *Neurobiol. Learn. Mem.* 89, 61–69. doi: 10.1016/j.nlm.2007.08.016
- Jacobs, N. S., Cushman, J. D., and Fanselow, M. S. (2010). The accurate measurement of fear memory in Pavlovian conditioning: resolving the baseline issue. *J. Neurosci. Methods* 190, 235–239. doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.04.029
- Jeon, B., Hwang, Y. K., Lee, S. Y., Kim, D., Chung, C., and Han, J. S. (2012). The role of basolateral amygdala in the regulation of stress-induced phosphorylated extracellular signal-regulated kinase expression in the hippocampus. *Neuroscience* 224, 191–201. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.08.035
- Ji, J. Z., and Maren, S. (2008). Differential roles for hippocampal areas CA1 and CA3 in the contextual encoding and retrieval of extinguished fear. *Learn. Mem.* 15, 244–251. doi: 10.1101/lm.794808
- Kadmiel, M., and Cidlowski, J. A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 518–530. doi: 10.1016/j.tips.2013.07.003
- Kim, J. J., Rison, R. A., and Fanselow, M. S. (1993). Effects of amygdala, hippocampus and periaqueductal gray lesions on short-term and long-term contextual fear. *Behav. Neurosci.* 107, 1093–1098. doi: 10.1037/0735-7044.107.6.1093
- Korte, S. M. (2001). Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 117–142. doi: 10.1016/s0149-7634(01)00002-1
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi: 10.1038/227680a0
- Lambert, W. M., Xu, C. F., Neubert, T. A., Chao, M. V., Garabedian, M. J., and Jeanneteau, F. D. (2013). Brain-derived neurotrophic factor signaling rewrites the glucocorticoid transcriptome via glucocorticoid receptor phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 33, 3700–3714. doi: 10.1128/MCB.00150-13
- Lamprecht, R., and LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 45–54. doi: 10.1038/nrn1301
- Lee, I., and Kesner, R. P. (2004). Differential contributions of dorsal hippocampal subregions to memory acquisition and retrieval in contextual fear-conditioning. *Hippocampus* 14, 301–310. doi: 10.1002/hipo.10177
- Levenson, J., Weeber, E., Selcher, J. C., Kategaya, L. S., Sweatt, J. D., and Eskin, A. (2002). Long-term potentiation and contextual fear conditioning increase neuronal glutamate uptake. *Nat. Neurosci.* 5, 155–161. doi: 10.1038/nn791
- Layten, L., Vansteenwegen, D., van Kuyck, K., Deckers, D., and Nuttin, B. (2011). Optimization of a contextual conditioning protocol for rats using combined measurements of startle amplitude and freezing: the effects of shock intensity and different types of conditioning. *J. Neurosci. Methods* 194, 305–311. doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.11.005
- Maren, S. (2001). Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 897–931. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.897
- Maren, S., and Fanselow, M. S. (1997). Electrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal hippocampus, or entorhinal cortex produce anterograde deficits in contextual fear conditioning in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 67, 142–149. doi: 10.1006/nlme.1996.3752
- Maren, S., and Holt, W. G. (2004). Hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats: muscimol infusions into the ventral, but not dorsal, hippocampus impair the acquisition of conditional freezing to an auditory conditional stimulus. *Behav. Neurosci.* 118, 97–110. doi: 10.1037/0735-7044.118.1.97
- Martin, K. C., Barad, M., and Kandel, E. R. (2000). Local protein synthesis and its role in synapse-specific plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 587–592. doi: 10.1016/s0959-4388(00)0128-8
- Medina, A. C., Torres-García, M. E., Rodríguez-Serrano, L. M., Bello-Medina, P. C., Quirarte, G. L., McLaugh, J. L., et al. (2019). Inhibition of transcription and translation in dorsal hippocampus does not interfere with consolidation of memory of intense training. *Neurobiol. Learn. Mem.* 166:107092. doi: 10.1016/j.nlm.2019.107092
- Morstin, M. C., Steenbergen, P. J., Vos, J. B., Karst, H., Joels, M., Kloet, E. R., et al. (2006). Acute activation of hippocampal glucocorticoid receptors results in different waves of gene expression throughout time. *J. Neuroendocrinol.* 18, 239–252. doi: 10.1111/j.1365-2826.2006.01413.x
- National Research Council. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academy of Sciences.
- Nomura, H., Nonaka, A., and Matsuki, N. (2012). Population activity in the dorsal hippocampal CA1 encoding the surrounding environment is absent during contextual fear memory expression. *Neuroscience* 220, 19–25. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.06.043
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. (2001). *Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio*. (México: SENASICA).
- Phillips, R. G., and LeDoux, J. E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 106, 274–285. doi: 10.1037/0735-7044.106.2.274
- Pitman, D. L., Ottenweller, J. E., and Natelson, B. H. (1988). Plasma-corticosterone levels during repeated presentation of 2 intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. *Physiol. Behav.* 43, 47–55. doi: 10.1016/0031-9384(88)90097-2
- Pugh, C. R., Fleshner, M., and Rudy, J. W. (1997). Type II glucocorticoid receptor antagonists impair contextual but not auditory-cue fear conditioning in juvenile rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 67, 75–79. doi: 10.1006/nlme.1996.3741
- Quiroz, C., Martínez, I., Quirarte, G. L., Morales, T., Díaz-Cintra, S., and Prado-Alcalá, R. A. (2003). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Exp. Brain Res.* 153, 400–402. doi: 10.1007/s00221-003-1704-1
- Revest, J. M., Di Biasi, F., Kitchener, P., Rouge-Pont, F., Desmedt, A., Turiault, M., et al. (2005). The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids. *Nat. Neurosci.* 8, 664–672. doi: 10.1038/nn1441
- Rodgers, R. J., Haller, J., Holmes, A., Halasz, J., Walton, T. J., and Brain, P. F. (1999). Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiol. Behav.* 68, 47–53. doi: 10.1016/s0031-9384(99)00140-7
- Rodríguez, S. M., and Sapolsky, R. M. (2009). Disruption of fear memory through dual-hormone gene therapy. *Biol. Psychiatry* 65, 441–444. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.09.003
- Rogatsky, I., Waase, C. L. M., and Garabedian, M. J. (1998). Phosphorylation and inhibition of rat glucocorticoid receptor transcriptional activation by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). Species-specific differences between human and rat glucocorticoid receptor signaling as revealed through GSK-3 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 273, 14315–14321. doi: 10.1074/jbc.273.23.14315
- Roozendaal, B., and McGaugh, J. L. (1997). Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. *Neurobiol. Learn. Mem.* 67, 176–179. doi: 10.1006/nlme.1996.3765
- Sandi, C. (2003). Implicación de los glucocorticoides en la consolidación de la memoria. *Rev. Neurol.* 37, 843–848. doi: 10.33588/rn.3709.2003407
- Sandi, C., Loscertales, M., and Guaza, C. (1997). Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *Eur. J. Neurosci.* 9, 637–642. doi: 10.1111/j.1460-9568.1997.tb01412.x
- Sapolsky, R. M., Krey, L. C., and McEwen, B. S. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging - the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr. Rev.* 7, 284–301. doi: 10.1210/edrv-7-3-284
- Sarabjit Singh, R. A., Meijer, O. C., and de Kloet, E. R. (2010). Specificity of glucocorticoid receptor primary antibodies for analysis of receptor localization patterns in cultured cells and rat hippocampus. *Brain Res.* 1331, 1–11. doi: 10.1016/j.brainres.2010.03.052
- Sarabjit Singh, R. A., Meijer, O. C., Schaaf, M. J. M., and de Kloet, E. R. (2009). Subregion-specific differences in translocation patterns of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in rat hippocampus. *Brain Res.* 1249, 43–53. doi: 10.1016/j.brainres.2008.10.048
- Schoneveld, O., Gaemers, I. C., and Lamers, W. H. (2004). Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim. Biophys. Acta* 1680, 114–128. doi: 10.1016/j.bbexp.2004.09.004
- Steimer, T. (2002). The biology of fear- and anxiety-related behaviors. *Dialogues Clin. Neurosci.* 4, 231–249.
- Sutton, M. A., and Schuman, E. M. (2006). Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* 127, 49–58. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.014
- Suvrathan, A., Bennur, S., Ghosh, S., Tomar, A., Anilkumar, S., and Chattarji, S. (2014). Stress enhances fear by forming new synapses with greater capacity for long-term potentiation in the amygdala. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 369:20130151. doi: 10.1098/rstb.2013.0151

- Trivedi, M. A., and Coover, G. D. (2004). Lesions of the ventral hippocampus, but not the dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and inhibitory avoidance on the elevated T-maze. *Neurobiol. Learn. Mem.* 81, 172–184. doi: 10.1016/j.nlm.2004.02.005
- Wang, Z., Frederick, J., and Garabedian, M. J. (2002). Deciphering the phosphorylation “code” of the glucocorticoid receptor *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 277, 26573–26580. doi: 10.1074/jbc.m110530200
- Wiltgen, B. J., Sanders, M. J., Anagnostaras, S. G., Sage, J. R., and Fanselow, M. S. (2006). Context fear learning in the absence of the hippocampus. *J. Neurosci.* 26, 5484–5491. doi: 10.1523/jneurosci.2685-05.2006
- Woodson, J. C., Macintosh, D., Fleshner, M., and Diamond, D. M. (2003). Emotion-induced amnesia in rats: working memory-specific impairment, corticosterone-memory correlation and fear versus arousal effects on memory. *Learn. Mem.* 10, 326–336. doi: 10.1101/lm.62903
- Xing, X., Wang, H., Liang, J., Bai, Y., Liu, Z., and Zheng, X. (2014). Mineralocorticoid receptors in the ventral hippocampus are involved in extinction memory in rats. *Psych. J.* 3, 201–213. doi: 10.1002/pchj.58
- Yoon, T., and Otto, T. (2007). Differential contributions of dorsal vs. ventral hippocampus to auditory trace fear conditioning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 87, 464–475. doi: 10.1016/j.nlm.2006.12.006
- Zhou, M., Kindt, M., Joëls, M., and Krugers, H. J. (2011). Blocking mineralocorticoid receptors prior to retrieval reduces contextual fear memory in mice. *PLoS One* 6:e26220. doi: 10.1371/journal.pone.0026220

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Ponce-Lina, Serafin, Carranza, Arámburo, Prado-Alcalá, Luna and Quirarte. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

