



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**EFFECTO DEL APRENDIZAJE MODERADO SOBRE LOS NIVELES DE  
EVOCACIÓN, CORTICOSTERONA Y FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR  
A GLUCOCORTICOIDES EN EL HIPOCAMPO**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:**

**KATIA FERNANDA GONZÁLEZ GALDAMEZ**

**TUTORA PRINCIPAL:**

**DRA. GINA LORENA QUIRARTE  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

**DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

**DRA. MARTHA L. ESCOBAR RODRÍGUEZ  
FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM**

**CAMPUS UNAM-JURIQUILLA, QUERÉTARO, QRO, MÉXICO. MARZO, 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutor certificamos que la tesis elaborada por: Katia Fernanda González Galdamez, cuyo título es: Efecto del aprendizaje moderado sobre los niveles de evocación, corticosterona y fosforilación del receptor a glucocorticoides en el hipocampo, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los miembros del Comité Tutor

Firma

Presidente Dr. Mauricio Díaz Muñoz \_\_\_\_\_

Secretario (Tutora) Dra. Gina Lorena Quirarte \_\_\_\_\_

Vocal Dr. Juan Felipe Silva Pereyra \_\_\_\_\_

Suplente Dra. Maricela Luna Muñoz \_\_\_\_\_

Suplente Dra. María Rosa del Lourdes Ávila Costa \_\_\_\_\_

Aprobado por el Comité Académico

\_\_\_\_\_  
Dr. Gerardo Rojas Piloni  
Coordinador del Programa

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma máter, por ofrecerme la oportunidad de ser una mejor profesionista y persona.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (Becaria 1082941) por el apoyo económico e institucional otorgado durante la realización de este proyecto.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPPIIT) de la Dirección General del Personal Académico de la UNAM por el donativo IN209822 otorgado para realizar investigación.

A la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

A mi tutora Dra. Gina Lorena Quirarte por el apoyo brindado durante la realización de esta tesis y por permitirme formar parte de su grupo de investigación en el laboratorio B-04 del Instituto de Neurobiología.

A las integrantes de mi comité tutor, la Dra. Maricela Luna Muñoz y a la Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez, por sus contribuciones a este proyecto.

A la Dra. Maricela Luna Muñoz y el Dr. Gerardo Rojas Piloni de la Coordinación del Programa Maestría en Ciencias (Neurobiología), UNAM.

A la Dra. Nuri Aranda López de la Unidad de Enseñanza del INB, UNAM.

A la M.V.Z Norma Serafín López, a la Dra. A. Cristina Medina y el Sr. Bernardino Osorio por todo el apoyo técnico brindado.

A todos los integrantes del laboratorio de Aprendizaje y Memoria del INB UNAM por su apoyo y compañerismo. Al Dr. Antonio Fuentes Ibáñez por su apoyo y orientación desde el inicio de mi proyecto y por su amistad, al M. en C. Rogelio Pegueros Maldonado por su apoyo en el desarrollo y mejora de mi proyecto, además de su amable disponibilidad, y a la Dra. Renata Ponce Lina por su ayuda y disponibilidad.

A la M. en C. Adriana González Gallardo de la Unidad de Proteogenómica.

A la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos de la Unidad de Microscopia, por su apoyo, paciencia y disponibilidad para el desarrollo de mi proyecto.

Al M.V.Z Martín García Servín, la Dra. Alejandra Castilla León y a la Dra. María A. Carbajo Mata, encargados del Laboratorio Universitario de Bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM.

Al Ing. Ramón Martínez Olvera, a la Ing. Comp. María Eugenia Rosas Alatorre, al Ing. Omar González y al Mtro. Moisés Baltazar Mendoza de la Unidad de Cómputo del INB, UNAM.

Al Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela y la Lic. Soledad Medina Malagón encargados de la Biblioteca del Campus Juriquilla, UNAM.

A Erik, por todo el apoyo, paciencia, ánimos y tolerancia que me brindo en todo este proceso, eres el mejor compañero de vida que pude elegir.

A mis padres, que siempre estarán detrás de todos mis logros.

## **DEDICATORIA**

**A todos mis seres queridos, en especial a mi amada familia.**

## RESUMEN

Los glucocorticoides, como la corticosterona (CORT) en roedores, son hormonas liberadas por las glándulas adrenales durante eventos emocionales, y sus acciones están mediadas por receptores a glucocorticoides (GR). Estas hormonas son moduladores importantes de la consolidación y evocación de la memoria, y sus efectos dependen del momento de administración y de la intensidad del estresor. Los resultados de nuestro laboratorio han mostrado que el entrenamiento en evitación inhibitoria con una intensidad moderada (0.5 mA) da como resultado rendimientos en la retención de memoria divergente, es decir, las ratas pueden mostrar latencias de retención altas o bajas. Para investigar más a fondo el papel de CORT y la activación, a través de la fosforilación de GR en esta retención divergente, entrenamos ratas Wistar macho adultas con 0.5 mA en evitación inhibitoria y 48 h después medimos la retención de memoria. Se utilizaron los grupos control apropiados. Se utilizó el inmunoensayo ELISA para evaluar los niveles plasmáticos de CORT a los 15 min después del entrenamiento, y se midió la presencia de GR fosforilado en serina 211 en las subregiones CA1 y giro dentado (DG) del hipocampo dorsal con inmunofluorescencia a los 60 min después de la prueba de retención. De acuerdo con su desempeño en la prueba de retención, cada animal fue asignado a uno de dos grupos: baja o alta retención, tomando como referencia la media total. El grupo de alta retención tuvo una puntuación de latencia y un nivel de CORT significativamente más altos en comparación con el grupo de baja retención, pero no hubo diferencias significativas entre los grupos con respecto a la fosforilación de GR en ser211 en el hipocampo dorsal. Estos grupos no fueron diferentes en cuanto al peso corporal o el peso total de las glándulas suprarrenales. Estos hallazgos muestran que una experiencia de aprendizaje moderada puede causar retención de memoria alta o baja y niveles plasmáticos de CORT que están relacionados con el nivel de desempeño en la prueba de retención; aparentemente, estos niveles plasmáticos no implican cambios en la activación del GR, medido por la presencia de pGR ser211 en las subregiones CA1 y DG del hipocampo dorsal. Adicionalmente, examinamos la memoria de corto plazo en un grupo independiente de animales, 30 min después del entrenamiento, y encontramos nuevamente una retención divergente. Posteriormente, analizamos, también con el inmunoensayo ELISA, la concentración de CORT en suero y el grupo de baja retención y el grupo de alta retención no fueron significativamente diferentes. Por tanto, no hay relación entre la cantidad de la hormona y su desempeño en la prueba de retención cuando se evalúa la memoria de corto plazo.

## ABSTRACT

Glucocorticoids, such as corticosterone (CORT) in rodents, are hormones released by the adrenal glands during emotional events, and their actions are mediated by glucocorticoids receptors (GR). These hormones are important modulators of memory consolidation and retrieval, and their effects depend on the time of administration and intensity of the stressor. Results from our laboratory have shown that training in inhibitory avoidance with a moderate intensity (0.5 mA) results in divergent memory retention performances, i.e., rats may display high or low retention scores. To investigate further the role of CORT and the activation, through phosphorylation, of the GR on such dissimilar retention, we trained adult male Wistar rats with 0.5 mA on inhibitory avoidance and 48 hours later we measured memory retention. Appropriate control groups were studied. The ELISA immunoassay was used to evaluate CORT plasma levels at 15 minutes after training, and the presence of GR phosphorylated in serine 211 in the subregions CA1 and dentate gyrus (DG) of dorsal hippocampus was measured with immunofluorescence at 60 minutes after the retention test. According to their performance in the retention test, each animal was assigned to one of two groups: low or high retention, using the total mean score as reference. The high retention group had a significantly higher latency score and level of CORT compared with the low retention group, but there were no significant differences between the groups regarding GR phosphorylation in ser211 in dorsal hippocampus. These groups were not different regarding body weight or total weight of adrenal glands. These findings show that a moderate learning experience can cause low or high memory retention and CORT plasma levels that are related to the performance level on the retention test; apparently, these plasma levels do not involve changes in the activation of the GR, as measured by the presence of pGR ser211 in dorsal hippocampus CA1 y DG subregions. Additionally, we examined the short-term memory in an independent group of animals, 30 min after de training, and we found again a divergent memory retention. Later, we analyzed, with the ELISA immunoassay as well, the concentration of CORT in serum and the low retention group and the high retention group were not significantly different.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA .....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT .....	VII
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. El aprendizaje y la memoria .....	2
2.1.1. Moduladores de memoria.....	4
2.2. Glucocorticoides.....	5
2.3. Receptor a glucocorticoides .....	7
2.3.1. Fosforilación del GR.....	9
2.3.2. Distribución del GR en el hipocampo .....	10
2.4. Hipocampo.....	11
2.4.1. Anatomía del hipocampo.....	11
2.4.2. Conexiones neurales del hipocampo .....	12
2.4.3. Circuito intrínseco .....	13
2.4.4. Funciones del hipocampo .....	14
2.4.5. Participación del hipocampo en tareas aversivas.....	15
2.5. Reactividad ante un estímulo estresante .....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	20
5. HIPÓTESIS.....	21
6. OBJETIVO GENERAL .....	21
7. MÉTODO .....	22
7.1. Sujetos .....	22
7.2. Tarea de evitación inhibitoria .....	22
7.3. Estrategia experimental.....	23
7.4. Obtención de muestras.....	25
7.5. Cuantificación de corticosterona.....	25
7.6. Semicuantificación de los niveles de GR fosforilado .....	25
7.7. Análisis estadístico .....	27
8. RESULTADOS .....	28
8.1. Efecto del entrenamiento de evitación inhibitoria .....	28
8.2. Medición de los niveles de corticosterona en suero.....	31

8.3. Peso corporal y peso total de las glándulas adrenales .....	32
8.4. Análisis de inmunofluorescencia del GR fosforilado en la serina 211 .....	33
8.5. Efecto del entrenamiento en la memoria a corto plazo .....	34
8.6. Medición de los niveles de corticosterona de la memoria a corto plazo .....	35
9. DISCUSIÓN.....	36
10. CONCLUSIONES .....	43
11. PERSPECTIVAS .....	44
12. REFERENCIAS .....	45

## 1. INTRODUCCIÓN

La conducta de los organismos es el resultado de la interacción entre los genes y el medio. La conducta puede ser modulada por el ambiente a través del aprendizaje y la memoria. Estos procesos permiten una rápida adecuación de la conducta y se basan en cambios fisiológicos en el sistema nervioso. El aprendizaje es el proceso por el que se adquiere, o se modifica la conducta, mientras que la memoria es el proceso por el cual ese cambio conductual es almacenado y posteriormente recuperado (Kandel, 2001). Clásicamente se consideran tres etapas en la memoria: adquisición, consolidación y evocación (Dudai, 2004).

Los glucocorticoides (GCs) son hormonas adrenocorticales liberadas ante situaciones estresantes que pueden modular la memoria (Roosendaal, 2000; Sandi & Pinelo-Nava, 2007). Durante dicho evento estresante, la actividad adrenérgica periférica y cerebral, activan al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), y se desencadena la secreción de GCs a la sangre. Estos pueden atravesar la barrera hematoencefálica y regular las funciones mnemónicas de regiones cerebrales relacionadas con el proceso de memoria, como por ejemplo la amígdala y el hipocampo, tanto en la etapa de consolidación como en la de evocación. Se sabe que regularmente los eventos estresantes y emocionales se recuerdan mejor que los eventos neutros (McGaugh, 2000).

Las consecuencias del aumento de los GCs sobre la memoria dependen de la fase de la memoria en que se presente dicha activación. Estos efectos en general pueden ser de dos tipos: deterioro o facilitación (Roosendaal, 2002). Por ejemplo, los GCs pueden facilitar la consolidación de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria y de condicionamiento de miedo al contexto a través de su unión con el receptor a glucocorticoides (GR) localizado en distintas áreas cerebrales, siendo el hipocampo un área que muestra una amplia expresión (De Kloet & Reul, 1987; Donley et al., 2005; Medina et al., 2007; Pugh et al., 1997; Reis et al., 2016; Revest et al., 2005). El GR al acoplarse con su ligando se puede fosforilar en

distintos aminoácidos ubicados en su región amino-terminal. Dependiendo del aminoácido fosforilado se afectará la función dentro del núcleo (transactivación o transrepresión) (Ramamoorthy & Cidlowski, 2016).

Un modelo experimental para estudiar los mecanismos cerebrales implicados en la memoria de eventos estresantes es la tarea de evitación, ya que es ampliamente utilizada para investigar la adquisición, la consolidación y la evocación de la memoria por diversos grupos de investigación. En esta tarea el estriado, la amígdala y el hipocampo son estructuras cerebrales que participan de manera importante (Cogan & Reeves, 1979; Martínez et al., 2002; Piña et al., 1994; Roozendaal & McGaugh, 1996, 1997).

Previamente en nuestro laboratorio se investigó la activación del GR en el hipocampo después del proceso de aprendizaje en la tarea de condicionamiento de miedo al contexto (CMC) utilizando dos intensidades de entrenamiento 0.5 y 1.5 mA, encontrando que la fosforilación del GR es diferente en las distintas regiones del hipocampo. Asimismo, un estudio que se está llevando a cabo en nuestro laboratorio ha mostrado que el entrenamiento intenso induce el incremento de la fosforilación del GR en las neuronas de la región de CA1 en el hipocampo y en el estriado ventral. Sin embargo, es necesario conocer cómo se da esta fosforilación después de la evocación, para así poder entender el papel de los GCs en las diferentes etapas de la formación de la memoria.

## **2. ANTECEDENTES**

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

El aprendizaje o adquisición se refiere a los cambios relativamente permanentes de la conducta, producidos por la práctica o la experiencia (Hinde, 1970), mientras que la memoria se refiere al proceso de almacenamiento de ese cambio o información.

Los procesos de aprendizaje se pueden categorizar en asociativos y no asociativos. El aprendizaje no asociativo se refiere a la respuesta ante un solo estímulo y dentro de esta categoría se encuentra la sensibilización, habituación

e impronta, mientras que el aprendizaje asociativo se refiere a la formación de las asociaciones entre estímulos y respuestas e incluye el condicionamiento clásico (Pavloviano) y el operante (instrumental).

El condicionamiento clásico se induce mediante un procedimiento en el que un estímulo generalmente neutral, denominado estímulo condicionado (EC), se combina con un estímulo que generalmente provoca una respuesta, denominado estímulo incondicionado (EI), el aprendizaje de la relación EC-EI se evalúa midiendo la respuesta condicionada (RC) que desencadena el EC como consecuencia de su emparejamiento con el EI. El condicionamiento operante implica el aprendizaje de una relación entre una respuesta y un estímulo. La respuesta suele denominarse operante y el estímulo reforzador o castigador, dependiendo de si el aprendizaje de la relación respuesta-estímulo conduce al aumento o disminución de la probabilidad de emisión de la operante. (Byrne, 2013; Jozefowicz, 2012).

A lo largo de los años se han generado múltiples clasificaciones de los distintos tipos de memoria, una de ellas considera los de la memoria a lo largo de una dimensión temporal de duración. Así, dependiendo de qué tanto tiempo se mantenga la información en el sistema se puede hablar de memoria de corto plazo o memoria de largo plazo. La memoria de corto plazo es lábil y de una duración breve, desde minutos hasta un par de horas. La memoria de largo plazo es estable y tiene una duración mayor, años o toda la vida. Clasificar a la memoria por su duración no es la única forma ya que también se ha hecho con base al tipo de información (declarativa o de procedimiento) y por su propósito (de trabajo y de referencia). Clásicamente se reconocen tres etapas de los procesos del aprendizaje y la memoria: adquisición, consolidación y evocación.

**Adquisición:** Es la codificación de la información, el proceso por el que las características de un estímulo o de un hecho son tratadas y convertidas en una huella mnésica (Van der Linden et al., 1994).

**Consolidación:** es el proceso molecular dependiente de la síntesis de proteínas mediante el cual un rastro de memoria de corto plazo se transfiere a una memoria estable de largo plazo (Kandel et al., 2001; McGaugh, 2000). Dependiendo de la

forma de memoria, la consolidación de la memoria tiene lugar en regiones cerebrales parcialmente diferentes (Schwabe & Wolf, 2013). La consolidación juega un papel importante en la patogénesis de los trastornos relacionados con el miedo al estabilizar los recuerdos aversivos después de un evento aversivo (Mineka & Oehlberg, 2008; Yehuda & LeDoux, 2007).

Evocación: proceso de recopilar información almacenada previamente. Dependiendo de la forma de memoria, en este proceso al igual que en la consolidación pueden estar implicadas distintas regiones cerebrales (Schwabe & Wolf, 2013). La recuperación de recuerdos aversivos puede llevar a experimentar miedo, que es el síntoma central de los trastornos relacionados con éste.

La memoria también puede clasificarse por el tipo de información. Squire (1987) clasificó a la memoria como declarativa y no declarativa. La memoria declarativa incorpora la memoria semántica y episódica, y se refiere a las funciones de la memoria cotidiana, que suelen estar alteradas en los pacientes amnésicos. Se cree que la memoria declarativa se basa principalmente en las estructuras del lóbulo temporal medial, incluido el hipocampo. La memoria no declarativa incluye varios subcomponentes, de los cuales la memoria procedimental o la formación de memorias motoras es la más prominente. Se cree que la memoria no declarativa depende principalmente del cuerpo estriado, el cerebelo y las áreas de asociación cortical (Cohen & Squire, 1980).

### 2.1.1. Moduladores de memoria

Los eventos estresantes conducen a la señalización orquestada por diversas hormonas, péptidos y neurotransmisores tanto en la periferia como en el cerebro. Estos mediadores del estrés no sólo preparan a un individuo para las consecuencias agudas de una situación peligrosa o amenazante, sino que también inducen respuestas adaptativas a largo plazo, incluidas las influencias en el aprendizaje y la memoria.

Una amplia evidencia de estudios en animales ha indicado que las hormonas GCs, junto con muchos otros mediadores del estrés, están involucradas de

manera crucial en la mediación de los efectos moduladores del estrés tanto en la consolidación como en la evocación de la memoria (de Quervain et al., 1998; Quirarte et al., 1997; Roozendaal et al., 2009).

## 2.2. Glucocorticoides

Los GCs son hormonas esteroides secretadas por las glándulas adrenales que regulan una gran variedad de procesos biológicos y ejercen una profunda influencia en muchas funciones fisiológicas (Nicolaidis et al., 2018). Son importantes para el mantenimiento de la homeostasis basal y la relacionada con el estrés al actuar como productos finales del eje HPA que lo modulan (Chrousos, 1995).

La activación del eje HPA da como resultado la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) de las neuronas parvocelulares en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN). Ésta actúa sobre la hipófisis para inducir la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en el torrente sanguíneo. La ACTH estimula a la corteza adrenal y produce la secreción de GCs que son liberados a la circulación sanguínea. Los GCs se sintetizan a partir del colesterol mediante una serie de reacciones enzimáticas. Las 11 $\beta$ -hidroxiesteroides deshidrogenasas (11 $\beta$ -HSD) regulan la actividad biológica de los glucocorticoides, la 11  $\beta$  -HSD1 cataliza la activación del esteroide en sus formas activas: cortisol en humanos o corticosterona (CORT) en roedores (Fig.1). Las 11  $\beta$  -HSD2 facilitan la reacción opuesta convirtiendo las formas activas cortisol y CORT en las formas inactivas cortisona y 11-deshidrocorticosterona (Chapman et al., 2013).

Los GCs son secretados tónicamente en respuesta a un agente estresante; una vez en el torrente sanguíneo, los GCs se difunden en los tejidos y las células y se unen a los receptores nucleares de GCs o mineralocorticoides (MR) aunque quizá hay también receptores membranales. Se ha demostrado que los GCs modulan la memoria, ya que la adrenalectomía deteriora la memoria y se revierte el deterioro mediante la administración sistémica de dexametasona, un

glucocorticoide sintético (Roozendaal et al., 1996). Estos datos sugieren que el deterioro de la memoria es causado por la falta de GCs y, por lo tanto, apoyan su participación en el proceso de consolidación de la memoria.

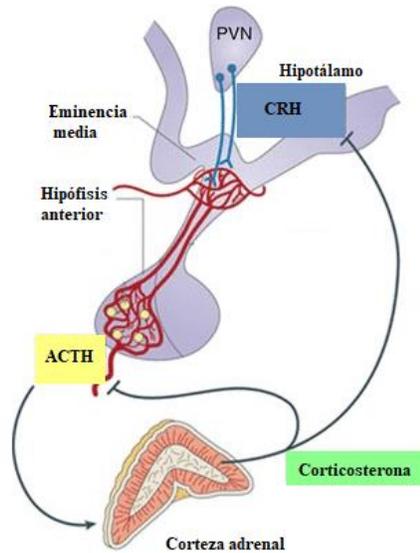


Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA). La activación del eje HPA produce la síntesis y secreción de la hormona liberadora de la corticotropina (CRH) por las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) hacia la parte anterior de la hipófisis donde promueve la síntesis de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) que a su vez produce la síntesis y liberación de corticosterona en la corteza de las glándulas adrenales. La corticosterona regula por retroalimentación negativa el eje. Modificado de Lightman & Conway-Campbell, (2010).

Al evaluar el papel de los GCs en la evitación inhibitoria (EI), se encontró que al inhibir la síntesis de GCs con el fármaco metirapona, con una dosis alta (50 mg), 90 min antes de la prueba de retención disminuyó significativamente el porcentaje de inmovilidad de este grupo en comparación con los animales tratados con vehículo, mostrando así que los GCs tienen un papel relevante en la evocación en esta tarea (Roozendaal et al., 1996).

También se ha demostrado que las inyecciones sistémicas de GCs administrados después de una experiencia de entrenamiento revierten los efectos amnésicos de la administración de inhibidores de síntesis de proteínas sobre la retención en ratones entrenados en EI (Flood et al., 1978).

Estudios posteriores han demostrado que las inyecciones sistémicas de dosis moderadas de CORT o del glucocorticoide sintético dexametasona mejoran la memoria de largo plazo para el entrenamiento de EI cuando se administran poco después, pero no varias horas después de una experiencia de entrenamiento (Flood et al., 1978; Kovács et al., 1977; Roozendaal & McGaugh, 1996; Roozendaal et al., 1999).

Finalmente se ha mostrado que, a mayor intensidad de entrenamiento en EI, es decir, mayor injerencia del elemento aversivo, se producen niveles más altos de CORT plasmática posterior al entrenamiento, lo que se asocia con un mayor tiempo de retención en la prueba de evocación (Ader & de Wied, 1972; Sandi & Rose, 1997). Esto sugiere que la CORT mejora la consolidación de la memoria y que actúa sobre los GR en el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal para facilitar la memoria (Roozendaal et al., 1996).

### 2.3. Receptor a glucocorticoides

El (GR) pertenece a la familia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción activados por ligando. Todos los receptores nucleares, incluido el GR, muestran una estructura modular compuesta de cinco a seis regiones (AF): la región A/B amino-terminal, también llamada dominio inmunogénico o N-terminal contiene un dominio de transactivación importante, denominado función de activación (AF-1), las regiones C y E, que corresponden a los dominios de unión al ADN (DBD) que contiene dos motivos de dedos de zinc tipo C4 a través de los cuales se une a los elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) y el dominio de unión a ligando (LBD), respectivamente. La región D representa la región de bisagra (HR), mientras que la región F se encuentra en el extremo C-terminal de los NR y presenta alta variabilidad. El GR no contiene una región F (Ramamoorthy & Cidlowski, 2016) (Figura 2A).

#### Mecanismos de acción

Acciones genómicas: En su estado inactivo, el GR no se une al ligando y reside

en el citoplasma en un complejo chaperón con la proteína de choque térmico 90-p23, que inactiva la unión del GR al DNA, mientras mantiene al receptor competente para la unión con un ligando de alta afinidad. Tras la unión de la hormona, las moléculas de GR se homodimerizan y se importan rápidamente al núcleo. En el núcleo, el complejo hormona- ligando se une a los GREs y modulan la transcripción de genes diana. La unión de GR a los GREs induce cambios conformacionales en GR que conducen al reclutamiento coordinado de complejos correguladores y remodeladores de la cromatina que influyen en la actividad de la ARN polimerasa II y activa la transcripción o represión de genes (Ramamoorthy & Cidlowski, 2016)(Figura 2B).

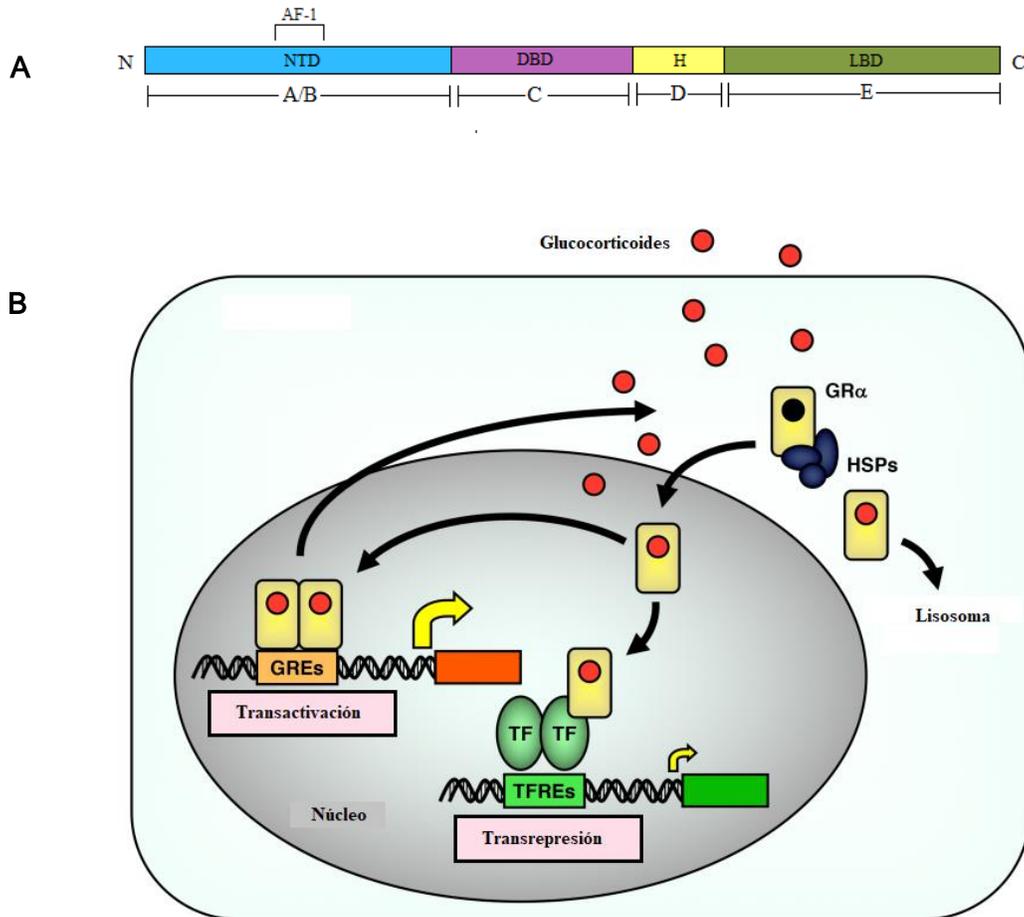


Figura 2. **A)** Estructura de dominio modular del GR. Se compone del dominio N-terminal (NTD) que contiene la función de activación 1 (AF-1), un dominio de unión al ADN (DBD), una región de bisagra (H) y un dominio de unión al ligando (LBD). Modificado de Weikim et al. (2018). **B)** Mecanismo de acción de los GCs por la vía genómica. La unión del GR con su ligando produce su translocación al núcleo, forma dímeros y se une a los elementos de respuesta a GCs (GREs) que regulan la actividad transcripcional. Modificado de Nicolaidis et al. (2020).

Las acciones rápidas no genómicas de los glucocorticoides están mediadas por interacciones fisicoquímicas con el GR citosólico o GR unido a membrana. A diferencia de los efectos genómicos, los efectos no genómicos de los glucocorticoides no requieren síntesis de proteínas y ocurren entre segundos y minutos después de la activación del GR (Groeneweg et al., 2011).

### 2.3.1. Fosforilación del GR

La fosforilación de proteínas es el principal mecanismo molecular a través del cual se regula la función de las proteínas en respuesta a estímulos extracelulares. Prácticamente todos los tipos de señales extracelulares, incluidas las citocinas, hormonas, neurotransmisores y factores neurotróficos, así como los estímulos físicos como el calor y la luz visible, producen la mayoría de sus diversos efectos fisiológicos al regular el estado de fosforilación de proteínas específicas en sus células diana.

Las funciones neuronales que subyacen a la plasticidad sináptica y los procesos de memoria se basan en complejos moleculares altamente especializados, que forman redes de señalización intracelular. La organización precisa y el funcionamiento adecuado de esta red intracelular requiere de un amplio grado de regulación de alta fidelidad, que se logra en gran medida mediante la fosforilación de proteínas.

La fosforilación de proteínas es una modificación postraduccional de proteínas, mediante la cual un grupo fosfato se une covalentemente a un residuo de serina, treonina o tirosina. La conversión de una proteína sustrato de un estado no fosforilado a la forma fosforilada es catalizada por una proteína cinasa. La fosfoproteína se puede convertir de nuevo al estado no fosforilado mediante una proteína fosfatasa. Las proteínas fosfatasas catalizan la ruptura de este enlace fosfoéster a través de la hidrólisis. Este cambio reversible dependiente de la actividad, de la forma no fosforilada a la fosforilada, es el mecanismo molecular más ampliamente utilizado, mediante el cual se transmiten señales fisiológicas para regular las funciones celulares. La adición de grupos fosfato a las proteínas

puede inducir cambios conformacionales que alteran las funciones bioquímicas y celulares, como la modulación de la actividad enzimática, la ubicación celular o la asociación molecular. En condiciones basales, el nivel de fosforilación de un sustrato está determinado por un equilibrio en la actividad cinasa y fosfatasa. Tras la estimulación a través de señales extracelulares e intracelulares, el nivel de fosforilación se puede cambiar aumentando o disminuyendo la actividad de una proteína cinasa o una proteína fosfatasa.

El GR muestra un nivel basal de fosforilación y se hiperfosforila al unirse a los GCs. Sin embargo, la estructura del ligando, cortisol o CORT como ligandos endógenos, determina tanto el patrón como la extensión de la fosforilación del GR.

La transcripción mediada por GR está regulada tanto positiva como negativamente por la fosforilación. Hasta la fecha, se ha informado que el GR se fosforila en cuatro sitios principales (Thr171, Ser224, Ser232 y Ser246; en GR de rata) en su región reguladora transcripcional N-terminal. MAPK fosforila GR de rata en Thr171 y Ser246, mientras que la cinasa dependiente de ciclina (Cdk) lo fosforila en Ser224 y Ser232 (Ramamoorthy & Cidlowski, 2016).

En ratas, una mayor cantidad de serina 232 fosforilada (pSer232) induce la activación y translocación nuclear del receptor y aumenta su actividad transcripcional. Por el contrario, la fosforilación de la serina 246 (pSer246) induce el efecto opuesto al promover la exportación nuclear del GR o por su unión a correpresores dentro del núcleo, reprimiendo así la transcripción (Adzic et al., 2009; Rogatsky et al., 1998; Wang et al., 2002).

### 2.3.2. Distribución del GR en el hipocampo

Se sabe que los GRs están ampliamente distribuidos en el cerebro y que son abundantes en el cerebelo, el hipocampo y el núcleo paraventricular del hipotálamo, estas últimas dos estructuras por su papel clave en el control del eje HHA (Dickens et al., 2011).

Algunos estudios han mostrado la localización del GR en el hipocampo de rata,

principalmente en su región dorsal. En condiciones basales, se expresan en las distintas regiones hipocampales, presentándose abundantemente en CA1, CA2 y en el giro dentado (GD), y de forma moderada en las células piramidales de CA3 (Van Eekelen et al., 1988).

## 2.4. Hipocampo

### 2.4.1. Anatomía del hipocampo

El hipocampo de rata es una estructura alargada, con su eje largo que se extiende en forma de C desde la línea media del cerebro cerca de los núcleos septales (rostródorsalmente) sobre y detrás del tálamo hasta el lóbulo temporal (caudoventralmente) (Figura 3). El hipocampo propiamente dicho tiene tres subdivisiones: CA3, CA2 y CA1, las regiones CA1 y CA3 se diferencian en cuanto al tamaño de sus células principales; las neuronas piramidales, que son más grandes en CA3 y al patrón de conexión, la región CA2 consta de neuronas piramidales grandes como en CA3, pero carece de la entrada de fibras musgosas como en CA1. La formación hipocampal incluye estas tres regiones, el giro dentado, subiculum, pre y para subiculum y la corteza entorrinal (Figura 3) (Amaral & Lavenex, 2007).

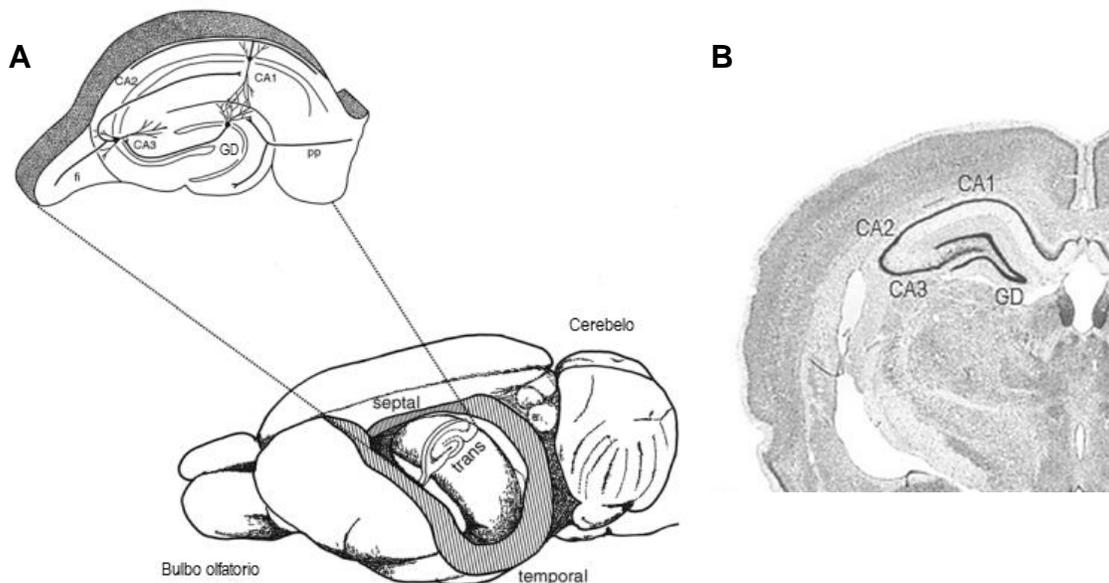


Figura 3. **A)** Localización del hipocampo en el cerebro de rata considerando los ejes septotemporal y transversal. **B)** Corte coronal de cerebro de rata que muestra las regiones del hipocampo: CA1, CA2, CA3 y GD. Modificado de Andersen et al. (2007).

Considerando su eje longitudinal se divide en hipocampo dorsal (DH) y ventral (VH), con los dos tercios septales que comprenden la región dorsal y el tercio restante que comprende la región ventral (Moser & Moser, 1998) (Figura 4)., estudios anatómicos indican que las conexiones de entrada y salida del hipocampo dorsal y el hipocampo ventral son distintas (Swanson & Cowan, 1977).

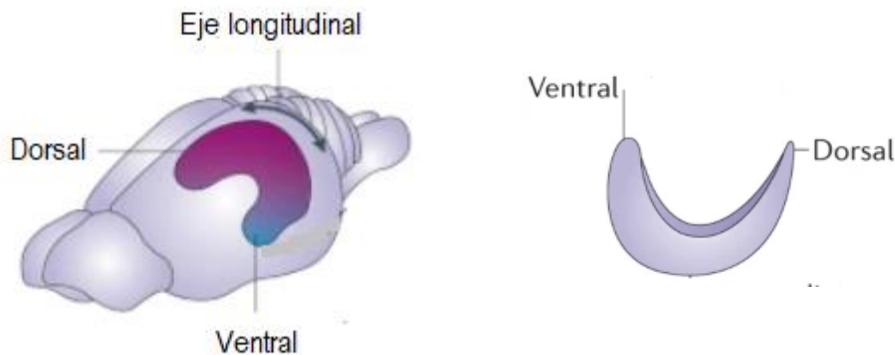


Figura 4. División longitudinal del hipocampo, en donde se distinguen dos regiones principales, el hipocampo dorsal y el hipocampo ventral. Modificado de Strange et al. (2014).

#### 2.4.2. Conexiones neurales del hipocampo

##### Aferencias

La principal aferencia a la formación del hipocampo procede de la corteza entorrinal, a través de una proyección difusa denominada vía perforante, el subículo recibe también una modesta proyección del complejo amigdalino.

##### Eferencias

La proyección eferente de la formación del hipocampo se origina principalmente en las células del subículo y en menor grado en las células piramidales del hipocampo. En ambos casos, los axones de estas neuronas se introducen en el alveo, confluyen y forman la fimbria del hipocampo y luego continúan hasta el fórnix.

A nivel de la comisura anterior, el fórnix se divide en sus porciones poscomisural y precomisural. Las fibras que se originan en el subículo forman básicamente el fórnix poscomisural. La mayor parte de estas fibras terminan en el núcleo mamilar

medial, y algunas se introducen en el núcleo ventromedial del hipotálamo y en el núcleo anterior del tálamo dorsal. El fórnix precomisural está compuesto por fibras que se originan principalmente en el hipocampo. Estas fibras se hallan organizadas de modo difuso y se distribuyen hacia los núcleos septales, las áreas mediales de la corteza frontal, los núcleos preóptico y anterior del hipotálamo y el núcleo accumbens.

### 2.4.3. Circuito intrínseco

La conectividad clásica dentro del hipocampo es conocida como el "bucle trisináptico" en donde la corteza entorrinal proporciona la principal entrada cortical al hipocampo, con sus proyecciones más fuertes a través de la ruta perforante hacia el DG (sinapsis 1). El GD se proyecta a la región CA3 a través de la vía de las fibras musgosas (sinapsis 2). La región CA3 proyecta a la región CA1 a través de la vía colateral de Schaffer (sinapsis 3). Finalmente, CA1 proyecta de nuevo a la corteza entorrinal, completando el bucle (Figura 5).

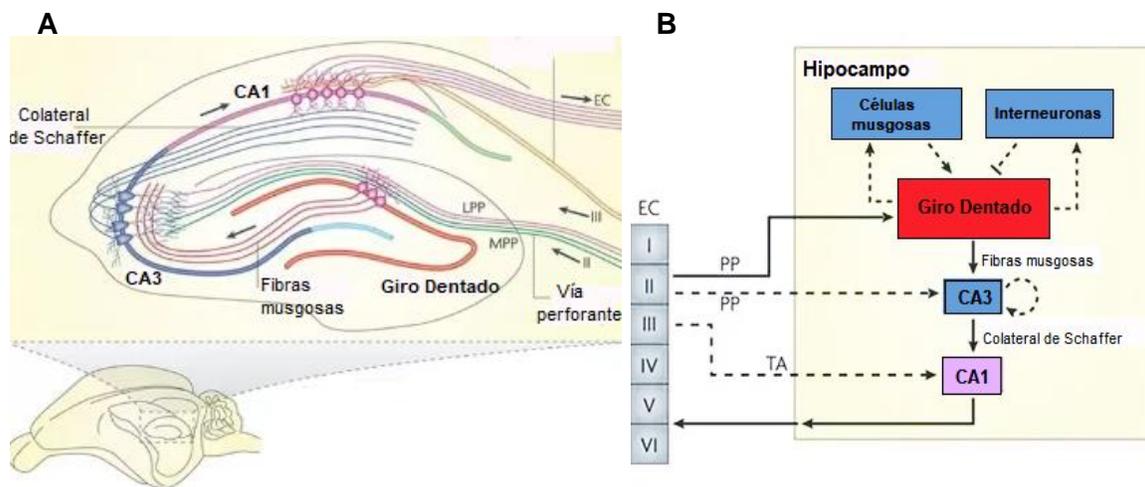


Figura 5. **A)** Ilustración del circuito del hipocampo. **B)** Diagrama de la red neuronal del hipocampo. Se muestra la vía trisináptica excitatoria tradicional (corteza entorrinal (EC)–Giro dentado–CA3–CA1–EC) está representada por flechas sólidas. Modificado de Deng et al., (2011).

A pesar de este circuito intrínseco conservado, las porciones dorsal y ventral tienen diferentes conectividades con áreas corticales y subcorticales. El

hipocampo ventral recibe proyecciones de las áreas cinguladas involucradas en la regulación emocional (cortezas infralímbicas y prelímbicas) y el hipocampo dorsal de las áreas cinguladas involucradas en el procesamiento espacial (la corteza retrosplenial). El DH se proyecta hacia una parte rostral muy pequeña del septum lateral (LS), mientras que el VH inerva partes progresivamente más grandes del LS ventral; y esta organización se conserva en las proyecciones del LS al hipotálamo. La conectividad del hipocampo con el núcleo accumbens y la amígdala también siguen un patrón topográfico, con porciones más ventrales del hipocampo que se proyectan a partes más mediales de ambas estructuras subcorticales (Strange et al., 2014).

#### 2.4.4. Funciones del hipocampo

El hipocampo es una estructura esencial para la formación de nuevos recuerdos declarativos de tipo episódicos, y también tiene un papel bien caracterizado en la navegación espacial. La formación del hipocampo parece desempeñar un papel fundamental en la capacidad del cerebro para formar asociaciones rápidas y duraderas entre los estímulos ambientales de tal manera que permita el aprendizaje de nueva información fáctica concreta y abstracta (memoria de hechos) y el recuerdo y el reconocimiento detallados de eventos y lugares (memoria episódica). Aprender la configuración espacial de los lugares parece ser un papel especialmente importante del hipocampo en los roedores. Muchas células piramidales CA1 y CA3 se comportan como "células de lugar". Tras la exposición inicial a un nuevo entorno, estas células adquieren en varios minutos la capacidad de aumentar su tasa de activación neuronal cada vez que la rata regresa a un lugar particular en ese entorno, formando así un "mapa cognitivo" dentro del cerebro (Spencer & Bland, 2007).

De acuerdo con sus diferencias neuroanatómicas, la evidencia sugiere que puede haber disociaciones funcionales entre el DH y el VH. El DH recibe información visual, auditiva y somatosensorial que se origina en las cortezas sensoriales primarias y secundarias a través de la corteza entorrinal medial y su

función principal es el reconocimiento y procesamiento de información contextual, mientras que el VH tiene conexiones recíprocas directas con la amígdala, así como fuertes conexiones con el hipotálamo y participa prominente en una variedad de comportamientos emocionales (Andersen et al., 2007).

#### 2.4.5. Participación del hipocampo en tareas aversivas

La respuesta al estrés es una cascada bioquímica compleja que implica la liberación de diversas sustancias químicas que pueden afectar varios aspectos de la memoria, las estructuras cerebrales y los procesos fisiológicos. Una estructura del cerebro que participa de manera crucial tanto en la memoria como en la regulación neuroendocrina de las hormonas del estrés es el hipocampo. El hipocampo es una estructura necesaria para la formación de la memoria declarativa en humanos, y memoria espacial (relacional o contextual) en roedores. Se sabe que las experiencias estresantes, y especialmente traumáticas, producen recuerdos intensos y duraderos de los eventos mismos, dado la relevancia de esta estructura se han realizado diversos estudios para saber cómo el estrés afecta la cognición dependiente del hipocampo, mediante la utilización de tareas aversivas dependientes de esta estructura, como la evitación inhibitoria, el condicionamiento de miedo al contexto y el laberinto acuático de Morris( Martínez et al, 2002, Corcoran & Maren, 2001, 2004, Good & Honey, 1991, Holt & Maren, 1999, Miyoshi et al.2012)

El papel del hipocampo en la codificación de las representaciones contextuales es coherente con la gran cantidad de literatura sobre el papel del hipocampo en la representación espacial y la navegación alocténtrica.

Esto sucede debido a que el entorno inmediato es un componente de la representación contextual general de un animal, y asociar entornos con seguridad versus peligro podría ser clave para la supervivencia de un animal. Las neuronas del hipocampo responden a muchos tipos de estímulos, incluidas las señales no espaciales, pero son particularmente sensibles a la ubicación espacial. Estudios recientes han mostrado que el hipocampo genera una representación neuronal del contexto, que puede transmitirse a las regiones

cerebrales extrahipocampales para facilitar la modulación contextual de las respuestas conductuales y los recuerdos (Eichenbaum et al. (1999).

Extensa literatura que involucra lesiones cerebrales experimentales demuestra que el hipocampo está críticamente involucrado en el procesamiento del contexto (Anagnostaras et al., 2001; Maren, 2001; Myers & Gluck, 1994). Por ejemplo, las lesiones del hipocampo alteran las respuestas condicionadas del miedo a los estímulos contextuales, las lesiones del hipocampo en roedores producen deficiencias en el comportamiento de congelación durante la exposición a un contexto emparejado con choques. Estos déficits son especialmente robustos cuando las lesiones del hipocampo se producen pronto, un día después del condicionamiento del miedo contextual, pero son mínimos cuando se producen las lesiones en momentos posteriores (30-100 días después del condicionamiento) (Kim & Fanselow, 1992; Phillips & LeDoux, 1992). Las lesiones del hipocampo o la corteza entorrinal (CE) hacen que los sujetos sean insensibles a los cambios en el contexto (Freeman et al., 1997; Penick & Solomom, 1991).

Las lesiones inducidas por ácido kaínico en la región CA3 afectan selectivamente el rendimiento de la retención en la prueba de animales entrenados en el laberinto acuático de Morris, como lo indica el menor tiempo empleado en el cuadrante que contenía la plataforma durante el entrenamiento y el aumento de las latencias para cruzar la ubicación de la plataforma. Estos hallazgos sugieren que los déficits de retención son inducidos por el daño de CA3, por lo tanto, esta región del hipocampo es necesaria para la formación de la memoria de largo plazo en esta tarea (Gayoso et al., 1994).

Para conocer el papel del hipocampo se entrenó un grupo de ratas en la tarea de El. La retención se probó a los 30 min o 24 h después del entrenamiento. El grupo evaluado 30 min después del entrenamiento de El mostró poca o ninguna disminución en el rendimiento, mientras que el grupo probado a las 24 h mostró disminuciones marcadas en el rendimiento, estos datos apoyan la idea de que el hipocampo está involucrado en la consolidación o recuperación de información relacionada con estos procedimientos (Martínez et al., 2002).

## 2.5. Reactividad ante un estímulo estresante

Un considerable número de investigaciones han demostrado que las ratas, aunque sean idénticas en sexo, cepa, edad y condiciones de alojamiento, pueden diferir considerablemente en términos de comportamiento y fisiología. Estas diferencias individuales pueden ser bastante estables y pueden detectarse mediante pruebas de comportamiento (Borta & Schwarting, 2005). Tales diferencias de comportamiento pueden estar relacionadas con diferencias neuronales, bioquímicas y genéticas (Rex et al., 1999; Schwarting & Pawlak, 2004). Se considera el grado de activación del comportamiento en una tarea para clasificar a los animales de una población determinada en dos grupos, uno con actividad o respuesta alta y otro con una respuesta baja.

Para comprender la naturaleza y las causas de la variabilidad y resiliencia del miedo, Bush et al. (2007) separaron ratas Sprague-Dawley en fenotipos de alta y baja reactividad, y de recuperación rápida y lenta, basados en los niveles de congelación durante el condicionamiento del miedo y la extinción, respectivamente. Pruebas posteriores revelaron diferencias estables en ambas medidas, lo que indica que las respuestas de miedo reflejan fenotipos similares a rasgos en animales exogámicos. Resultados similares han mostrado los estudios realizados por Borta y Schwarting (2005) en esta tarea.

La cría selectiva de ratas Long-Evans para un aprendizaje de evitación bueno y malo dio como resultado cepas de Syracuse que difieren notablemente en los fenotipos seleccionados. Estos fenotipos tienen muchos rasgos asociados, por lo que se examinó: emocionalidad a través de la medición de la defecación en campo abierto, el condicionamiento del miedo, el entrenamiento de evitación pasiva, peso de las glándulas adrenales y concentración adrenal de CORT. Específicamente, los animales de la cepa de evitación baja son más emocionales, muestran un mayor condicionamiento al miedo, exhiben un aprendizaje de evitación pasiva más rápido y tienen glándulas suprarrenales más grandes así mismo, los niveles de CORT suprarrenal son más bajos que los de la cepa de evitación alta (Brush et al., 1999).

En 1989 Walker et al., examinaron la activación del eje HHA en dos líneas de

ratas, las ratas romanas de evitación alta (RHA) y de evitación baja (RLA) conocidas por ser emocionalmente diferentes. Estas ratas se seleccionaron para la adquisición rápida de una respuesta de evitación condicionada (RHA) en comparación con la imposibilidad de adquirir esta respuesta (RLA). En este estudio se examinó la respuesta endocrina (ACTH y CORT) de ratas RLA y RHA expuestas a dos tipos de estrés: en una prueba de campo abierto durante 10 min o la exposición a vapores de éter durante tres minutos. Las concentraciones plasmáticas basales de ACTH fueron más bajas en ratas RLA que en ratas RHA, pero los valores absolutos de ACTH alcanzados después de ambos tipos de estrés fueron semejantes entre las RLA y las RHA. La cantidad de CORT en plasma en condiciones de reposo no fue diferente entre las ratas RLA y RHA. La CORT plasmática fue mayor en las RLA después del estrés en la prueba de campo abierto, mientras que no se observaron diferencias entre las ratas RLA y RHA después del estrés producido por vapores de éter ni por choques eléctricos en las patas (Gentsch et al. 1982). Se observaron diferencias adicionales a nivel hipofisario, ya que la población del GR en las ratas RHA fue mayor que en ratas RLA. De manera similar, la población de los MR del hipocampo fue mayor en ratas RHA.

En 1982, Gentsch et al. encontraron una diferencia significativa en la concentración de CORT en condiciones basales entre las ratas RLA y RHA, mientras que en otros estudios no se observaron dichas diferencias (Aubry et al., 1995; Walker et al., 1989). Sin embargo, datos obtenidos por Steimer & Discroll (2003) indican que esta diferencia depende de la hora en la que se tomó la muestra, ya que no se encontraron diferencias significativas para CORT plasmática más alta en las ratas RLA cuando se tomaron muestras de sangre entre las 08:00 y las 09:00 h, pero fue significativa cuando se tomaron entre 19:00 y 20:00 h, es decir, cerca del pico del ritmo circadiano de la CORT plasmática.

Diversos estudios a lo largo de los años en estas dos líneas de ratas han encontrado que las ratas RLA muestran un aumento de las respuestas al estrés (por ejemplo, comportamiento de congelación, secreción de ACTH, CORT y prolactina) y adoptan un estilo de afrontamiento más pasivo (o reactivo) cuando

se enfrentan a un entorno nuevo. Por el contrario, las ratas RHA responden menos al estrés, muestran poca ansiedad en situaciones novedosas y tienden a ser impulsivas y buscadoras de novedades (sensaciones). Algunas diferencias de comportamiento ya se notan poco después del nacimiento, pero el patrón completo parece estabilizarse solo después de la pubertad.

Las interacciones gen-ambiente son críticas para establecer este patrón. Los datos revisados indican que las diferencias entre las RHA y RLA probablemente sean el resultado de una interacción compleja entre características divergentes de ansiedad o emocionalidad, diferencias en la actividad locomotora y búsqueda de novedades o recompensas, así como estilos de afrontamiento activos frente a pasivos (Steimer & Driscoll, 2003).

Las diferencias individuales en la sensibilidad al estrés y la capacidad para afrontar situaciones estresantes parecen ser críticas para determinar la vulnerabilidad o la resistencia a psicopatologías como la depresión y los trastornos de ansiedad en los seres humanos. En la actualidad, existen evidencias, tanto de estudios en humanos como en animales, de que estas diferencias tienen una base biológica, que involucra tantos factores genéticos como ambientales (Steimer & Driscoll, 2003).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Para poder conocer más acerca de las causas del desempeño heterogéneo de la evocación de la memoria, decidimos evaluar el papel de los GCs que ya se ha mostrado en nuestro laboratorio que participan en la modulación de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria, a través de la cuantificación de CORT en plasma y la activación del GR en las regiones CA1 y GD del hipocampo. Los estudios llevados a cabo han mostrado que se presentan diferentes patrones de activación después del entrenamiento de evitación inhibitoria cuando se evalúan las regiones del HD, por lo que ahora decidimos evaluar estos parámetros en la fase de evocación, que nos ayudaría a entender cuáles son las diferencias anatómicas o fisiológicas que influyen en la memoria y con esto entender mejor la variabilidad en la respuesta al estrés y por ende, la susceptibilidad al estrés y resiliencia.

### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

Es posible que la variabilidad encontrada en las latencias de retención de los animales entrenados en una tarea de evitación inhibitoria con una intensidad moderada de 0.5 mA pueda estar relacionada con los niveles de corticosterona y la presencia del receptor a glucocorticoides fosforilado en regiones cerebrales involucradas en la memoria, como, por ejemplo, el hipocampo dorsal.

Esto podría ser debido a la percepción del estrés al cual está sometido el animal, a factores genéticos, a factores ambientales, etc.

Por lo anterior nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Existirá un efecto bidireccional en los niveles de CORT y la activación de los GR en los animales que muestran una alta y baja evocación de la tarea EI?

## **5. HIPÓTESIS**

H1: Los sujetos con latencias altas durante la evocación de la tarea de EI presentarán:

- A) Aumento en los niveles de corticosterona en sangre.
- B) Aumento en la densidad del receptor a glucocorticoides fosforilado en el hipocampo.

H2: Los sujetos con latencias bajas durante la evocación de la tarea de EI no presentarán:

- A) Disminución en los niveles de corticosterona en sangre.
- B) Disminución en la densidad del receptor a glucocorticoides fosforilado en el hipocampo.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Relacionar la ejecución de las ratas en la evocación de la tarea de EI con los niveles de corticosterona en sangre y la presencia del GR fosforilado en el hipocampo dorsal.

### **6.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Medir las concentraciones séricas de corticosterona después de la evocación de los animales entrenados en evitación inhibitoria.
- Medir la presencia del GR en su variante fosforilada pSer211 en el hipocampo dorsal después de la evocación de ratas entrenadas en evitación inhibitoria.
- Analizar el peso corporal y el peso de las glándulas adrenales de las ratas entrenadas en evitación inhibitoria.

## 7. MÉTODO

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

### 7.1. Sujetos

Se utilizaron 65 ratas macho de la cepa Wistar (*Ratus norvegicus albinus*) con un peso inicial de 250 a 350 g, que se mantuvieron individualmente en cajas acrílicas, con libre acceso al alimento y al agua, en un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 h (luz encendida a las 07:00 h) y a temperatura constante de  $21 \pm 1$  °C.

### 7.2. Tarea de evitación inhibitoria

Para entrenar a las ratas en la tarea de evitación inhibitoria se utilizó una cámara que consiste en una caja (60 cm de largo, 25 cm de profundidad y 25 cm de ancho) con dos compartimientos del mismo tamaño (30 x 30 cm cada uno) separados por una puerta deslizable, dicha cámara está construida de acrílico rojo transparente. Un compartimiento llamado “de seguridad” está iluminado (por luz incandescente) y tiene una rejilla metálica en el piso con espacios de 16 mm. El otro compartimiento “de castigo” es oscuro y las paredes laterales son en forma de “V”, de acero inoxidable, las cuales llegan al piso del compartimiento (justo a la mitad del compartimiento) y tienen una distancia entre ellas de 15 mm. Estas láminas son electrificadas por un estimulador de corriente constante (Coulborne). La duración de la aplicación del estímulo, las latencias de adquisición y de retención fueron medidas automáticamente con la ayuda de un cronómetro digital automático Schneider Electric S486.

Para las sesiones de entrenamiento el experimento se llevó a cabo durante el ciclo de iluminación (07:00-19:00 hrs), a partir de las 8:00 h hasta las 15:00 h

para evitar variaciones por los ciclos de producción de hormonas glucocorticoides. La rata se colocó en el compartimiento seguro, con la vista opuesta a la portezuela, se cerró la cámara y se dejaron pasar 10 s, lo que permitía a la rata explorar el lugar, la puerta deslizante se abrió manualmente, para ceder el paso de la rata al compartimiento de castigo. Una vez que la rata posaba sus cuatro patas en la placa metálica del compartimiento, se procedió a administrar el choque eléctrico con una intensidad de 0.5 mA, una duración de 1 s, un voltaje de 100 V y una frecuencia de 10 pulsos por segundo. El tiempo en segundos transcurrido para que esto sucediera se registró como latencia de adquisición, además se observó y registró la conducta que presentaba el sujeto al recibir el estímulo. Al terminar la sesión de cada individuo, la cámara se limpió con una solución de alcohol al 10% para eliminar desechos fecales, orina, pelos y otras sustancias que pudiesen alterar la respuesta del siguiente sujeto. La prueba de retención se realizó en algunos grupos a las 48 h del entrenamiento y en otros a los 30 min. Se desarrolló de la misma manera que el entrenamiento; se colocó a la rata en el compartimiento seguro, 10 s después se le permitió el paso al otro compartimiento, pero en esta sesión no se le administró el choque eléctrico. Se registró la latencia de retención, es decir los segundos que tardó en animal en pasar al otro lado, con un máximo de 600 s, si después de ese tiempo no pasaba la rata, se daba por terminada la sesión.

### 7.3. Estrategia experimental

Las ratas llegaron del bioterio del Instituto de Neurobiología al bioterio del laboratorio y permanecieron por lo menos tres días en su habitación individual antes de iniciar el protocolo experimental. Para los procedimientos conductuales las ratas fueron movidas de manera individual del bioterio del laboratorio a estantes en una sala adyacente al área de trabajo, una hora antes de iniciar cada sesión y una hora posterior a ésta, y se retornaron al bioterio del laboratorio. Antes de iniciar el entrenamiento las ratas fueron manipuladas en tres sesiones que se realizaron en días consecutivos, durante cinco minutos cada día (Figura 6). Se utilizaron tres grupos control, el grupo de sólo manipulación (SM), donde

las ratas recibieron únicamente las sesiones de manipulación, el grupo de 0.0 mA, en el que las ratas siguieron el protocolo de entrenamiento sin recibir el choque eléctrico, y el grupo de solo choque (SC), en el cual las ratas se mantuvieron en el bioterio hasta el día del entrenamiento y ese día se colocaron directamente en el compartimento oscuro y recibieron el choque eléctrico. Los grupos experimentales fueron entrenados con la intensidad de 0.5 mA como ya se describió. Los diferentes grupos fueron subdivididos para realizar la cuantificación de GR y de los niveles de CORT. Las ratas utilizadas fueron distribuidas aleatoriamente como se muestra en la Tabla 1.

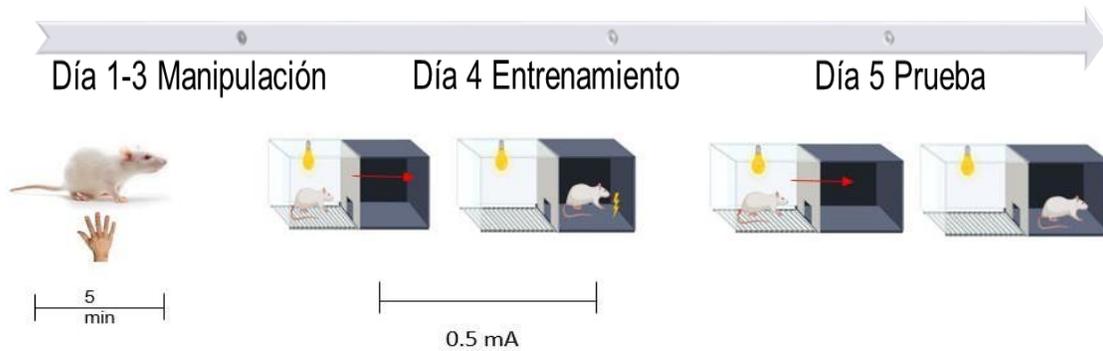


Figura 6. Temporalidad del experimento.

Tabla. 1. Diseño de grupos. Se muestran los diferentes grupos y las mediciones realizadas.

Grupos y Tratamientos			
Grupo	Número de animales para cada experimento		
	EI	GR fosforilado	CORT
Sólo manipulación (SM)	N/A	4	7
0.0 mA	11	4	7
Sólo choque (SC)	7	--	7
0.5 mA Retención 48hrs	22	8	14
0.5 mA Retención 30 min	24	--	14

#### 7.4. Obtención de muestras

Las ratas se sacrificaron por el método de decapitación 15 min después de la prueba de retención, se extrajo la sangre para realizar la cuantificación de CORT en suero. Otro grupo de ratas se sacrificaron una hora después de la prueba de retención y se extrajeron los cerebros para después realizar la cuantificación de GR.

#### 7.5. Cuantificación de corticosterona

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). 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 µL 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. El anticuerpo del kit utilizado presenta reactividad cruzada con corticosterona (100 %), deoxicorticosterona (28.6 %) y progesterona (1.7 %), así como con otros compuestos (<1 %).

#### 7.6. Semicuantificación de los niveles de GR fosforilado

Los animales se sacrificaron una hora 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  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior procesamiento por inmunohistoquímica.

### Inmunohistoquímica

Para la obtención de las rebanadas de HD 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 de cerebros de rata, donde se obtuvo el bloque que contenía la porción del HD utilizando las coordenadas del atlas de coordenadas estereotaxicas para su obtención. Estos bloques se cortaron en rebanadas más delgadas de  $16\text{ }\mu\text{m}$  de espesor. Los tres cortes seriados de cada animal 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 4.38g, pH 7.6) cinco veces durante cinco min y después se expusieron los epítopes 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 cinco veces durante cinco min y se incubaron con la solución bloqueadora (BIO-RAD) al 5 % en TBS durante dos horas. Al terminar, los cortes se lavaron con TTBS al (Tritón al 0.1 %, pH 7.6) cinco veces durante cinco minutos.

Para la detección de GR pSer232 se utilizó el anticuerpo primario Phospho GR (Ser 211) (Cell Signaling technology; Danvers, MA, EUA). Los anticuerpos se prepararon, por separado, en una solución con TTBS y solución bloqueadora al 1 %, diluidos de la siguiente manera: 1:200 para pSer232. Se hicieron incubaciones en cortes seriados de cada área cerebral, de forma que un corte se incubó con el anticuerpo anti pSer232. La incubación de las laminillas se realizó durante toda una noche (12 h aproximadamente) a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  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 al fluoróforo diluidos en TTBS y solución bloqueadora al 1 % con una dilución 1:5000. Después las laminillas se lavaron tres veces con TBS. Para marcar los núcleos celulares, las muestras se incubaron con PI 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 780 utilizando los láseres de longitud de onda de excitación de 650 nm para Cy3, 500 nm para FITC y 358 nm para yoduro de propidio. Se obtuvieron micrografías (40X) de tres campos diferentes de CA1, y del GD, siempre utilizando los mismos parámetros del microscopio. El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa ImageJ donde se obtuvieron de manera automática las densidades integradas de la señal para el pGR Ser211 exclusivamente de localización nuclear. Como control negativo de especificidad utilizamos cortes de HD en los cuales se siguió el mismo protocolo para los grupos utilizados en donde el anticuerpo primario no fue añadido.

### 7.7 Análisis estadístico

Las variables independientes que se analizaron fueron la latencia de adquisición y la latencia de retención. Ambas tuvieron un corte arbitrario, la latencia de adquisición a los 50 s y la latencia de retención a los 600 s, razón por la que se utilizaron pruebas no paramétricas para hacer las comparaciones. Para comparar múltiples grupos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Dunn. Para la comparación de las concentraciones en suero de CORT se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguida de la prueba de Tukey. La presencia de células inmunoreactivas se analizó con la prueba Wilcoxon de una muestra. Todas las pruebas se realizaron con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ . Se utilizó el paquete estadístico GraphPad 5.0.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Efecto del entrenamiento de evitación inhibitoria

Para poder conocer el efecto global del entrenamiento con una intensidad de 0.5 mA analizamos las latencias de entrada durante el entrenamiento y la prueba de retención de estos animales (Figura 7). Las latencias de entrada durante el entrenamiento de todas las ratas fueron menores a 50 s (que fue el tiempo de corte establecido), mientras que en la prueba de evocación observamos que el 43.75% de las ratas tuvieron latencias menores a 60 s, 12.5% latencias menores a 140 s, 12.5% latencias menores a 500 s, y 31.25% latencias de 600 s.

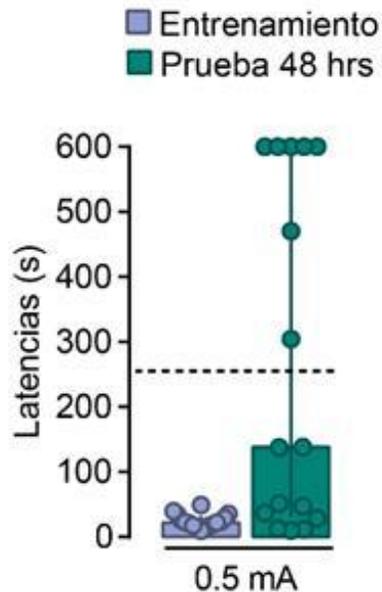


Figura 7. Latencias de entrada de la ejecución de los sujetos en la tarea de E.I., en el entrenamiento y la prueba (48 horas después del entrenamiento). Los datos se expresan en medianas (rangos intercuantiles)  $n= 16$ . La línea punteada representa la media de las latencias durante la prueba de retención.

Debido a la variabilidad de los datos obtenidos ante el mismo estímulo (choque eléctrico en las patas de 0.5 mA) durante la prueba de retención, se realizó un histograma para conocer la distribución y dispersión de las latencias de las ratas (Figura 8). Los resultados muestran que la distribución de los datos no es normal, y los valores se distribuyen en los extremos. Consideramos la media de los datos

(265.5) para separar a las ratas de acuerdo con su desempeño, los que tuvieron valores por encima de la media se consideraron de retención alta y los que tuvieron valores de latencia por debajo como de retención baja.

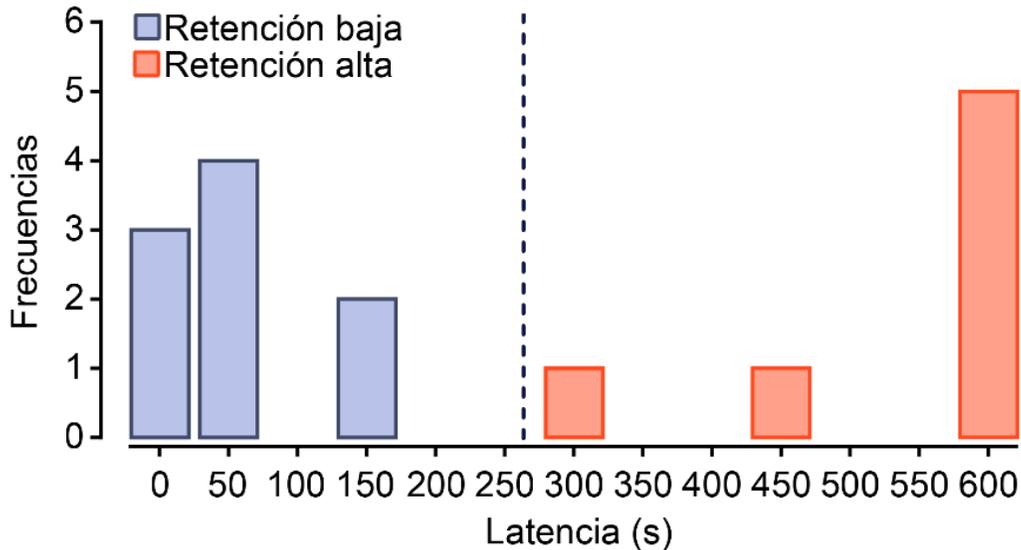


Figura 8. Histograma de distribución de las latencias en la prueba de retención, la mediana de los datos (265.5) secciona a los sujetos en aquellos que demostraron una retención baja y una retención alta.

Cuando se analizaron las latencias de los grupos de retención alta y baja, además del grupo control de 0.0 mA durante la prueba de retención (Figura 9), que se realizó 48 h después del entrenamiento, la prueba estadística de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre los grupos ( $H(2) = 22.67$ ;  $p = 0.0001$ ) mientras que la *post hoc* de Dunn mostró que el grupo de retención alta (mediana=600) fue significativamente diferente con respecto al grupo de 0.0 mA (mediana=16.6) ( $p = 0.0006$ ) y el grupo de retención baja (mediana=36.6) ( $p = 0.0002$ ) mostrando mayores latencias de retención durante la prueba. Estos resultados comprueban estadísticamente que los animales que se consideraron de retención alta efectivamente tuvieron latencias de retención más altas que los de retención baja, por lo tanto, estos animales recordaron mejor el evento aversivo que el grupo de retención baja.

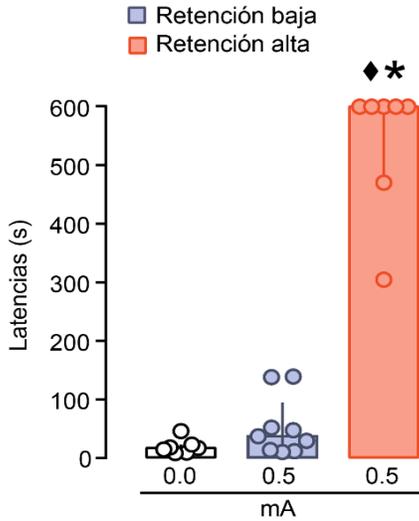


Figura 9. Latencias de la ejecución de los sujetos en la tarea de E.I., en la prueba de retención (48 horas después del entrenamiento), separadas en retención alta o baja. Los datos se expresan en medianas (rangos intercuantiles)  $n= 16$ . \* retención alta contra con el grupo de 0.0 mA ( $p < 0.0001$ ),  $\blacklozenge$  vs el grupo retención baja.

prueba de retención no se debían a la adquisición de la tarea, se compararon las latencias de entrada en los mismos grupos experimentales (Figura 10), la prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre los grupos ( $H(2) = 0.1608$ ;  $p = 0.9228$ ), estos resultados nos sugieren que estos animales no presentaron alteraciones motoras o visuales durante la adquisición de la tarea.

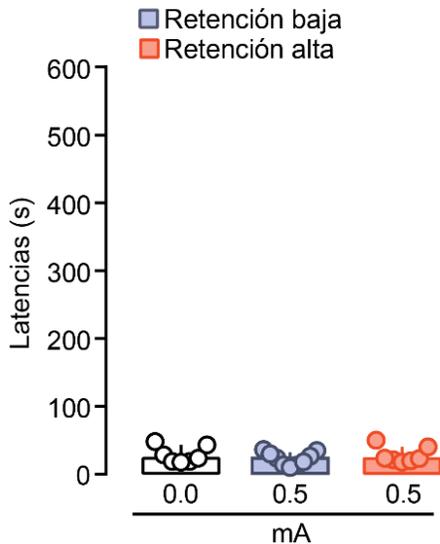


Figura 10. Latencias de la ejecución de los sujetos en la tarea de E.I., en el entrenamiento, separadas en retención alta o baja. Los datos se expresan en medianas (rangos intercuantiles)  $n= 16$ .

## 8.2. Medición de los niveles de corticosterona en suero

Para conocer si la diferencia en la retención de los animales entrenados con 0.5 mA, que se muestra en la figura 9, se debe en parte a una discrepancia en los niveles de CORT, ya que se ha demostrado que hay una relación directamente proporcional entre los niveles de CORT en suero y el grado de retención, se obtuvo la sangre de los animales 15 min después de iniciar la prueba de retención y se midió la concentración de la hormona en suero por el método de ELISA (Figura 11). La prueba ANOVA de una vía mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F(4, 30) = 15.91$ ), que incluyó los grupos de retención alta y baja, además de los grupos control de sólo manipulación (SM), sólo choque (SC) y 0.0 mA. La prueba post hoc de Tukey indicó diferencias significativas entre el grupo de retención alta debido al aumento del nivel de CORT en suero con respecto al grupo de retención baja (237.86%;  $p < 0.0001$ ), el grupo de 0.0 (221.22 %;  $p < 0.0002$ ), el grupo de solo choque (728.8%;  $p < 0.0001$ ), y el grupo de solo manipulación (2554.5 %;  $p < 0.0001$ ), estos datos mostraron que efectivamente existe una relación entre el nivel de CORT y el desempeño en la prueba de retención. Encontramos niveles bajos de la hormona en los grupos de animales que sólo fueron manipulados (SM) al igual que en el grupo de animales que no recibieron el choque es decir de 0.0 mA y el grupo de sólo choque (SC), con estos datos podemos inferir que la exposición a la cámara de condicionamiento (grupo de 0.0 mA), el choque per se (recibido el día de entrenamiento, grupo SC) y la manipulación de los animales (grupo SM) no son estímulos estresantes para los animales en la prueba de evocación, ya que no hubo diferencias significativas entre los grupos.

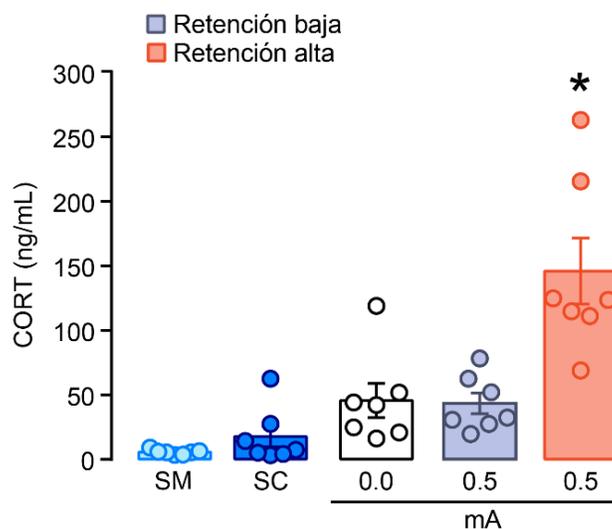


Figura 11. Concentración de CORT en suero después de la prueba de retención (48 horas después del entrenamiento) de ratas entrenadas con 0.5 en E.I. La sangre se obtuvo 15 min después de entrar a la cámara. Los datos se expresan en medias  $\pm$  EE.  $n=35$ . \* vs todos los grupos  $p < 0.0001$ .

### 8.3. Peso corporal y peso total de las glándulas adrenales

Para conocer si hay una diferencia anatómica entre los animales entrenados con 0.5 mA de retención alta y baja, que se considera una de las posibles causas en la variabilidad de la respuesta conductual, se obtuvieron el peso corporal de los animales un día antes del entrenamiento en E.I. y el peso de las glándulas suprarrenales después de la prueba de retención de los animales de los que se obtuvo la sangre para la cuantificación de CORT, incluyendo los grupos control (Figura 12). La prueba ANOVA de una vía no mostró diferencias significativas en el peso corporal de las ratas ( $F(4, 32) = 0.6585$ ), así como tampoco se encontraron diferencias significativas en el peso total de las glándulas suprarrenales entre los grupos experimentales ( $F(4, 29) = 0.2152$ ). Por lo tanto, podemos inferir que la diferencia en la secreción de CORT entre el grupo de retención alta y baja no está relacionada con el peso corporal ni con el peso de las glándulas adrenales.

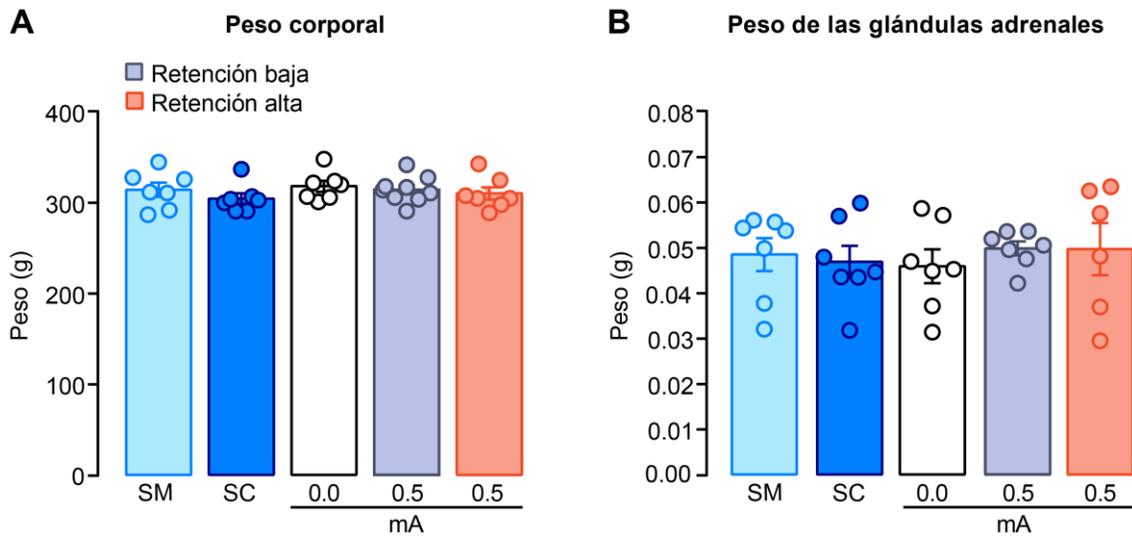


Figura 12. Peso corporal y peso total de las glándulas adrenales de los animales entrenados en la tarea de EI. Los datos se expresan en medias  $\pm$  EE.  $n=35$ .

#### 8.4. Análisis de inmunofluorescencia del GR fosforilado en la serina 211

Para conocer la presencia del pGR ser 232 en las regiones CA1 y GD en el HD se hicieron inmunofluorescencias en rebanadas seriadas del cerebro, donde se obtuvo la media de la densidad integrada de la inmunoreactividad del pGR ser232 nuclear (Figura 13), los datos fueron normalizados con respecto al grupo control de sólo manipulación (línea punteada). La prueba Wilcoxon de una muestra no mostró diferencias significativas entre la media teórica, que representó al grupo control de sólo manipulación, con respecto al grupo de retención alta, ni con los demás grupos experimentales. Por lo tanto, el grupo de retención alta no tuvo aumento en la activación del pGR ser211, al menos en las regiones CA1 y GD del HD.

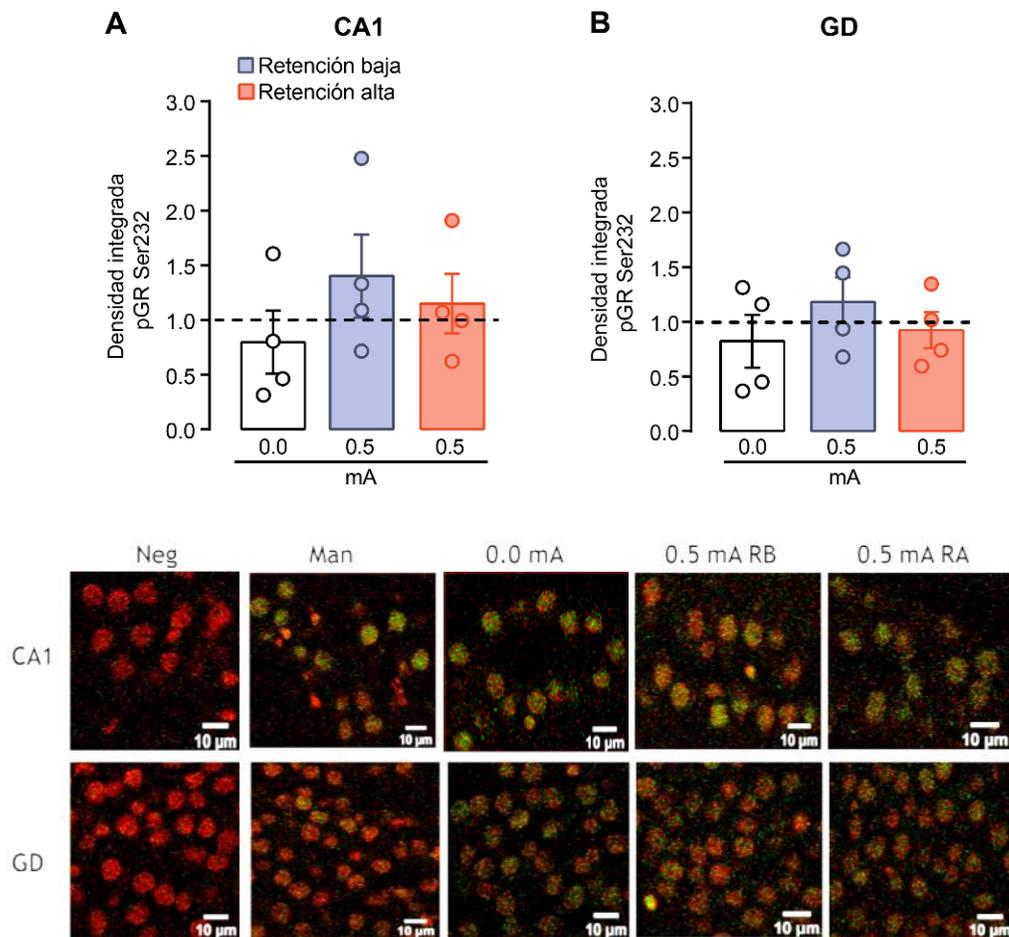


Figura 13. Medias ( $\pm$  EE) de la densidad integrada de la señal para pGRser232 medida 60 min después de la prueba de retención en la región **A**. CA1 y **B**. en GD del hipocampo dorsal. Los datos fueron normalizados con respecto al grupo control de manipulación (línea punteada).  $n=4$  para todos los grupos. **C**. Microfotografías representativas de los grupos en las regiones CA1 y GD, con la señal para el pGRser232 mostrado en verde y los núcleos teñidos con IP mostrados en rojo.

### 8.5. Efecto del entrenamiento en la memoria de corto plazo

Para conocer si el efecto del entrenamiento con 0.5 mA se replica cuando se evalúa la memoria de corto plazo, se entrenó un grupo independiente de animales con 0.5 mA y se realizó la prueba de evocación 30 min después del entrenamiento y posteriormente a las 48 horas para obtener las latencias de retención. Las latencias de la prueba realizadas a los 30 min muestran nuevamente que hay ratas que presentan retención baja o alta como se obtuvieron en la prueba de memoria de largo plazo (Figura 14), por lo que el

efecto del entrenamiento se observa tanto en la memoria de corto plazo como en la de largo plazo.

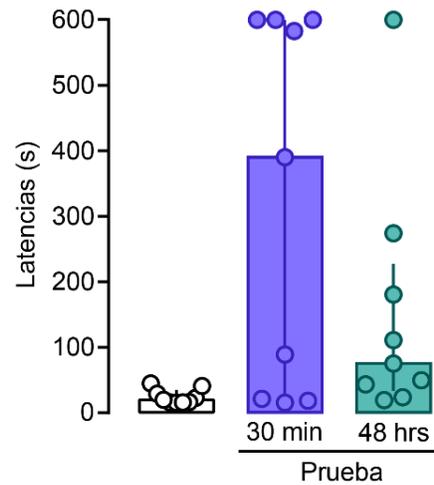


Figura 14. Latencias de entrada de la ejecución de los sujetos en la tarea de E.I., en el entrenamiento y la prueba (48 horas después del entrenamiento). Los datos se expresan en medianas (rangos intercuartiles)  $n=9$ .

#### 8.6. Medición de los niveles de corticosterona de la memoria de corto plazo

Para evaluar si los niveles de CORT se relacionaban con la retención evaluada ahora a corto plazo (30 min) se entrenó a un grupo independiente de ratas ( $n=14$ ) y se sacrificaron a los animales 15 minutos después de la prueba de evocación y se midió la concentración de la hormona en suero por el método de ELISA (Figura 15). Las ratas fueron nuevamente separadas considerando la media de los datos (210.2) de acuerdo con su desempeño en la prueba de retención, las que tuvieron valores por encima de la media se consideraron de retención alta y las que tuvieron valores de latencia por debajo como de retención baja, además de que se agregó el grupo control de 0.0 mA. La prueba ANOVA de una vía mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F(2, 18=)$ ), no habiendo entonces relación entre la cantidad de la hormona y su desempeño en la prueba de retención. Adicionalmente se muestran las latencias de retención y de entrenamiento de este grupo independiente de animales.

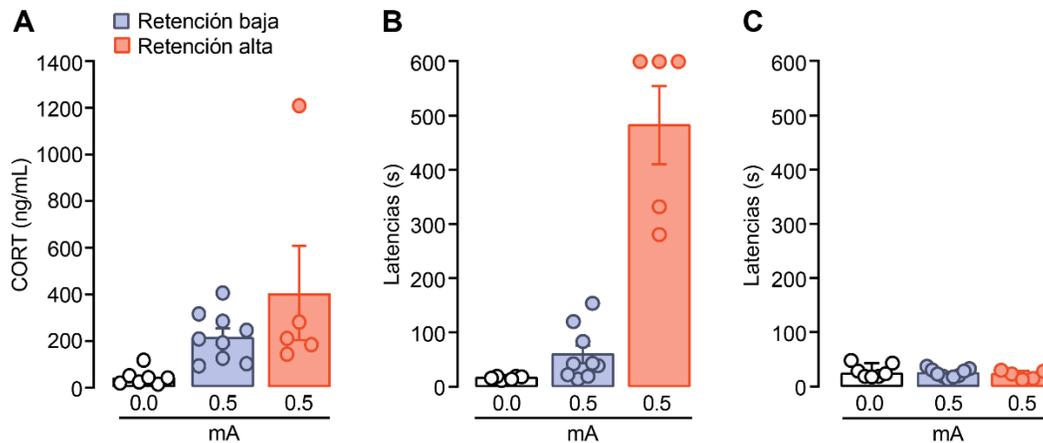


Figura 15. Concentración de CORT en suero de ratas después de la prueba de retención (30 min después del entrenamiento) de ratas entrenadas con 0.5 en E.I. La sangre se obtuvo 15 min después de entrar a la cámara. Los datos se expresan en medias  $\pm$  EE.  $n=21$ . \* vs todos los grupos;

## 9. DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que las ratas macho de 3 meses de edad de la cepa Wistar utilizadas en este estudio, que son manejadas y entrenadas bajo las mismas condiciones, responden de manera diferente al mismo tipo de estímulo aversivo, en la tarea de evitación inhibitoria, ya que al evaluar sus latencias en la prueba de retención podemos distinguir dos tipos de respuesta: alta y baja. Estos resultados concuerdan con lo previamente reportado en algunas investigaciones que han mostrado que las ratas, aunque idénticas en cepa, sexo, edad y condiciones de alojamiento, pueden diferir considerablemente en términos de comportamiento y fisiología tanto en la tarea de EI como en la de condicionamiento de miedo al utilizar una intensidad similar en el choque (0.4 y 0.5 mA) (Bush et al., 2007; Carreira et al., 2017; Steimer & Driscoll, 2003).

Las diferencias interindividuales en la actividad fisiológica que presenta cada rata pudieran estar influyendo en su desempeño en la prueba de retención de la memoria, una posible explicación para estos resultados es que esta respuesta heterogénea se debe a diferencias neuroquímicas y funcionales entre las ratas de retención baja y alta. Suficiente evidencia muestra que las ratas de líneas seleccionadas y llamadas de evitación baja (RLA) y alta (RHA), conocidas por

ser emocionalmente diferentes, difieren en las características y funcionalidad del eje hipotálamo-hipofisis-adrenal, ya que se ha encontrado que las concentraciones de CORT plasmáticas, cantidad de GR en la hipófisis y concentración de ACTH ante eventos estresantes son diferentes, además de discrepar en el peso de la hipófisis (Steimer & Driscoll, 2005; Steimer et al., 1998; Walker et al., 1989). Cabe aclarar que, aunque las mediciones de las hormonas se realizaron después de una exposición al estrés, ninguna medición se realizó después de una tarea conductual aversiva, pero estos datos nos proporcionan una noción de cómo es la respuesta fisiológica de estos animales ante dicho estrés y cómo estas variaciones podrían estar influyendo en el comportamiento de estos animales.

Posteriormente al evaluar la concentración de CORT en plasma después de la evocación encontramos que como se ha descrito en EI y condicionamiento de miedo el grado de retención de la tarea está relacionada con el grado secreción de CORT (Cordero et al., 1998; Sandi & Rose., 1997; Ponce-Lina.,2020) ya que el grupo de retención alta mostró un aumento significativo de esta hormona con respecto al grupo de retención baja y los grupos control. Es importante mencionar que en estos trabajos se utilizaron diferentes intensidades de choque que provocaron diferentes grados de retención, en donde se observó que a mayor intensidad de choque había un mayor grado de retención, en cambio en este trabajo se ha utilizado la misma intensidad de choque, 0.5 mA, y encontramos diferencias en el grado de retención y de secreción de CORT.

Para poder conocer los procesos que podrían estar relacionados con la respuesta diferencial Walker et al, 1989 evaluaron el eje hipofisis-adrenal de las ratas RLA y RHA, que fueron seleccionadas de acuerdo con su comportamiento diferencial en la tarea de evitación activa y presentan marcadas diferencias en este eje. Las ratas RLA son menos activas y tienen secreciones de CORT y aldosteronas más altas después de la exposición al estrés (que fue la exposición a un nuevo ambiente) que las ratas RHA. Por otra parte, Gentsch et al.,1982 evaluaron estas hormonas en condiciones basales y utilizando diferentes tipos de estresores, divididos en “débiles” en donde se realizó una inyección

intraperitoneal y la exposición a un nuevo ambiente además de estresores “intensos” como estrés por inmovilización, por vapores de éter y choques eléctricos en las patas, donde encontraron mayor secreción de CORT en las ratas RLA tanto en condiciones basales como cuando se utilizaron estresores “débiles” en comparación con las ratas RHA. Como podemos observar estos dos grupos de ratas muestran una diferencia en las concentraciones de CORT, como lo observamos en nuestra investigación, lo que nos indica que probablemente la diferencia entre estos dos grupos está dada por una respuesta fisiológica al estrés diferencial. Es relevante considerar que en este estudio no se encontraron diferencias en la concentración de CORT después del choque eléctrico entre los dos grupos de ratas, que es de vital interés en este estudio, pero debemos tomar en cuenta que en este caso podría ser debido a la intensidad del evento, ya que se dieron choques eléctricos cada 30 s durante 10 min, y se haya presentado un posible efecto de techo, y por este motivo no se encontraron diferencias, además de que podría haber diferencias entre estos dos grupos en minutos posteriores a los cinco minutos, que fue el tiempo en la que se realizó la medición de la CORT después de la exposición de los animales a los choques, ya que se ha mostrado que el nivel máximo de CORT en plasma ocurre aproximadamente a los 15 minutos después de presentarse el estresor (Muir & Pfister, 1987) y que esto se deba a la diferencia temporal en el retorno a los niveles de secreción basales. Debido a estos resultados consideramos que para poder entender mejor el mecanismo que subyace a esta respuesta diferencial se deberían adicionar mediciones de la concentración de CORT en plasma de nuestros dos grupos experimentales, tanto en su estado basal como a diferentes tiempos después de la prueba de retención (recuerdo del evento estresante).

Por otro lado, debido a que muchas de las consecuencias conductuales del estrés están mediadas por la activación del GR, que es producida por el aumento significativo de los niveles de CORT, y que se genera a través de la fosforilación, donde la fosforilación del GR puede determinar la especificidad del promotor objetivo, la interacción del cofactor, la fuerza y duración de la señalización del receptor y la estabilidad del receptor (Garabedian et al., 1998), decidimos evaluar

su activación a través de la presencia del GR fosforilado en la Ser 211, que es uno de los cuatro sitios principales de activación del receptor, en donde una mayor cantidad de serina 211 fosforilada (pSer211) induce la activación y translocación nuclear del receptor y aumenta su actividad transcripcional (Adzic et al., 2009; Rogatsky et al., 1998; Wang et al., 2002). Por lo que decidimos evaluar la presencia del pGR Ser211 en el hipocampo, ya que se ha observado que tiene un papel importante en la consolidación y evocación de información aprendida (Alvarez & Squire., 1994, Hasselmo, 1999 y Ramos, 2000), ya que se ha mostrado que si el hipocampo se inactiva temporalmente antes de una prueba de memoria espacial, la evocación se ve afectada (Riedel et al., 1999), centrándonos en la región dorsal, que se asocia con el procesamiento de la información espacial o contextual (Andersen et al., 2007), específicamente en las regiones CA1 y GD del HD ya que se ha mostrado que están involucradas críticamente en la formación, consolidación y evocación de recuerdos dependientes del hipocampo (Bartsch et al., 2011 y Hamilton & Rhodes, 2015). No se encontraron diferencias significativas entre el grupo de retención alta y el grupo de sólo manipulación que fue nuestro grupo control, a pesar del aumento de la CORT en plasma del grupo de retención alta, lo cual es consistente con lo ya reportado previamente en nuestro laboratorio en donde el entrenamiento en la tarea de CMC no produjo cambios en la presencia del pGR Ser 211 en estas regiones del HD (Ponce-Lina., 2020) y con lo reportado en EI que sólo la intensidad de 2.0 mA produce aumento en la presencia del receptor en la región CA1 del HD (art por publicar), aunque estas evaluaciones se realizaron después de la adquisición de la tarea, nos provee información acerca de cuáles son las condiciones que producen la activación del receptor en esta serina durante la adquisición y consolidación de la memoria. 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). Además, es importante considerar que en un trabajo

en donde se utilizó un modelo de ratas adrenalectomizadas, la inyección de CORT 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). Con estos datos podemos inferir que la cantidad de CORT secretada después de la evocación por el grupo de retención alta quizá no fue la suficiente para activar el GR en estas dos regiones del HD.

Las 11 $\beta$  hidroxisteroides deshidrogenasas 11 $\beta$ -HSD1 y 11 $\beta$ -HSD2 catalizan la regeneración e inactivación de los GCs, las 11 $\beta$ -HSD1 cataliza la reducción de 11-dehidrocorticosterona (11-HDC) en corticosterona y las 11 $\beta$ -HSD2 catalizan la oxidación que produce la reacción a la inversa (Bush et al., 1968, Rusvai and Naray-Fejes-Toth, 1993, Monder and White, 1993). La 11 $\beta$ -HSD1 utiliza NADP(H) y la 11 $\beta$ -HSD2 requiere NAD como cofactor (Tomlinson et al., 2005, White et al., 1997, Morris et al., 2003). Estudios en roedores han demostrado que la 11 $\beta$ -HSD1 se expresa principalmente en el cerebelo, el hipocampo, la corteza y la hipófisis (Seckl, 1997), por lo que se podría sugerir su participación en procesos de memoria y aprendizaje. La 11 $\beta$ -HSD2 se expresa en gran medida en los tejidos fetales, incluido el cerebro y la placenta, en el cerebro adulto se han encontrado niveles moderados de ARNm de 11 $\beta$ -HSD2 en células específicas dispersas de los núcleos ventromedial y PVN del hipotálamo, la amígdala, el locus coeruleus, y el núcleo del tracto solitario (NTS) (Roland et al., 1995; Robson et al., 1998). Se ha observado que ratones knock-out para 11 $\beta$ -HSD1 muestran una retención de memoria reducida después de 24 h en la prueba de evitación pasiva (Wyrwoll, Holmes & Seckl, 2010) potencialmente como consecuencia de la reducción de la regeneración de glucocorticoides lo que podría ser una causa plausible de la memoria asociativa reducida en estos ratones, con estos datos podemos inferir que probablemente las diferencias que observamos en nuestros grupos de retención baja y alta este dada por diferencias en la enzima 11 $\beta$ -HSD1. Por otra parte, se sabe que los GR y MR juegan papeles diferenciales en el

comportamiento cognitivo. Los GR están involucrados en la consolidación de la información adquirida recientemente, mientras que los MR son esenciales para la interpretación de los estímulos ambientales y la selección de la respuesta conductual adecuada (Oitzl y de Kloet 1992). Se ha demostrado que los MR juegan un papel esencial en la recuperación de información espacial (Khaksari et al. 2007). Recordemos que las acciones de los glucocorticoides están mediadas por dos tipos distintos de receptores intracelulares, los MR y GR. Los MR tienen una afinidad 10 veces mayor por la corticosterona y están casi saturados en condiciones basales (De Kloet et al. 1998). Estos dos tipos de receptores también tienen distribuciones claramente diferentes en el cerebro. Los GR se expresan ampliamente en todo el cerebro, aunque el hipocampo tiene cantidades particularmente altas. Los MR están mucho más localizados que los GR. Nuevamente, el hipocampo tiene una alta concentración, mientras que la expresión es escasa en otras estructuras (De Kloet et al. 1998). Previamente en la tarea de CMC el bloqueo de MR antes de la prueba de retención reduce la expresión del miedo contextual, lo que implica que los MR, en lugar de los GR, juegan un papel importante en la recuperación de información emocional y la posterior expresión de miedo. Adicionalmente se demostró que la inyección intracerebroventricular, intrahipocampal o intraseptal de butiro lactona I, que es un inhibidor de la cdk5, que es la enzima que fosforila al GR en la ser 211 (Ramamoorthy & Cidlowski, 2016), inmediatamente antes o después del entrenamiento deteriora la consolidación del CMC, en dos cepas de ratones, mientras que inyecciones tardías post-entrenamiento o inyecciones antes de la prueba de retención de la memoria a las 24 h no afectó la retención (Fischer et al. 2002, 2003). Estos resultados sugieren que la Cdk5 puede tener un papel en las primeras etapas de la formación de la memoria, pero no en el almacenamiento de la memoria de largo plazo o la evocación de la memoria. Con esta información podemos deducir que quizá los MR tengan en parte una mayor implicación en la respuesta heterogénea de la memoria que los GR y por eso posiblemente no encontramos diferencias en la presencia del pGR Ser 232 en las regiones CA1 Y GD del HD.

Además, debemos tomar en cuenta que, en la respuesta al estrés, el nivel de varias hormonas cambia. Las reacciones al estrés están asociadas con mayor secreción de una serie de hormonas, incluidos los glucocorticoides, las catecolaminas, la hormona del crecimiento y la prolactina, cuyo efecto es aumentar la movilización de las fuentes de energía y adaptar al individuo a su nueva circunstancia. Evidencia de varios estudios indica que las catecolaminas y los glucocorticoides liberados por las glándulas suprarrenales interactúan para influir en la plasticidad neural y la consolidación de la memoria (Introini-Collison & McGaugh.,1986; Izquierdo & Dias., 1985; Liang, Julier & McGaugh, 1986), por lo que el papel de estas hormonas en la variabilidad de estos animales tiene que ser considerada.

Al evaluar el efecto del entrenamiento en la memoria a corto plazo, y encontrar esta respuesta divergente de las ratas nuevamente, nos lleva a pensar que estas diferencias podrían ser intrínsecas de cada individuo y estar reguladas por distintos factores genéticos que producirían esta respuesta diferente ante el mismo estímulo, ya que al ser evaluados a los 30 min después del entrenamiento evitamos el proceso de consolidación, por lo que podemos descartar que estas diferencias estén dadas por un procesamiento diferente de la consolidación de la memoria, en cuanto la cuantificación de la concentración de CORT y no haber encontrado diferencias significativas entre estos dos grupos de retención alta y baja, consideramos que probablemente se deba a la influencia del choque eléctrico que recibieron 30 min antes, ya que como se ha mostrado previamente en nuestro laboratorio al evaluar la concentración de CORT después del entrenamiento (15 minutos después), sólo una intensidad de choque alta (2.0 mA) produce un aumento significativo en la concentración plasmática de CORT(González-Franco et al., 2017), por lo que intensidades menores producen concentraciones similares de CORT, como lo encontramos en nuestro trabajo, lo que nos lleva a pensar que tal vez la duración de estos niveles de CORT podrían estar regulando sus diferencias en las latencias de retención, por lo que mediciones posteriores de la hormona nos ayudarían a entender mejor este proceso, porque posiblemente el tiempo que los niveles regresen a su estado

basal sea diferente entre el grupo de retención alta y baja. Estos datos nos proporcionan las primeras evidencias de la variabilidad ante la respuesta al estrés y su relación con los glucocorticoides y nos ayudarán a dirigir nuestras futuras aproximaciones a dilucidar mejor este proceso. Debido a que las respuestas endocrinas ante una experiencia estresante varían ampliamente entre los individuos y pueden explicar parte de la variabilidad individual en la vulnerabilidad al estrés. La respuesta endocrina al estrés probablemente tiene un gran componente genético, pero también se sabe que es modificable por una experiencia estresante prolongada o profunda. Estos factores pueden influir en la respuesta hipofisis-suprarrenal al estrés, por lo que nos quedan bastantes interrogantes por resolver para tener conocimiento de los procesos que subyacen estas diferencias dadas por un estímulo moderado que nos ayudará a entender las bases de las diferencias individuales y por ende la vulnerabilidad al estrés o resiliencia.

## **10. CONCLUSIONES**

- Una misma experiencia de aprendizaje (choque de 0.5 mA) puede provocar una memoria de retención baja y alta evaluada a corto y a largo plazo.
- Los niveles de CORT están relacionados con el desempeño en la prueba de retención a largo plazo, ya que sujetos con una memoria de retención alta presentaron niveles de CORT altos y sujetos con baja retención no mostraron un incremento.
- La memoria de retención de los animales entrenados con 0.5 mA no está relacionada con la activación del GR en la serina 211 en las regiones CA1 Y GD del hipocampo dorsal.

## 11. PERSPECTIVAS

Para poder descartar que estas diferencias entre las ratas se deban a la una discrepancia a la reactividad al dolor, sería ideal utilizar una prueba para investigar si las posibles diferencias pueden deberse a mecanismos de procesamiento del dolor, y que esto fuera la causa de la diferencia en la evocación. Se sabe que el comportamiento inducido por un choque eléctrico en las patas depende de múltiples parámetros, incluida la tensión de la rata, o las diferencias individuales en la percepción del dolor, la experiencia y la tolerancia. La prueba de la placa calefactora evalúa la respuesta supraespinal a los estímulos dolorosos por lo que consideramos que para posteriores aproximaciones sería la prueba adecuada para poder desestimar las diferencias en la percepción al dolor como la posible causa de esta respuesta divergente.

No podemos descartar que es posible encontrar diferencias en la presencia del GR fosforilado en otras estructuras cerebrales implicadas en esta tarea como la amígdala, el estriado y la corteza prefrontal, o en las estructuras implicadas en la regulación del eje HHA, además de que probablemente también estén implicadas las catecolaminas que también son liberadas durante un evento estresante.

## 12. REFERENCIAS

- Ader, R., & de Wied, D. (1972). Effects of lysine vasopressin on passive avoidance learning. *Psychonomic Science*, 29(1), 46-48. <https://doi.org/10.3758/BF03336564>
- Adzic, M., Djordjevic, J., Djordjevic, A., Niciforovic, A., Demonacos, C., Radojcic, 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>
- Alvarez P, Squire LR. (1994). Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19;91(15):7041-5. <https://doi: 10.1073/pnas.91.15.7041>.
- Amaral, D., & Lavenex, P. (2007). Hippocampal neuroanatomy. In P. Andersen, R. G. M. Morris, D. Amaral, T. Bliss, & J. O'Keefe (Eds.), *The hippocampus book*. (pp. 37-114). Oxford University Press.
- Anagnostaras, S. G., Gale, G. D., & Fanselow, M. S. (2001). Hippocampus and contextual fear conditioning: Recent controversies and advances. *Hippocampus*, 11(1), 8-17. [https://doi.org/10.1002/1098-1063\(2001\)11:1<8::AID-HIPO1015>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2001)11:1<8::AID-HIPO1015>3.0.CO;2-7).
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., & O'Keefe, J. (2007). Historical perspective: Proposed functions, biological characteristics, and neurobiological models of the hippocampus. In P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss, & J. O'Keefe (Eds.), *The hippocampus book*. (pp. 9-31). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195100273.003.0002>
- Aubry, J. M., Bartanusz, V., Driscoll, P., Schulz, P., Steimer, T., & Kiss, J. Z. (1995). Corticotropin-releasing factor and vasopressin mRNA levels in roman high- and low-avoidance rats: response to open-field exposure. *Neuroendocrinology*, 61(2), 89-97. <https://doi.org/10.1159/000126829>
- Bartsch T, Döhning J, Rohr A, Jansen O, Deuschl G. (2011). CA1 neurons in the human hippocampus are critical for autobiographical memory, mental time travel, and auto-noetic consciousness. *Proc Natl Acad Sci*.18;108(42):17562-7. <https://doi:10.1073/pnas.1110266108>.
- Borta, A., & Schwarting, R. K. (2005). Inhibitory avoidance, pain reactivity, and plus-maze behavior in Wistar rats with high versus low rearing activity. *Physiology & Behavior*, 84(3), 387-396. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.01.009>
- Brush, F. R., Gendron, C. M., & Isaacson, M. D. (1999). A selective genetic analysis of the Syracuse high- and low-avoidance (SHA/Bru and SLA/Bru) strains of rats (*Rattus norvegicus*). *Behavioural Brain Research*, 106(1-2), 1-11.
- Bush IE, Hunter SA, Meigs RA.(1968). Metabolism of 11-oxygenated steroids. Metabolism in vitro by preparations of liver. *Biochem J*. 107(2):239-58. <https://doi: 10.1042/bj1070239>. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(99\)00075-3](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(99)00075-3)
- Bush, D. E., Sotres-Bayon, F., & LeDoux, J. E. (2007). Individual differences in fear: isolating fear reactivity and fear recovery phenotypes. *Journal of Traumatic Stress*, 20(4), 413-422. <https://doi.org/10.1002/jts.20261>

- Carreira, M. B., Cossio, R., & Britton, G. B. (2017). Individual and sex differences in high and low responder phenotypes. *Behavioural Processes*, 136, 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.01.006>
- Chapman, K., Holmes, M., & Seckl, J. (2013). 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. *Physiological Reviews*, 93(3), 1139-1206. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2012>
- Chrousos, G. P. (1995). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 332(20), 1351-1362. <https://doi.org/10.1056/nejm199505183322008>
- Cogan, D. C., & Reeves, J. L. (1979). Passive avoidance learning in hippocampectomized rats under different shock and intertrial interval conditions. *Physiology & Behavior*, 22(6), 1115-1121. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(79\)90266-X](https://doi.org/10.1016/0031-9384(79)90266-X)
- Cohen, N. J., & Squire, L. R. (1980). Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science*, 210(4466), 207-210. <https://doi.org/10.1126/science.7414331>
- Corcoran, K.A., Maren, S.(2001). Hippocampal inactivation disrupts contextual retrieval of fear memory after extinction. *J Neurosci*, 21(5):1720-6. <https://doi:10.1523/JNEUROSCI.21-05-01720.2001>.
- Corcoran KA, Maren S.(2004). Factors regulating the effects of hippocampal inactivation on renewal of conditional fear after extinction. *Learn Mem*, 11(5):598-603. <https://doi:10.1101/lm.78704>.
- 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. *Behav Neurosci*. 112(4):885-91. <https://doi:10.1037//0735-7044.112.4.885>
- De Kloet, E. R., & Reul, J. M. H. M. (1987). Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: A concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinology*, 12(2), 83-105. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(87\)90040-0](https://doi.org/10.1016/0306-4530(87)90040-0)
- De Kloet, E.,R, Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., Joëls, M.(1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*. 19(3):269-301. <https://doi:10.1210/edrv.19.3.0331>
- Deng W, Aimone JB, Gage FH. (2011). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci*. 11(5):339-50. <https://doi.org/doi:10.1038/nrn2822>.
- De Quervain, D. J., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature*, 394(6695), 787-790. <https://doi.org/10.1038/29542>
- Dickens, M. J., Meddle, S. L., & Michael Romero, L. (2011). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor mRNA expression in the brain of translocated chukar (*Alectoris chukar*). *General and Comparative Endocrinology*, 170(3), 569-574. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.11.018>
- 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):2870-80. [https://doi: 10.1038/npp.2012.170](https://doi.org/10.1038/npp.2012.170).
- Droste, S.K., de Groot, L., Atkinson, H.C., Lightman, S.L., Reul, J.M., Linthorst, A.C.(2008). Corticosterone levels in the brain show a distinct ultradian rhythm but a delayed response to forced swim stress. *Endocrinology*. 149(7):3244-53. [https://doi: 10.1210/en.2008-0103](https://doi.org/10.1210/en.2008-0103).
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology*, 55, 51-86. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Schrick, C., Spiess, J., Radulovic, J. (2002). Cyclin-Dependent Kinase 5 is required for associative learning. *Journal of Neuroscience*, 22 (9) 3700-3707. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-09-03700.2002>.
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Schrick, C., Spiess, J., Radulovic, J. (2003). Regulation of contextual fear conditioning by baseline and inducible septo-hippocampal cyclin-dependent kinase 5. *Neuropharmacology*, 44:1089–1099. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00102-3](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00102-3)
- Flood, J. F., Vidal, D. I., Bennett, E. L., Orme, A. E., Vasquez, S., & Jarvik, M. E. (1978). Memory facilitating and anti-amnesic effects of corticosteroids. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 8(1), 81-87. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(78\)90127-2](https://doi.org/10.1016/0091-3057(78)90127-2)
- Freeman, J. H., Jr., Weible, A., Rossi, J., & Gabriel, M. (1997). Lesions of the entorhinal cortex disrupt behavioral and neuronal responses to context change during extinction of discriminative avoidance behavior. *Experimental Brain Research*, 115(3), 445-457. <https://doi.org/10.1007/pl00005714>
- Garabedian, M. J., Rogatsky, I., Hittelman, A. H., Knoblauch, R., Trowbridge, J. T., and Krstic, M. D. (1998). In *Molecular Biology of Steroid and Nuclear Hormone Receptors* (Freedman, L. P., ed) pp. 237–260, Birkhaeuser Boston, Inc., Cambridge, MA.
- Gayoso, M. J., Primo, C., Al-Majdalawi, A., Fernandez, J. M., Garrosa, M., & Iñiguez, C. (1994). Brain lesions and water-maze learning deficits after systemic administration of kainic acid to adult rats. *Brain Research*, 653(1-2), 92-100. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90376-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90376-X)
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M., & Feer, H. (1982). Behavioural comparisons between individually- and group-housed male rats: Effects of novel environments and diurnal rhythm. *Behavioural Brain Research*, 6(1), 93-100. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(82\)90084-5](https://doi.org/10.1016/0166-4328(82)90084-5)
- Good, M., Honey, R.C.(1991). Conditioning and contextual retrieval in hippocampal rats. *Behav Neurosci*, 105(4):499-509. [https://doi: 10.1037//0735-7044.105.4.499](https://doi.org/10.1037//0735-7044.105.4.499)
- Gräff J, Rei D, Guan JS, Wang WY, Seo J, Hennig KM, Nieland TJ, Fass DM, Kao PF, Kahn M, Su SC, Samiei A, Joseph N, Haggarty SJ, Delalle I, Tsai LH. An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain.

- Nature. 29;483(7388): 222-6. [https://doi: 10.1038/nature10849](https://doi.org/10.1038/nature10849). PMID: 22388814; PMCID: PMC349895
- 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>
- Hamilton, G.F., Rhodes, J.S.(2015). Exercise Regulation of Cognitive Function and Neuroplasticity in the Healthy and Diseased Brain, 1st ed, Progress in Molecular Biology and Translational Science. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.07.004>.
- Hasselmo, M.E. (1999). Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends Cogn Sci*. Sep;3(9):351-359. [https://doi: 10.1016/s1364-6613\(99\)01365-0](https://doi.org/10.1016/s1364-6613(99)01365-0).
- Holt, W., Maren, S.. (1999). Muscimol inactivation of the dorsal hippocampus impairs contextual retrieval of fear memory. *J Neurosci*, 19(20):9054-62. [https://doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-20-09054.1999](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-20-09054.1999).
- Introini-Collison, I.B., McGaugh, J.L. (1986). Epinephrine modulates long-term retention of an aversively motivated discrimination. *Behav Neural Biol*. 45(3):358-65. [https://doi: 10.1016/s0163-1047\(86\)80024-3](https://doi.org/10.1016/s0163-1047(86)80024-3).
- Izquierdo, I., Dias, R.D. (1985) Influence on memory of posttraining or pre-test injections of ACTH, vasopressin, epinephrine, and beta-endorphin, and their interaction with naloxone. *Psychoneuroendocrinology*.10(2):165-72. [https://doi: 10.1016/0306-4530\(85\)90054-x](https://doi.org/10.1016/0306-4530(85)90054-x).
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2001). *Principios de neurociencia* (4th ed.). McGraw Hill Interamericana.
- Khaksari, M., Rashidy-Pour, A., & Vafae, A. (2007). Central mineralocorticoid receptors are indispensable for corticosterone-induced impairment of memory retrieval in rats. *Neuroscience* 149,729–738. [https://doi: https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.08.016](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.08.016)
- Kim, J. J., & Fanselow, M. S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*, 256(5057), 675-677. <https://doi.org/10.1126/science.1585183>
- Kino, T., Ichijo, T., Amin N.D., Kesavapany, S., Wang, Y., Kim, N., Rao, S., Player, A., Zheng, Y.L., Garabedian, M.J., Kawasaki, E., Pant, H.C., Chrousos, G.P. (2007) Cyclin-dependent kinase 5 differentially regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through phosphorylation: Clinical implications for the nervous system response to glucocorticoids and stress. *MolEndocrinol* 21(7):1552–1568. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0345>
- Kovács, G. L., Telegdy, G., & Lissák, K. (1977). Dose-dependent action of corticosteroids on brain serotonin content and passive avoidance behavior. *Hormones and Behavior*, 8(2), 155-165. [https://doi.org/10.1016/0018-506x\(77\)90032-0](https://doi.org/10.1016/0018-506x(77)90032-0).
- Liang KC, Juler RG, McGaugh JL. (1986). Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: involvement of the amygdala noradrenergic system. *Brain Res*. 368(1):125-33. [https://doi: 10.1016/0006-8993\(86\)91049-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91049-8).
- Lightman, S., Conway-Campbell, B. (2010). The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nat Rev Neurosci* 11, 710–718. <https://doi.org/10.1038/nrn2914>

- 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>
- Martínez, I., Quirarte, G. L., Díaz-Cintra, S., Quiroz, C., & Prado-Alcalá, R. A. (2002). Effects of lesions of hippocampal fields CA1 and CA3 on acquisition of inhibitory avoidance. *Neuropsychobiology*, 46(2), 97-103. <https://doi.org/10.1159/000065419>
- McGaugh, J. L. (2000). Memory—a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248-251. <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248>
- Medina, A. C., Charles, J. R., Espinoza-González, V., Sánchez-Resendis, O., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B., & Quirarte, G. L. (2007). Glucocorticoid administration into the dorsal striatum facilitates memory consolidation of inhibitory avoidance training but not of the context or footshock components. *Learning & Memory* 14(10), 673-677. <https://doi.org/10.1101/lm.654407>
- Mineka, S., & Oehlberg, K. (2008). The relevance of recent developments in classical conditioning to understanding the etiology and maintenance of anxiety disorders. *Acta Psychologica*, 127(3), 567-580. <https://doi.org/10.1016/j.actpsy.2007.11.007>
- Miyoshi E, Wietzikoski EC, Bortolanza M, Boschen SL, Canteras NS, Izquierdo I, Da Cunha C. Both the dorsal hippocampus and the dorsolateral striatum are needed for rat navigation in the Morris water maze. *Behav Brain Res*, 1;226(1):171-8. <https://doi: 10.1016/j.bbr.2011.09.011>
- Monder, C., White, P.C.(1993). 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam Horm*. 47:187-271. PMID: 8447114
- Morris, D.J., Brem, A.S., Ge, R., Jellinck, P.H., Sakai, R.R., Hardy, M.P.(2003). The functional roles of 11 beta-HSD1: vascular tissue, testis and brain. *Mol Cell Endocrinol*. 30;203(1-2):1-12. [https://doi: 10.1016/s0303-7207\(03\)00094-7](https://doi: 10.1016/s0303-7207(03)00094-7)
- Moser, M. B., & Moser, E. I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8(6), 608-619. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1998\)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7)
- Muir, J. L., & Pfister, H. P. (1987). Time course of the corticosterone and prolactin response following predictable and unpredictable novelty stress in *Rattus norvegicus*. *Physiology & Behavior*, 40(1), 103–107. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(87\)90191-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(87)90191-0)
- Myers, C. E., & Gluck, M. A. (1994). Context, conditioning, and hippocampal rerepresentation in animal learning. *Behavioral Neuroscience*, 108(5), 835-847. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.108.5.835>
- National Research Council. (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals* (8th ed.). National Academy of Sciences.
- Nicolaidis, N. C., Pavlaki, A. N., Maria Alexandra, M. A., & Chrousos, G. P. (2018). Glucocorticoid therapy and adrenal suppression. In K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J. M. Hershman, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, M. Levy, E. A. McGee, R. McLachlan, J. E. Morley, M. New, J. Purnell, R. Sahay, F. Singer, M. A. Sperling, C. A. Stratakis, D. L. Trence, & D. P. Wilson (Eds.), *Endotext [Internet]*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279156/>
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. (2001). *Especificaciones técnicas*

- para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. SENASICA.
- Oitzl, M.S., de Kloet, E.R.(1992). Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behav Neurosci*,106(1):62-71. [https://doi: 10.1037//0735-7044.106.1.62](https://doi.org/10.1037//0735-7044.106.1.62)
- Penick, S., & Solomom, P. R. (1991). Hippocampus, context, and conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 105(5), 611-617. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.105.5.611>
- 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>.
- Piña, A. L., Ormsby, C. E., Miranda, M. I., Jimenez, N., Tapia, R., & Bermúdez-Rattoni, F. (1994). Graft-induced recovery of inhibitory avoidance conditioning in striatal lesioned rats is related to choline acetyltransferase activity. *Journal of Neural Transplantation & Plasticity*, 5(1), 11-16. <https://doi.org/10.1155/NP.1994.11>
- 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>
- 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>
- Quirarte, G. L., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1997). Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25), 14048-14053. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.14048>
- Ramamoorthy, S., & Cidlowski, J. A. (2016). Corticosteroids: Mechanisms of action in health and disease. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 42(1), 15-vii. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2015.08.002>
- Ramos MJ. (1998). Retrograde amnesia for spatial information: a dissociation between intra and extramaze cues following hippocampus lesions in rats. *Eur J Neurosci* 10: 3295–3301. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00388>
- Reis, F. M., Almada, R. C., Fogaça, M. V., & Brandão, M. L. (2016). Rapid activation of glucocorticoid receptors in the prefrontal cortex mediates the expression of contextual conditioned fear in rats. *Cereb Cortex*, 26(6), 2639-2649. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv103>
- Revest, J. M., Di Blasi, F., Kitchener, P., Rouge-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>
- Rex, A., Voigt, J. P., & Fink, H. (1999). Behavioral and neurochemical differences between Fischer 344 and Harlan–Wistar rats raised identically. *Behavior Genetics*, 29(3), 187-192. <https://doi.org/10.1023/A:1021644002588>

- Riedel G, Micheau J, Lam AG, Roloff EL, Martin SJ, Bridge H, de Hoz L, Poeschel B, McCulloch J, Morris RG. (1999). Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat Neurosci.* (10):898-905. <https://doi.org/10.1038/13202>.
- Robson, A.C., Leckie, C.M., Seckl, J.R., Holmes, M.C. (1998). 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the postnatal and adult rat brain, *Molecular Brain Research*, Volume 61, Issues 1–2, Pages 1-10, [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00161-2](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00161-2).
- Roland, B. L., Li, K. X., Funder, J. W. (1995). Hybridization histochemical localization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat brain, *Endocrinology*, Volume 136, Issue 10, Pp. 4697–4700, <https://doi.org/10.1210/endo.136.10.7664691>
- 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. (2000). 1999 Curt P. Richter award. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*, 25(3), 213-238. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(99\)00058-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(99)00058-X)
- 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>
- Roosendaal, B., Carmi, O., & McGaugh, J. L. (1996). Adrenocortical suppression blocks the memory-enhancing effects of amphetamine and epinephrine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(4), 1429-1433. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.4.1429>
- Roosendaal, B., & McGaugh, J. L. (1996). Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65(1), 1-8. <https://doi.org/10.1006/nlme.1996.0001>
- Roosendaal, B., & McGaugh, J. L. (1997). Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. *European Journal of Neuroscience*, 9(1), 76-83. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01355.x>
- Roosendaal, B., McReynolds, J. R., Van der Zee, E. A., Lee, S., McGaugh, J. L., & McIntyre, C. K. (2009). Glucocorticoid effects on memory consolidation depend on functional interactions between the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 29(45), 14299-14308. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3626-09.2009>
- Roosendaal, B., Williams, C. L., & McGaugh, J. L. (1999). Glucocorticoid receptor activation in the rat nucleus of the solitary tract facilitates memory consolidation: Involvement of the basolateral amygdala. *European Journal of Neuroscience*, 11(4), 1317-1323. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00537.x>
- Rusvai, E., Náray-Fejes-Tóth, A. (1993). A new isoform of 11 beta-hydroxysteroid

- dehydrogenase in aldosterone target cells. *J Biol Chem*, 25;268(15):10717-20.
- Sandi, C., & Pinelo-Nava, M. T. (2007). Stress and memory: Behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural Plasticity*, 2007, 1-20. <https://doi.org/10.1155/2007/78970>
- Sandi, C., & Rose, S. P. (1997). Training-dependent biphasic effects of corticosterone in memory formation for a passive avoidance task in chicks. *Psychopharmacology*, 133(2), 152-160. <https://doi.org/10.1007/s002130050385>
- Sarabdjitsingh, R.A., Meijer, O.C., Schaaf, M.J., de Kloet, E.R.(2009). Subregion-specific differences in translocation patterns of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in rat hippocampus. *Brain Res.* 16;1249:43-53. <https://doi: 10.1016/j.brainres.2008.10.048>
- Schwabe, L., & Wolf, O. T. (2013). Stress and multiple memory systems: From 'thinking' to 'doing'. *Trends in Cognitive Sciences*, 17(2), 68. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2012.12.001>
- Schwartz, R., & Pawlak, C. (2004). Behavioral neuroscience in the rat: taking the individual into account. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 26, 17-22.
- Seckl JR. (1997). 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? *Front Neuroendocrinol*,18(1):49-99. <https://doi: 10.1006/frne.1996.0143>
- Spencer, R. L., & Bland, S. T. (2007). Hippocampal Neurons\*. In G. Fink (Ed.), *Encyclopedia of Stress (Second Edition)* (pp. 311-320). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012373947-6.00194-X>
- Squire, L. R. (1987). *Memory and brain*. Oxford University Press.
- Steimer, T., & Driscoll, P. (2003). Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress*, 6(2), 87-100. <https://doi.org/10.1080/1025389031000111320>
- Steimer, T., & Driscoll, P. (2005). Inter-individual vs line/strain differences in psychogenetically selected Roman High-(RHA) and Low-(RLA) Avoidance rats: neuroendocrine and behavioural aspects. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(1), 99-112. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.07.002>
- Steimer, T., Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., & Driscoll, P. (1998). Long-term behavioural and neuroendocrine changes in Roman high-(RHA/Verh) and low-(RLA-Verh) avoidance rats following neonatal handling. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16(3-4), 165-174. [https://doi.org/10.1016/s0736-5748\(98\)00032-x](https://doi.org/10.1016/s0736-5748(98)00032-x)
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10), 655-669. <https://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Swanson LW, Cowan WM. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol*.172:49–84. <https://doi.org/ 10.1002/cne.901720104>
- Tomlinson JW, Stewart PM.(2005). Mechanisms of disease: Selective inhibition of

- 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a novel treatment for the metabolic syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*,(2):92-9. [https://doi: 10.1038/ncpendmet0023](https://doi.org/10.1038/ncpendmet0023).
- Van der Linden, M., Brédart, S., & Beerten, A. (1994). Age-related differences in updating working memory. *British Journal of Psychology*, *85* ( Pt 1), 145-152. <https://doi.org/10.1111/j.2044-8295.1994.tb02514.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>
- Walker, C.-D., Rivest, R. W., Meaney, M. J., & Aubert, M. L. (1989). Differential activation of the pituitary-adrenocortical axis after stress in the rat: use of two genetically selected lines (Roman low- and high-avoidance rats) as a model. *Journal of Endocrinology*, *123*(3), 477-485. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1230477>.
- Waddell, B. J., Benediktsson, R., Brown, R. W., Seckl, J. R. (1998). Tissue-Specific Messenger Ribonucleic Acid Expression of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Types 1 and 2 and the Glucocorticoid Receptor within Rat Placenta Suggests Exquisite Local Control of Glucocorticoid Action, *Endocrinology*, Volume 139, Issue 4, Pp. 1517–1523,
- 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>
- White PC, Mune T, Rogerson FM, Kayes KM, Agarwal AK.(1997). Molecular analysis of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and its role in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Steroids*, *62*(1):83-8. [https://doi: 10.1016/s0039-128x\(96\)00164](https://doi: 10.1016/s0039-128x(96)00164)
- Wyrwoll CS, Holmes MC, Seckl JR.(2011). 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases and the brain: from zero to hero, a decade of progress. *Front Neuroendocrinol.*, *32*(3):265-86. <https://doi: 10.1016/j.yfrne.2010.12.001>
- Yehuda, R., & LeDoux, J. (2007). Response variation following trauma: a translational neuroscience approach to understanding PTSD. *Neuron*, *56*(1), 19-32. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.006>