



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

EFFECTOS DE LA INTENSIDAD DEL CHOQUE ELÉCTRICO EN EL
CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL CONTEXTO SOBRE LA LIBERACIÓN DE
CORTICOSTERONA Y LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR A GLUCOCORTICOIDES
EN LA AMÍGDALA

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

PRESENTA:
RENATA PONCE LINA

TUTOR O TUTORES PRINCIPALES

DRA. GINA LORENA QUIRARTE
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

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

MÉXICO, D.F. MAYO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité revisor certificamos que la tesis elaborada por: Ponce Lina **Renata** es: “Efectos de la intensidad del choque eléctrico en el condicionamiento de miedo al contexto sobre la liberación de corticosterona y la activación del receptor a glucocorticoides en la amígdala” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente

Dra. Sara Eugenia Cruz Morales

Secretario

Dra. Gina Lorena Quirarte

Vocal

Dra. Maricela Luna Muñoz

Suplente

Dr. Francisco Sotres Bayón

Suplente

Dr. Raúl Paredes Guerrero

Aprobado por el Comité Académico

Dr. Alfredo Varela Echeverría
Coordinador del Programa
Maestría en Ciencias (Neurobiología)

AGRADECIMIENTOS

- A la **Dra. Gina Quirarte**, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y otorgarme siempre el apoyo necesario para que mi estancia fuera placentera; por sus valiosas opiniones y consejos para mejorar la calidad del trabajo; y por todo el optimismo otorgado durante la realización del proyecto.
- A la **Dra. Maricela Luna** por permitirme trabajar en su laboratorio y por el tiempo, la confianza y la dedicación dados al proyecto y a mí, así como sus enseñanzas y consejos académicos que me permitieron realizar este trabajo.
- A la **Dra. Magda Giordano**, por las observaciones realizadas durante los seminarios, y que gracias a estas, se vio enriquecida esta tesis.
- Al **Instituto de Neurobiología (INB)** de la UNAM, por abrirme las puertas de sus instalaciones y por el apoyo otorgado para la realización del proyecto.
- A los integrantes del **Laboratorio de Aprendizaje y Memoria** del INB, en especial al Dr. Roberto Prado, a la M. V. Z. Norma Serafín, a la Dra. Cristina Medina, al Sr. Ángel Méndez y a la Biol. Jazmín Parga, por sus aportaciones y opiniones dadas al proyecto con el fin de mejorarlo.
- A los integrantes del **Laboratorio de Bioquímica de Hormonas** del INB, en especial al Dr. Carlos Arámburo, por permitirme realizar gran parte de los experimentos en su laboratorio, y a la M. en C. Martha Carranza, por sus enseñanzas y su colaboración en las técnicas bioquímicas empleadas durante el proyecto.
- A **todos mis compañeros de generación** de la Maestría en Ciencias (Neurobiología) por su apoyo académico y moral durante la carrera y porque he aprendido algo de cada uno de ellos.
- Al **Consejo de Ciencia y Tecnología** (CONACYT 130524) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM IN214111 e IN202414).
- A las siguientes personas de las unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología, UNAM, campus Juriquilla:
 - M. V. Z. Martín García Servín, encargado del Bioterio.
 - Ing. Ramón Martínez Olvera, Ing. Alberto Lara Ruvalcaba e Ing. Omar González Hernández, de la unidad de Cómputo.
 - Mtra. Leonor Casanova Rico, de la Unidad de Enseñanza.
 - Lic. Francisco Javier Valles Valenzuela y Lic. Soledad Medina Malagón, de la Biblioteca.

Resumen

La liberación de glucocorticoides durante el proceso de aprendizaje facilita la consolidación de la memoria, especialmente de experiencias emotivas. Este efecto depende de varios factores, entre ellos se encuentran la activación del receptor a glucocorticoides (GR) en la amígdala y el grado de emotividad del evento. En el presente trabajo estudiamos la relación entre la intensidad de un estímulo estresante, la concentración de corticosterona (CORT) en suero y el porcentaje de GR activo en la amígdala. Se entrenaron ratas macho de la cepa Wistar (250-350 gr) en la tarea de condicionamiento de miedo al contexto (CMC) bajo diferentes intensidades de choque eléctrico (0.0, 1.0, y 3.0 mA). Para cada intensidad se formaron dos grupos, al primero de ellos se le realizó la prueba de retención a las 48 h y posteriormente dos sesiones de extinción cada 24 h. Al otro grupo se le sacrificó 15 min después del entrenamiento, se colectó la sangre y se extrajo la amígdala. Se cuantificaron los niveles de CORT en suero utilizando el método de ELISA, y con las muestras de amígdala se midieron los niveles de GR activo mediante SDS-PAGE/WB. Se observó que los animales entrenados con las intensidades de 1.0 y 3.0 mA aprendieron la tarea de CMC pero conductualmente no mostraron diferencias en la respuesta de miedo (porcentaje de congelamiento) durante las sesiones de entrenamiento y de retención, sin embargo, difieren en el proceso de extinción, siendo el grupo de 3.0 mA el que mostró un retardo en este proceso. Las mediciones de los niveles de CORT y de GR activo no se relacionaron con la intensidad del choque, ya que la concentración de hormona fue mayor en el grupo de 3.0 mA respecto al resto de los grupos, y no existen diferencias del GR activo entre las distintas intensidades.

Abstract

The release of glucocorticoids during the learning process facilitates memory consolidation, especially of highly emotional or stressful events. This effect depends on several factors, among which are the activation of the glucocorticoid receptor (GR) in the amygdala and the arousal produced by the event. The present study investigated the relation of the intensity of the stressor, serum corticosterone (CORT) levels and the percentage of activated GR in the amygdala. Male Wistar rats (250-350 gr) were trained in contextual fear conditioning in a single session (11 min) using different foot-shock intensities (0.0, 1.0, and 3.0 mA). There were two groups for each intensity. On the first one, rats were tested for retention 48 h post training, and then fear response extinction was evaluated in two sessions every 24 h post retention. The other group was sacrificed 15 min after training by decapitation, blood was collected and the amygdala extracted. CORT levels in serum were quantified by the ELISA method, and with amygdala samples the active GR (serine 232 phosphorylated) levels were measured by SDS-PAGE/WB. We observed that animals trained with intensities of 1.0 or 3.0 mA learned the task but there were not differences on the fear response (percentage of freezing) between them during training and retention sessions, however, they were different in the extinction process, since the group of 3.0 mA showed a latency in this process. Both CORT levels and active GR densities did not show relation with shock intensity, because hormone concentration was higher in the group of 3.0 mA in contrast with the control group, and there were not differences of active GR between intensities.

Índice

Contenido	Página
1. Índice de figuras y tablas	i
2. Lista de abreviaturas	ii
3. Introducción	1
4. Antecedentes	3
4.1. Memoria de eventos estresantes	3
4.2. La amígdala	4
4.3. Los glucocorticoides	6
4.4. Efecto de los glucocorticoides sobre la consolidación de la memoria	8
4.5. El receptor a glucocorticoides	11
5. Justificación	16
6. Hipótesis	16
7. Objetivos	16
8. Materiales y métodos	17
9. Resultados	26
10. Discusión	31
11. Conclusión	34
12. Perspectivas	35
13. Referencias bibliográficas	36
14. Apéndice	42

1. Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Núcleos principales de la amígdala.	5
Figura 2.. Estructura molecular de los glucocorticoides.	7
Figura 3. Activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.	8
Figura 4. Efectos de los GCs sobre la memoria.	9
Figura 5. Correlación entre la intensidad de choque eléctrico y los niveles de corticosterona en plasma.	11
Figura 6. Dominios funcionales del GR.	12
Figura 7. Deterioro de la memoria de largo plazo en el condicionamiento de miedo al contexto después de la administración de un antagonista del GR en la BLA.	15
Figura 8. Cámara de condicionamiento y aparatos de medición asociados.	19
Figura 9. Diagrama del protocolo del condicionamiento de miedo al contexto.	20
Figura 10. Diagrama del protocolo para la obtención de muestras.	21
Figura 11. Resultados conductuales de ratas entrenadas en la tarea de condicionamiento de miedo al contexto.	27
Figura 12. Niveles de CORT en suero.	28
Figura 13. GR total y GR fosforilado en la amígdala.	29
Figura 14. Correlaciones de Pearson entre algunas variables medidas.	30

Índice de tablas

Tabla 1. Grupos experimentales.	18
---------------------------------	----

2. Lista de abreviaturas

ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ANDEVA	Análisis de varianza
AVP	Vasopresina
BLA	Amígdala basolateral
BO	Bulbo olfatorio
C	Cisteína
CA1	Región CA1 del hipocampo
CBG	Globulina de uninón a glucocorticoides
CDK	Cinasas dependientes de ciclina
CEA	Amígdala central
cm	Centímetro
CO ₂ H	Carboxilo terminal
CORT	Corticosterona
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DBD	Dominio de unión al ADN
EC	Estímulo condicionado
EEM	Error estándar de la media
EI	Estímulo incondicionado
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GCs	Glucocorticoides
GILZ	Zipper de Leucina inducido por glucocorticoides
GR	Receptor a glucocorticoides
GRE	Elementos de respuesta a glucocorticoides
GR α	Isoforma α del receptor a glucocorticoides
GR β	Isoforma β del receptor a glucocorticoides
GSK3	Cinasa 3 Glicógeno sintasa
HHA	Hipotálamo-hipófisis-adrenal
hr	Hora
Hsp90	Proteína de choque térmico 90
JNK	c-Jun N-terminal
K ⁺	Ion potasio
Kd	Constante de disociación
LBD	Dominio de unión a ligando
LTP	Potenciación a largo plazo
mA	mili Amperes

MAPK	Protein cinasa de unión a mitógeno
MEA	Antranilato de metilo
min	Minuto
MR	Receptor a mineralocorticoides
Ng	Nanogramo
n. B	Núcleo basal de la amígdala
n. Ba	Núcleo basolateral de la amígdala
n. C	Núcleo central de la amígdala
n. Co	Núcleo cortical de la amígdala
n. L	Núcleo lateral de la amígdala
n. M	Núcleo medial de la amígdala
n. TOL	Núcleo del tracto olfatorio lateral de la amígdala
Na ⁺	Ion sodio
NH ₂	Amino terminal
nM	nano Molar
NTD	Dominio de activación transcripcional en el extremo N-terminal
p	Probabilidad
P-S	Serina fosforilada
PTSD	Desórdenes de estrés postraumático
PVN	Núcleo paraventricular del hipotálamo
RC	Respuesta condicionada
RI	Respuesta incondicionada
rpm	Revoluciones por minuto
S	Serina
SGK1	Cinasa-1 regulada por glucocorticoides de suero
T	Treonina
TTP	Tristetraprolina
vmPFC	Corteza prefrontal ventromedial
WB	Western Blot
Zn ²⁺	Ion Zinc
° C	Grados centígrado
μL	Microlitros
11β-HSD	Enzima 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa

3. Introducción

El estrés es la respuesta fisiológica a un estímulo o una condición que altera el equilibrio de un organismo. Esta respuesta involucra la liberación de un grupo de hormonas llamadas glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores), las cuales, además de regular procesos homeostáticos en todo el organismo, también modulan procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria.

Se ha demostrado que ciertos niveles de glucocorticoides facilitan la consolidación de la memoria de los eventos asociados con un estímulo estresante, y se sabe que este efecto depende de la unión de la hormona con el receptor a glucocorticoides (GR), el cual, al estar acoplado con su ligando, sufre modificaciones post-traduccionales en residuos de aminoácidos entre los que se encuentra la serina 211 (S211) en humanos, cuya fosforilación induce la activación del receptor para funcionar como un factor de transcripción que regula la expresión génica.

Existe una correlación positiva entre la intensidad del estímulo estresante y la concentración de glucocorticoides en suero de varios animales, incluidos los humanos y los roedores. Sin embargo, a pesar que los efectos de la hormona dependen de su unión con el GR, no se ha estudiado la posibilidad de un efecto sobre la activación del receptor.

El estudio de los efectos fisiológicos y conductuales debidos a la exposición a eventos aversivos se ha realizado a través del entrenamiento de animales, generalmente de roedores, en tareas de aprendizaje que utilizan estímulos estresantes dentro de sus protocolos. Entre estas se encuentra el condicionamiento de miedo al contexto (CMC), que consiste en asociar un contexto específico (estímulo condicionado, EC) con la respuesta de miedo que se genera en un individuo al aplicarle choques eléctricos (estímulo incondicionado, EI).

La vía anatómica necesaria para el CMC está bien determinada y la participación de la amígdala es fundamental para la asociación de los estímulos EI y EC a través de los procesos de adquisición y consolidación de la memoria, así como para la expresión de la respuesta de miedo caracterizada por una disminución en la movilidad corporal del sujeto (congelamiento).

Se sabe que los GR localizados en la amígdala son importantes para la adquisición y consolidación del CMC. Hasta ahora, no se ha estudiado el efecto de un estímulo estresante sobre la fosforilación del receptor, y menos aún, si esta modificación se relaciona con la intensidad del estímulo. Con esta información, se sabrá si la fosforilación del GR, específicamente en la S211, es relevante para la facilitación de la consolidación de la memoria ejercida por los

glucocorticoides en esta región, y de ser así, se podría deducir el tipo de regulación transcripcional que realiza el receptor.

En este trabajo se entrenaron ratas en el CMC de una sola sesión (11 min) bajo diferentes intensidades de choque eléctrico (0.0, 1.0 o 3.0 mA). Posteriormente, para cada grupo se probó la retención de los animales 24 h después del entrenamiento, y se midió la latencia de extinción en dos sesiones realizadas cada 24 h después de la retención. Para cada intensidad de choque, un grupo de ratas se sacrificó a los 15 min después del entrenamiento, se obtuvieron muestras de sangre para la cuantificación de los niveles de CORT en suero a través de la técnica de ELISA, y se extrajo tejido de amígdala para conocer el porcentaje de GR fosforilado en la S211 por medio de la técnica de SDS-PAGE/Western Blot.

Se observó que las ratas entrenadas con diferentes intensidades de choque eléctrico muestran la misma adquisición y retención, sin embargo, el proceso de extinción se relaciona directamente con la intensidad del choque, de forma que los individuos entrenados con la intensidad más alta presentan un retardo en la extinción. Contrario a otros trabajos, no hubo una correlación entre la intensidad del choque y los niveles de CORT en suero, ya que el único grupo de ratas que mostró mayores niveles de hormona fue el de 3.0 mA. En cuanto a los niveles de GR en la amígdala, se encontró que no importa la intensidad del choque, las ratas entrenadas en el CMC presentan la misma densidad de receptor total y de GR fosforilado en la S211.

Por lo tanto, con las condiciones utilizadas durante el desarrollo de la tarea de CMC y los parámetros de medición de hormona y de receptor que se utilizaron en este trabajo, la fosforilación del GR en la S211 no es un proceso afectado por la intensidad del estímulo estresante, y no se relaciona con la cantidad de hormona liberada.

4. Antecedentes

4.1. Memoria de eventos estresantes

El aprendizaje es la alteración de la conducta de un organismo en función de la experiencia previa, que no puede atribuirse a modificaciones en la respuesta de órganos sensoriales o efectores debida a la adaptación sensorial, fatiga muscular o a las drogas (Reilly & Kim, 2013). El proceso de formación de la memoria involucra las etapas de adquisición, consolidación y de evocación de la información. La adquisición se refiere al proceso involucrado en permitir que se perciba nueva información y sea atendida adecuadamente de tal forma que se forme un trazo neural que la represente, el cual, debe ser almacenado o consolidado mediante la formación de conexiones neurales fuertes que no permitan su pérdida y, posteriormente, el individuo logre evocarla, es decir, que sea capaz de localizar y activar el trazo neural que la representa (Goshen-Gottstein, 2003).

La información recién adquirida se caracteriza por formar una memoria de corto plazo que se encuentra en un estado frágil y vulnerable, capaz de almacenar pocos elementos y durar segundos, minutos y hasta algunas horas. Para su consolidación, esta memoria depende de procesos endógenos como la síntesis de proteínas, que logren establecerla en una memoria de largo plazo, cuya capacidad de almacenamiento es ilimitada y puede durar días, meses y años (Goshen-Gottstein, 2003; Roozendaal, 2000). Este proceso es regulado por influencias neurales y hormonales, así como por mecanismos celulares y moleculares que son activados por los distintos estímulos que forman parte de la experiencia (McGaugh, 2000).

Un tipo de experiencia que se caracteriza por generar memorias de largo plazo, es la relacionada con eventos estresantes. El estrés es la respuesta a un estímulo que altera el equilibrio de un organismo, y como parte de esta respuesta, el cerebro inicia una serie de procesos de atención y de metabolismo que le permiten a los individuos adaptarse rápidamente a ambientes aversivos o amenazantes (Schwabe, Böhringer, & Wolf, 2009). Esta respuesta induce un estado de “activación” en el individuo que le permite iniciar y mantener acciones específicas y coordinadas (que en conjunto se conocen como el sistema: huir, pelear o congelarse), con el objetivo de evitar o eliminar el origen del estímulo estresante (Ursin & Eriksen, 2004).

Un método de investigación de las respuestas conductuales y fisiológicas que resultan de la exposición de un individuo a un evento aversivo, es el condicionamiento de miedo al contexto (CMC), cuyas características son similares a las respuestas observadas en los desórdenes

generalizados de miedo y de ansiedad en humanos (Sandford, Fang & Tang, 2003; Jacobs, Cushman & Fanselow, 2010). El CMC es un tipo de condicionamiento clásico o Pavloviano en el que un estímulo inofensivo conocido como estímulo condicionado (EC) que en el caso del CMC es un contexto (el conjunto de circunstancias en torno a un evento en el que se encuentra el animal), se presenta junto con un estímulo aversivo, como un choque eléctrico, llamado estímulo incondicionado (EI), que genera una respuesta innata de miedo, también llamada respuesta incondicionada (RI). Una vez asociados ambos estímulos, la presentación del EC por sí solo inducirá la generación de la respuesta de miedo, ahora llamada respuesta condicionada (RC), acompañada de la activación del sistema autónomo y de la liberación de hormonas (Maren, Phan, & Liberzon, 2013; Roozendaal, McEwen, & Chattarji, 2009).

Al ser una tarea que genera respuestas conductuales y fisiológicas que caracterizan al miedo, el CMC es una tarea conductual en la que la amígdala, el hipocampo, el estriado y la corteza prefrontal son componentes esenciales de su circuito neural (Goosens & Maren, 2001). No obstante, mediante lesiones neurotóxicas y electroquímicas realizadas en diferentes regiones del cerebro, principalmente de rata, antes del entrenamiento de la tarea, es decir, antes de la aplicación de los estímulos EC y EI, y en las que posteriormente se evalúa su efecto sobre la respuesta del animal, se sabe que la amígdala es requerida tanto para la adquisición de ambos estímulos (Phillips & LeDoux, 1992), así como para la modulación de la consolidación de la memoria de la experiencia y para la expresión de las respuestas autónomas y hormonales asociadas al estado de “activación” del animal (Goosens & Maren, 2001; Roozendaal, Barsegyan, & Lee, 2008), por lo que esta estructura es esencial para el CMC.

1. La amígdala

La amígdala es una región cerebral localizada en el lóbulo temporal medio, la cual agrupa más de diez núcleos que a su vez se dividen en subnúcleos, cuya comunicación se realiza a través una extensa red de conexiones intra e internucleares. Su anatomía se ha estudiado en distintos animales pero principalmente en rata, demostrando que así como existen muchas similitudes entre especies, hay diferencias claras en la organización y el tamaño relativo de los núcleos que la conforman (LeDoux, 2007; Sah, Faber, Lopez De Armentia, & Power, 2003). Los núcleos amigdaloides se clasifican en tres grupos: 1) el grupo basolateral (BLA), que incluye al núcleo lateral, al núcleo basal y al núcleo basal accesorio; 2) el grupo superficial o semejante a cortical,

formado por el núcleo cortical y el núcleo del tracto olfatorio lateral; y 3) el grupo centromedial, compuesto de los núcleos medial y central (Figura 1). Además, existe un conjunto de núcleos que se consideran de forma separada, estos incluyen a las masas celulares intercaladas y el área amígdalohipocampal (Sah *et al.*, 2003).

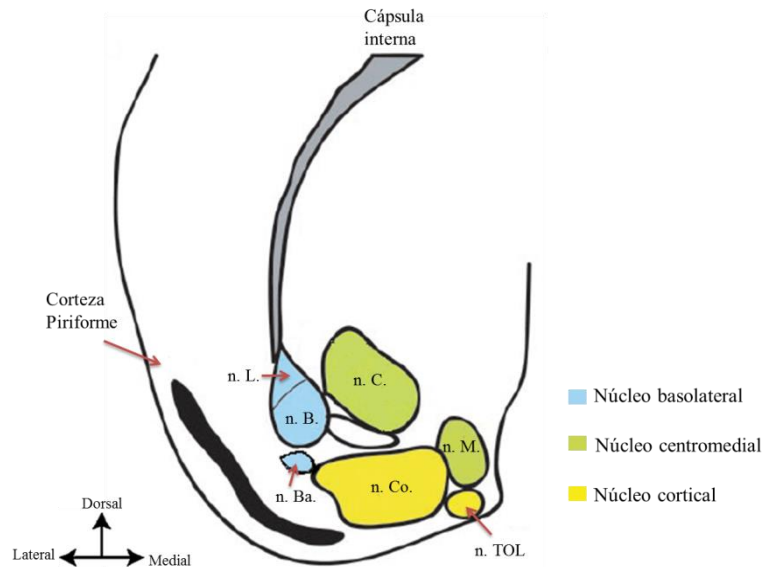


Figura 1. Núcleos principales de la amígdala: 1) el grupo profundo o basolateral, que incluye al núcleo lateral (n. L), al núcleo basal (n. B.) y al núcleo basal accesorio (n. Ba.); 2) el grupo superficial o cortical, formado por el núcleo cortical (n. Co.) y el núcleo del tracto olfatorio lateral (n. TOL); y 3) el grupo centromedial, compuesto de los núcleos medial (n. M.) y central (n. C.). Modificada de Sah *et al.* (2003).

En el cerebro de ratas, las vías aferentes y eferentes de la amígdala han sido mapeadas en detalle. El sitio principal de entrada es el núcleo lateral, especialmente su región dorsal, que recibe información de varias modalidades: somatosensorial (incluyendo el dolor), gustativa, visceral, olfatoria, auditiva y visual, provenientes de áreas talámicas, corticales, hipotálamicas y del tallo cerebral. La información sensorial recibida es transmitida al núcleo central, quien es la vía principal de salida de la amígdala hacia otras regiones cerebrales, para la expresión de las respuestas emotivas innatas y de las respuestas fisiológicas asociadas (LeDoux, 2007). Estas respuestas involucran conexiones con el mesencéfalo, el puente, la médula y el hipotálamo, que se caracterizan por modular las respuestas de congelamiento (inmovilidad somatomotora, excepto la necesaria para respirar), la reacción de sobresalto y el aumento de la presión sanguínea, así como las reacciones autónomas y endócrinas (Flor & Birbaumer, 2000; Johansen, Cain, Ostroff, & LeDoux, 2011).

Además de ser un sitio de entrada de información, el núcleo lateral modula los procesos de memoria y de aprendizaje a través de sus proyecciones con el hipocampo, la corteza prefrontal, el núcleo acumbens, el núcleo caudado y el estriado, quienes forman sistemas de memoria cuya actividad depende del tipo de información percibida (Orsini & Maren, 2012; Roozendaal et al., 2009). No obstante, la amígdala también es considerada un almacén de la memoria, ya que como resultado de la experiencia estresante se inducen procesos de plasticidad cerebral, es decir cambios en la eficacia sináptica debidos a mecanismos morfológicos, celulares o moleculares, que son considerados la base de los procesos de aprendizaje y memoria en vertebrados (Mitra, Jadhav, McEwen, Vyas, & Chattarji, 2005; Sigurdsson, Doyère, Cain, & LeDoux, 2007). En el CMC, el EC proveniente del hipocampo y el EI proveniente del mesencéfalo (gris periacuaductal), del tálamo y/o de la corteza cerebral, convergen en el núcleo lateral, en donde el EC induce la liberación del neurotransmisor glutamato (Glu), quien posteriormente se une a sus receptores AMPA, NMDA y mGlu induciendo la entrada del ion calcio (Ca^{2+}). Por otro lado, el EI induce la liberación del ión Mg^{2+} de los receptores NMDA, así como la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, que en conjunto provocan un aumento en la entrada de Ca^{2+} , quien activa diversas cascadas de señalización que contribuyen al mantenimiento de la plasticidad neural. Posteriormente, el núcleo lateral envía la información al núcleo central para modular la expresión de la respuesta de miedo (Rodrigues, Schafe, & Ledoux, 2004).

Se sabe que la selectividad del núcleo lateral para modular los procesos de consolidación de la memoria de experiencias estresantes, se debe a su interacción con las hormonas adrenales, adrenalina y glucocorticoides (GCs) (Roozendaal & McGaugh, 1997), que se liberan durante el estado de “activación” y que permiten que el grado de significancia de una experiencia regule la fuerza de la memoria de ésta (McGaugh, 2000). La adrenalina es una sustancia polar que no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que su efecto sobre la amígdala lo ejerce a través de la activación de sus receptores localizados en aferencias vagales dirigidas hacia el núcleo del tracto solitario, de donde emergen proyecciones hacia la BLA (Ferry, Roozendaal, & McGaugh, 1999). Por el contrario, los GCs entran fácilmente al cerebro y se unen a sus receptores localizados en el núcleo lateral para modular la consolidación de la memoria de los eventos estresantes (Roozendaal et al., 2009).

2. Los glucocorticoides

Los principales GCs endógenos son el cortisol y la CORT (Figura 2). Ambos esteroides son producidos en la mayoría de los mamíferos, pero la proporción en la que son secretados varía entre especies: en primates predomina el cortisol, en los roedores se produce CORT principalmente, y en ovejas, cerdos y perros se producen cantidades significativas de los dos (Buckingham, 2006).

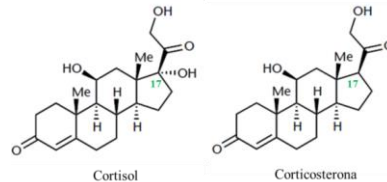


Figura 2. Estructura molecular de los esteroides cortisol y corticosterona. Existe una gran variedad de moléculas esteroideas pero todos contienen el mismo esqueleto tetracíclico. Los sustituyentes y los grupos funcionales presentes en cada anillo difieren entre los diferentes esteroides y son los principales responsables de sus efectos fisiológicos. La posición de los sustituyentes y de los grupos se identifica por un sistema numérico característico de todos los esteroides. La diferencia entre cortisol y corticosterona es la presencia de un grupo alcohol (-OH) en el carbono 17. Modificado de Patrick (2013).

Los Gcs son liberadas a la circulación sistémica en forma circadiana y pulsátil, de tal forma que en el nadir o el “valle” circadiano, es decir, bajo condiciones basales, se encuentran en concentraciones que varían en el rango de 0.173 – 0.346 ng/mL, y aumentan entre un 20% y 30% en el pico más alto del ritmo. Generalmente, este pico se presenta antes del inicio de la actividad diaria del individuo, por lo que en los animales diurnos, como los primates, se genera en las primeras horas del día, y en los nocturnos, como los roedores, se presenta al anochecer. No obstante, adjunto al patrón de liberación circadiano, los GCs aumentan su concentración en respuesta a estrés físico o psicológico vía el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA), llegando a alcanzar niveles de 104 ng/L (Buckingham, 2006; Joëls et al., 2008).

La activación del eje HHA ante una situación estresante o emocionalmente significativa, inicia cuando las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo liberan el factor de liberación de corticotropina (CRH) y el nonapéptido vasopresina (AVP) (Figura 3), los cuales viajan desde la eminencia media, vía la circulación porta, hasta la hipófisis anterior, donde estimulan sinérgicamente a los corticotropos o células productoras de proopiomelanocortina, para secretar la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la circulación sistémica (López et al., 1999). A su vez, la ACTH actúa en la zona fasciculata de la corteza adrenal vía los receptores a melanocortina tipo 2 para iniciar la síntesis de GCs, los cuales son liberados inmediatamente a la circulación sistémica por difusión (Buckingham, 2006; Joëls &

Karst, 2012). Una vez liberados, los GCs llegan a todas las células en el cerebro, no obstante, solo son activos en aquellas células que expresan sus dos tipos de receptores: los mineralocorticoides (MR) y los receptores a glucocorticoides (GR) (Joëls & Karst, 2012).

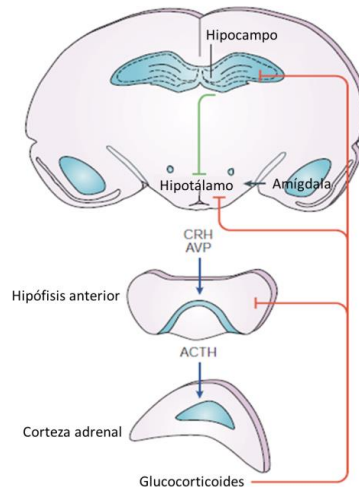


Figura 3. Activación del eje HHA. Ante la respuesta a estrés, las células PVN del hipotálamo producen la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y vasopresina (AVP). Ambos péptidos son liberados a la circulación sanguínea y estimulan la producción y la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la hipófisis anterior, quien a su vez, estimula la síntesis y liberación de GCs de la corteza adrenal. Además, aferencias provenientes de la amígdala pueden activar al eje. Su regulación involucra la retroalimentación negativa de los GCs en el hipotálamo e hipófisis, así como en otras regiones cerebrales como el hipocampo. Modificado de Sandi (2004).

3. Efecto de la concentración de los GCs sobre la consolidación de la memoria

El efecto cognitivo de los GCs depende de la fase del proceso de memoria que se esté ejecutando durante la liberación de la hormona. En particular, la elevación aguda de los niveles de hormona durante o inmediatamente después del proceso de adquisición, resulta en la facilitación de la consolidación, un efecto influenciado por la concentración de GCs (Figura 4), ya que al aumentar la concentración de hormona se facilita la consolidación de la memoria, pero cualquier aumento posterior a cierto umbral produce un deterioro, un comportamiento conocido como “U invertida (Pravosudov, 2010; Sandi, 2003).

Se cree que la relación entre concentración de GCs y el efecto sobre la consolidación de la memoria recae en la activación de sus dos receptores. Los MR o tipo I poseen una gran afinidad a CORT, cortisol y aldosterona, $K_d \approx 0.5-2$ nM (Buckingham, 2006), su localización se restringe a las células piramidales del hipocampo, el septum lateral, la amígdala central, la neocorteza y algunos núcleos motores en el tallo cerebral (Joëls & Karst, 2012; López et al., 1999). En el caso

del GR, este receptor presenta una afinidad diez veces menor a cortisol y a CORT, $K_d \approx 5 \text{ nM}$, no se unen con facilidad a la aldosterona (Buckingham, 2006) y poseen mayor afinidad por el GC de origen sintético llamado dexametasona (de Kloet, Vreugdenhil, Oitzl, & Joëls, 1998). Estos receptores se distribuyen ampliamente en neuronas y células gliales, siendo particularmente abundantes en células hipocampales CA1, en células del giro dentado, en las neuronas parvocelulares del PVN del hipotálamo, la hipófisis, la corteza, el cerebelo y algunos núcleos del tallo cerebral (Joëls & Karst, 2012).



Figura 4. Efecto de la concentración de los GCs sobre la memoria. Representación esquemática del efecto en forma de “U invertida” de los diferentes niveles de CORT o de estrés. Concentraciones bajas de hormona facilitan la consolidación de la memoria, mientras que concentraciones altas la afectan. Modificado de Sandi (2011)

Cuando los niveles circulantes de hormona son muy bajos, la mayoría de los GR y MR están libres, resultando en tasas bajas de disparo de potenciales de acción y en conexiones sinápticas débiles. Cuando se eleva moderadamente la concentración de hormona en sangre, tal como sucede durante una situación estresante, la mayoría de los MR y una fracción de los GR se encuentran ocupados, generando el fenómeno de potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés), el cual es un modelo celular de plasticidad sináptica que consiste en la generación de un aumento duradero de la amplitud de los potenciales postsinápticos excitatorios como resultado de la estimulación de alta frecuencia (tetánica) de vías aferentes, aumentando la fuerza y el número de conexiones sinápticas que permiten la facilitación de la consolidación. Si el aumento de la concentración de GCs persiste, entonces se saturarán ambos receptores, causando deterioro en la LTP y reduciendo la tasa de disparo neuronal, lo que provoca un déficit en la memoria y en el aprendizaje (Pravosudov, 2010; Sandi, 2004).

Además de la concentración y el momento de su liberación, los efectos de los GCs en la consolidación de la memoria dependen de la intensidad de estrés de la experiencia (McIntyre &

Roosendaal, 2007). Mediante el uso de paradigmas conductuales o tareas de aprendizaje que utilizan agentes estresantes dentro de sus protocolos, y en los que es posible manipular la intensidad de estos durante la fase de adquisición o de entrenamiento, se ha demostrado que existe una relación directa entre los niveles de GCs circulantes medidos después del entrenamiento de ratas utilizando diferentes niveles de estrés, y que además, este efecto se correlaciona con el nivel de recuerdo mostrado por los animales en pruebas posteriores (Goshen-Gottstein, 2003; Pravosudov, 2010; Sandi, 2003).

En un estudio hecho con ratas en el que se manipuló la temperatura del agua durante la fase de adquisición de la prueba de laberinto acuático, en donde los animales tienen que aprender a encontrar una plataforma sumergida en un contenedor de agua con la ayuda de claves espaciales ubicadas en el exterior del contenedor, se observó que los animales entrenados a 19 °C presentan una mejor ejecución de la tarea que las entrenadas a 25 °C. Al cuantificar los niveles de CORT liberados inmediatamente después del entrenamiento y al relacionárseles con la fuerza con la que el aprendizaje espacial se estableció en la memoria espacial en ambas condiciones experimentales, se encontró que las ratas entrenadas a 19 °C presentan niveles hormonales más elevados que las entrenadas a 25 °C (Sandi, 2003; Sandi et al., 1997).

Otro estudio realizado en pollos domésticos, mostró la facilitación de la memoria ante un estímulo aversivo débil (una pelota cubierta de concentraciones bajas de una sustancia fuertemente desagradable llamada antranilato de metilo; MEA), mientras que al utilizar un estímulo aversivo fuerte (concentraciones elevadas de MEA), se observaron elevaciones moderadas y altas de CORT que deterioraron la memoria (Pravosudov, 2010; Sandi & Rose, 1997).

En el CMC también se ha observado el efecto del nivel de estrés sobre la cantidad de hormona y la ejecución de la tarea. Al medir los niveles de CORT en plasma de ratas expuestas a distintas intensidades de choque en el entrenamiento, se encontró una correlación positiva entre la magnitud de los niveles de hormona y el grado de inmovilización exhibido en las sesiones de retención de memoria efectuadas a las 24 h y a los siete días después del entrenamiento (Figura 5) (Cordero et al., 1998).

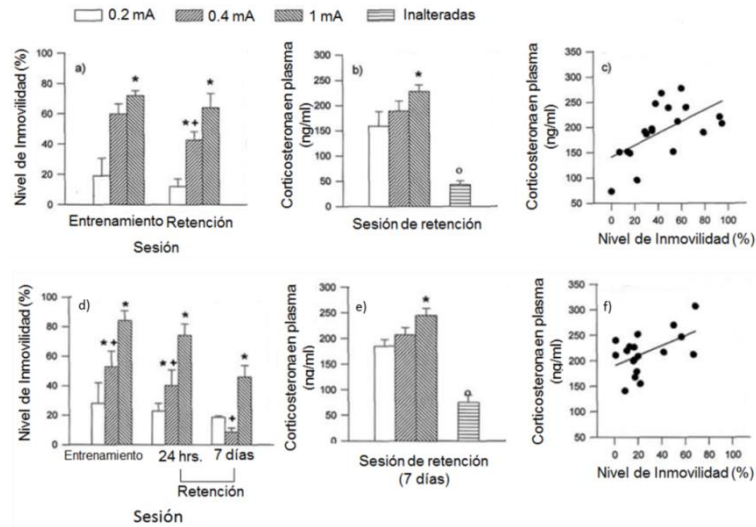


Figura 5. Correlación entre la intensidad de choque eléctrico y los niveles de corticosterona en plasma. a) y d) Porcentaje de tiempo de inmovilidad durante las sesiones de entrenamiento y de retención: a) a las 24 hrs. y d) a las 24 hrs. y a los 7 días. b) y e) Valores de corticosterona en plasma medidos después de la sesión de retención. c) y f) Correlación entre los valores de inmovilidad de la sesión de retención y los niveles de corticosterona en plasma después de la sesión de retención. Los resultados en a), b), d) y e) están representados como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ respecto al grupo entrenado a intensidades de 0.2 mA., + $p < 0.05$ respecto al grupo entrenado a 1 mA., ° $p < 0.01$ respecto a los grupos entrenados con choque eléctrico. Modificado de Cordero, Merino, y Sandi (1998).

Debido a la diferencia de afinidades entre los receptores MR y GR por su ligando, el aumento de los niveles de GCs asociado a la respuesta a estrés incrementa la probabilidad de su unión con el GR, por lo que la mayoría de la investigación relacionada al efecto de la hormona sobre la facilitación de la consolidación de la memoria de experiencias estresantes se ha enfocado en el estudio de este receptor (Sandi, 2003).

4. Receptor a glucocorticoides

El GR pertenece a la superfamilia de receptores intracelulares de proteínas de regulación transcripcional (Krstic et al., 1997). Es una proteína compuesta de ~780 residuos de aminoácidos que se encuentran agrupados en varios dominios (Figura 6). Su secuencia contiene un dominio de activación transcripcional en el extremo N-terminal (NTD, por sus siglas en inglés), un dominio central de unión al DNA (DBD, por sus siglas en inglés) altamente conservado en la súper familia de receptores nucleares, una región flexible (“bisagra”) y un dominio de unión a ligando en el extremo C-terminal (LBD, por sus siglas en inglés). El dominio NTD funciona como un activador transcripcional llamado AF1 que permite el reclutamiento de co-rreguladores y de maquinaria transcripcional. El dominio DBD posee dos motivos “dedos de zinc” que

reconocen y se unen a secuencias específicas conocidas como “elementos de respuesta a glucocorticoides” (GRE). Existe una segunda región activadora de la transcripción en el dominio LBD llamada AF2 que también interactúa con co-reguladores. La región DBD/”bisagra” y el LBD contienen una señal de localización nuclear que permite la translocación del receptor al núcleo mediante un mecanismo dependiente de importina (Nacela & Cidlowski, 2003).

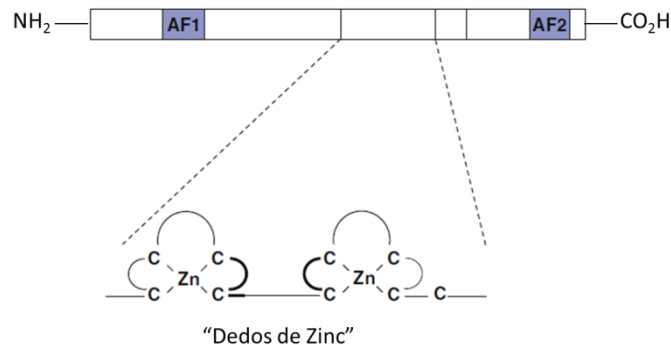


Figura 6. Dominios funcionales del GR. El extremo N-terminal (NH₂) contiene al dominio AF1 que facilita la activación transcripcional. El dominio central incluye dos dominios dedos de Zinc (Zn²⁺) ricos en cisteína (C) responsables de la dimerización del receptor y de su unión al ADN. El dominio siguiente es importante para la translocación nuclear (“bisagra”). En el extremo C-terminal (CO₂H) se encuentra otro dominio facilitador de la transcripción (AF2) responsable de la unión al ligando. Modificada de Buckingham (2006).

El GR es codificado por el gen nr3c1 (conservado en humanos y roedores), que contiene nueve exones, de los cuales, el primero es una región 5' no traducida y el resto codifica para proteínas distintas a través de procesos de “splicing” alternativo. El exón 9 genera las isoformas GR α y GR β que son idénticas a lo largo de los primeros 727 residuos de aminoácidos, diferenciándose en su extremo C-terminal. Cuando el GR α se encuentra unido a un GC, transloca al núcleo y recluta co-reguladores que ejercen efectos transcripcionales, mientras que la isoforma GR β reside constitutivamente en el núcleo actuando como un inhibidor negativo dominante de GR α , además de que regula genes diferentes (Gallagher-Beckley & Cidlowski, 2009).

El GR pueden mediar efectos genómicos (lentos) y no genómicos (rápidos). Estos últimos se efectúan en el rango de minutos, a través de mecanismos que no requieren de la transcripción de genes activada por el GR, sino que involucran la activación de vías de transducción de señales por medio de GRs unidos a membrana o citoplásmicos, que se han reportado en varios sistemas, incluyendo el cardiovascular, el inmune y el neuroendócrino. Sin embargo, los efectos clásicos

de la señalización de los GCs son acciones genómicas que dependen de la transcripción mediada por el GR y de la síntesis de novo de proteínas, procesos que involucran horas (Kadmiel & Cidlowski, 2013). En este caso, el GR inicialmente se encuentra unido a moléculas chaperonas (principalmente a la proteína de choque térmico hsp90), que al unírseles un GC, se disocian del GR y el complejo receptor-hormona transloca al núcleo, posteriormente el receptor se homodimeriza y se une con alta afinidad a los GRE, sitios palindrómicos localizados en regiones promotoras o intragénicas de los genes blancos de los GCs, para modular la transcripción. Alternativamente, los receptores pueden acoplarse con otros factores de transcripción para interferir con su actividad (Joëls & Karst, 2012; Krstic et al., 1997).

Las diversas acciones de los GR se deben, en parte, a las múltiples isoformas generadas por los procesos de “splicing” alternativo y de iniciación alterna de la traducción. No obstante, estas proteínas sufren modificaciones post-traduccionales, incluidas la fosforilación, la acetilación, la ubiquitinación y la sumoilación, que alteran el funcionamiento de este factor de la transcripción. En el GR de humano, los residuos S203, S113, S134, S141, S143, S203, S211, S226 y S404 son sitios altamente fosforilados debido a la acción de cinasas, incluidas las cinasas dependientes de ciclina (CDKs), la MAPK, la glicógeno sintasa 3 (GSK-3), la c-Jun N-terminal (JNK) y la caseína cinasa II. La mayoría de estos sitios de fosforilación se encuentran en el dominio NTD de la región N-terminal, algunos siendo fosforilados de forma continua y otros solo después de la unión del GR con la hormona (Kadmiel & Cidlowski, 2013, Adzic et al, 2009).

La fosforilación del GR dependiente de hormona puede determinar su especificidad hacia el promotor blanco, su interacción con cofactores, la fuerza y duración de su señalización, así como su estabilidad y su localización subcelular. En humanos, los residuos S203 y S226 son fosforilados en presencia y ausencia de hormona, mientras que S211 se fosforila únicamente con la unión del ligando. Estudios de inmunofluorescencia y de fraccionamiento bioquímico del receptor en presencia de la hormona indican que la forma fosforilada del residuo S203 (P-S203) predomina en citoplasma, mientras que S226 y S211 fosforilados (P-S226 y P-S211, respectivamente) residen en el núcleo, por lo que estos últimos contribuyen directamente a la regulación transcripcional del GR, no obstante sus funciones son completamente contrarias, ya que P-S211 regula positivamente la transcripción y P-S226 la inhibe, promoviendo el transporte del GR fuera del núcleo después de la disociación de la hormona (Blind & Garabedian, 2008; Wang et al, 2002).

En rata, el dominio NTD del GR contiene cuatro sitios principales de fosforilación: T171, S224, S232 y S246, de los cuales, los residuos S224 y S232 son análogos a la S203 y S211 respectivamente. Al igual que en humanos, su fosforilación diferencial regula positiva y negativamente la actividad transcripcional del receptor, de forma que la regulación positiva es debida a la actividad de las CDKs sobre S224 y S232, y se sabe que para que exista un aumento significativo en la transcripción es necesario que ambas sean fosforiladas. Por otra parte, la forma fosforilada de la S246 y de T171 por medio de JNK, inhibe la activación transcripcional del GR (Rogatsky et al, 1998).

Dentro de los genes que el GR regula de forma positiva se encuentran: el zipper de leucina inducido por glucocorticoides (GILZ, por sus siglas en inglés), la cinasa-1 regulada por glucocorticoides de suero (SGK1, por sus siglas en inglés), la tristetraprolina (TTP) y la fosfatasa-1 de la MAPK. Ejemplos de genes regulados negativamente están: la β -arrestina, la osteocalcina y el propio gen *nr3c1* (Kadmiel & Cidlowski, 2013). Se sabe que este mecanismo de autorregulación de la represión de su propio gen ocurre por el exceso de hormona, sin importar su asociación con factores transcripcionales específicos de ligando, pero este efecto depende del tipo celular y de las condiciones fisiológicas en las que se encuentre el organismo (Ramamoorthy & Cidlowski, 2013).

En la amígdala, el GR se distribuye en espacios subcelulares de glía y de neuronas de los núcleos basal, lateral y central. En el núcleo lateral, se le encuentra en el soma y en procesos gliales, en el citoplasma, el núcleo y membranas de neuronas postsinápticas, así como en terminales axónicas, dendritas y espinas dendríticas (Johnson, Farb, Morrison, McEwen, & LeDoux, 2005). En humanos, el número de GR en la periferia está asociado con el funcionamiento de la amígdala y es considerado un predictor del aumento de la actividad de esta región en individuos sanos después de ser expuestos a un evento sumamente estresante (Geuze et al., 2012). Por otra parte, la aplicación de diferentes concentraciones del antagonista del GR, RU 38486, en la periferia y directamente en la BLA de ratas justo antes de ser entrenadas en el CMC, se observó un deterioro en la consolidación de la memoria en aquellos animales inyectados en la BLA (Figura 7), ya que se redujo el porcentaje de la conducta de congelamiento durante la prueba de retención efectuada 24 hr después del entrenamiento (Donley, Schulkin & Rosen, 2005).

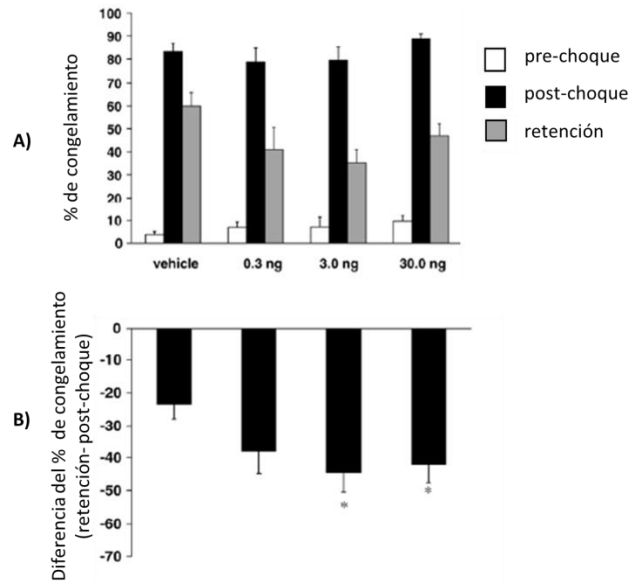


Figura 7. Deterioro de la memoria de largo plazo en el CMC después de la administración de diferentes dosis del antagonista a GR en la BLA. A) Porcentaje de congelamiento (media± S. E. M) durante los periodos de pre-choque, post-choque y retención. Los niveles de congelamiento en el pre-choque y el post-choque no fueron diferentes entre grupos. B) Diferencias del porcentaje de congelamiento entre el periodo de retención y de post-choque: las ratas que recibieron 3 ng ($n=10$) o 30 ng ($n=10$) del antagonista RU 38486 tuvieron un deterioro significativo en la memoria comparado con las ratas que recibieron el vehículo, propilenglicol al 100% ($n=13$), * $p < 0.05$. Las ratas que recibieron 0.3 ng del antagonista ($n=10$) no mostraron diferencias significativas en la diferencia del congelamiento. Modificado de Donley, Schulkin y Rosen (2005).

Por lo tanto, estos resultados señalan que el grado de emotividad o de estrés está relacionado con el nivel de GCs en circulación, cuya cantidad es muy importante para determinar la fuerza de asociación entre los estímulos asociados con el evento estresante durante el proceso de consolidación de memoria a largo plazo, y que se requiere de la activación del GR en la amígdala para la respuesta de congelamiento.

5. Justificación

La exposición de un animal a un evento emotivo o estresante se relaciona con la liberación de CORT, de forma que los niveles circulantes de esta hormona aumentan conforme incrementa la emotividad de dicho evento. Las experiencias con alto grado de emotividad se caracterizan por ser recuerdos de larga duración y que requieren de la activación del GR en la amígdala para su consolidación. Debido a que la fosforilación del residuo S211 de este receptor depende de la unión de CORT y es importante para la regulación de su actividad transcripcional, es interesante conocer si la intensidad del estímulo, y por consiguiente los niveles de CORT, afectan la densidad de GR fosforilado en la S211.

6. Hipótesis

1. La intensidad del choque eléctrico utilizado durante el entrenamiento en el CMC se relaciona directamente con la cantidad de CORT liberada a la circulación.
2. La cantidad de CORT liberada a la circulación durante el entrenamiento en el CMC se relaciona directamente con la densidad de GR fosforilado en el residuo S211 en la amígdala.
3. La cantidad de CORT liberada a la circulación y la densidad de GR fosforilado en el residuo S211 en la amígdala. se correlacionan con el desempeño conductual de los animales a lo largo de la tarea.

7. Objetivos

- General

Estudiar el efecto de la intensidad del choque eléctrico utilizado durante el entrenamiento de ratas en CMC sobre los niveles de CORT en circulación y la densidad de GR fosforilado en la S211 en la amígdala, así como su relación con el desempeño conductual de la tarea.

- Específicos

1. Entrenar ratas en la tarea de CMC con intensidades de choque eléctrico de 1.0 y 3.0 mA y medir la conducta de congelamiento a lo largo de la tarea de CMC.
2. Medir los niveles de CORT en suero de ratas entrenadas en la tarea de CMC utilizando las intensidades de choque eléctrico de 1.0 ó 3.0 mA.

3. Medir el porcentaje de GR fosforilado en el residuo S211, en la amígdala de ratas entrenadas en la tarea de CMC con las intensidades de choque eléctrico de 1.0 ó 3.0 mA.
4. Evaluar si existe correlación entre las mediciones conductuales y fisiológicas, en función de la intensidad del choque eléctrico utilizado durante el entrenamiento.

8. Materiales y métodos

Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM y se realizaron conforme a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, a las especificaciones para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y a las normas estipuladas en la “Guide for Care and Use of Laboratory Animals del NIH (ILAR, 1996)”.

Sujetos

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar (*Ratus norvegicus albinus*) adquiridas de la colonia del Instituto de Neurobiología, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Una vez en el bioterio del laboratorio, las ratas se mantuvieron en cajas de acrílico individuales (24 x 21 x 45 cm) con cama de aserrín, agua y comida disponible *ad libitum*, en un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 h (luz encendida a las 7:00 h) y a temperatura constante de 21 ± 1 °C. Los animales utilizados pesaron entre 250 y 350 gramos y fueron utilizados tres días después de su ingreso al bioterio, con la finalidad de que se aclimataran a las nuevas condiciones. Cada una de las ratas fue manipulada durante cinco minutos tres días previos al inicio de cada experimento para habituarlas al manejo humano.

Grupos y tratamientos

Las ratas fueron asignadas al azar a cada uno de los cuatro grupos experimentales (Tabla 1). El grupo llamado “Control” estuvo formado por siete ratas que fueron sacrificadas al día siguiente de la última sesión de manipulación para la obtención de muestras. Los tres grupos restantes estuvieron formados por 10 ratas que fueron entrenadas en la tarea de condicionamiento de miedo al contexto de una sesión bajo diferentes intensidades de choque eléctrico (“Entrenado sin choque” 0.0 mA, “Intensidad baja” 1 mA e “Intensidad alta” 3.0 mA), y por siete ratas para la obtención de muestras sanguíneas y cerebrales.

Tabla 1. Descripción de los grupos experimentales
Se incluye el número de individuos utilizados en cada tratamiento

Grupo	Individuos	Tratamiento
Control	7	- Manipulación - Sacrificio para la obtención de tejido
Entrenado sin choque (0.0 mA)	10	- Manipulación - Entrenamiento en presencia del contexto sin la aplicación de choque eléctrico, prueba de retención, y pruebas de extinción 1 y 2
	7	- Manipulación - Entrenamiento en presencia del contexto sin la aplicación de choque eléctrico - Sacrificio para la obtención de tejido
Intensidad baja	10	- Manipulación - Entrenamiento con choques de 1.0 mA, prueba de retención, pruebas de extinción 1 y 2
	7	- Manipulación - Entrenamiento con choques de 1.0 mA - Sacrificio para la obtención de tejido
Intensidad alta	10	- Manipulación - Entrenamiento con choques de 3.0 mA, prueba de retención, pruebas de extinción 1 y 2
	7	- Manipulación - Entrenamiento con choques de 3.0 mA - Sacrificio para la obtención de tejido

Prueba conductual de condicionamiento de miedo al contexto (CMC)

Los experimentos conductuales se realizaron entre las 8:00 y las 15:00 h en la mayoría de las ocasiones. Para cada uno de los días en los que las ratas fueron utilizadas, los animales se transportaron, de forma individual, desde el bioterio del laboratorio hacia una sala adyacente al cuarto de trabajo una hora antes y después del inicio y fin de su manipulación, respectivamente.

La cámara de condicionamiento de miedo al contexto se localiza dentro de un cuarto sonoamortiguado y bien iluminado. Las dimensiones de la cámara son de 45x45x30 cm (AccuScan Instruments, Inc) y está formada por paredes de acrílico, de las cuales, la superior es movable y es por donde se introduce a la rata, mientras que en las cuatro paredes verticales se localizan las claves contextuales que consisten en un patrón de líneas gruesas blancas y negras intercaladas. El suelo de la cámara está constituido por una rejilla de 17 barrotes de acero inoxidable de 0.5 cm de diámetro, separados una distancia de 1,5 cm entre ellos, que se

encuentran conectados a un generador de descargas eléctricas (Coulbourn, Modelo H13-15), el cual, está conectado en paralelo a una fuente de poder regulada (STEREN, Modelo PRLS DPS-123) y a un contador de intervalos, de tal forma que la administración de las descargas eléctricas se realiza a través de un sistema automático (Figura 8). En los costados de la cámara de condicionamiento están acopladas fotoceldas que funcionan como sensores de la actividad motora de las ratas, los cuales se encuentran conectados a una computadora para el procesamiento de la información mediante el programa VersaMax System (Accuscan Instruments, Inc., Columbus, Ohio, EUA).

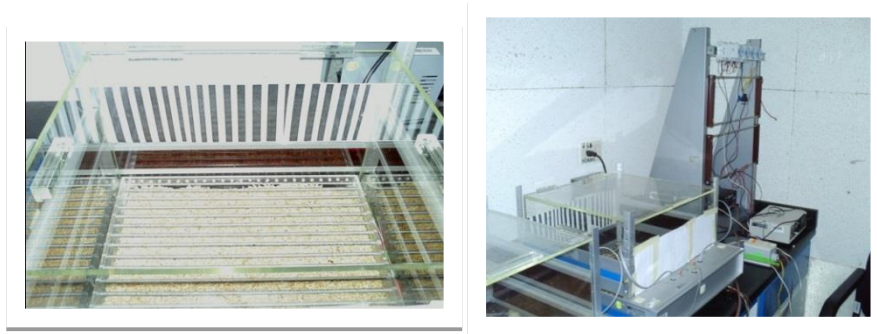


Figura 8. Cámara de CMC y aparatos de medición asociados. Fotografía de la cámara de condicionamiento y la clave contextual (izquierda), el generador de descargas eléctricas y el contador de intervalos (derecha).

En la sesión de entrenamiento cada uno de los animales ingresó a la cámara, siempre orientados de igual forma respecto a las claves contextuales. El protocolo consistió en tres minutos de exploración donde el animal recorre la base de la cámara y reconoce el contexto en el que se encuentra (periodo pre-choque) y siete minutos posteriores en los que se aplicaron choques eléctricos en la rejilla durante un segundo en cada minuto, que dependiendo de los grupos experimentales fue de 1.0 ó 3.0 mA de intensidad (periodo post-choque). Además se incluyó el grupo “Entrenado sin choques” (0.0 mA) que fue expuesto a la exploración de la cámara sin la aplicación de choques (Figura 9). La sesión finaliza un minuto después de la última descarga eléctrica, posteriormente el animal es retirado de la cámara y regresado a su caja individual. La sesión de retención se realizó 48 h después del día del entrenamiento siguiendo el protocolo anterior, pero sin la aplicación de los choques eléctricos. Las dos sesiones de extinción se realizaron cada 24 h a partir de la sesión de retención. Entre cada ensayo se limpiaron las paredes de la cámara y los barrotes de la rejilla con una solución de etanol al 10 % y de ácido acético al 1%.

Como medida del condicionamiento de las ratas, se midió el tiempo de congelamiento por minuto de cada una de las sesiones del CMC.

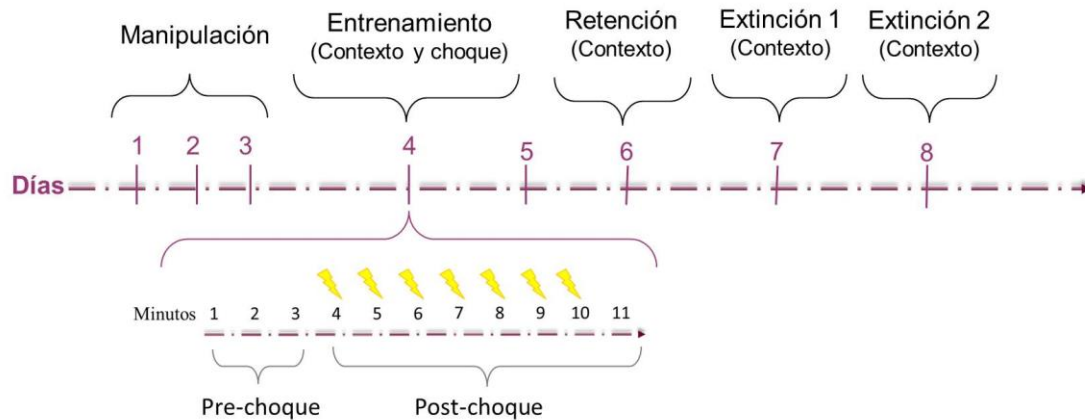


Figura 9. Diagrama del protocolo de CMC. Para cada uno de los grupos, las ratas se manipularon 5 min durante 3 días consecutivos. Al día siguiente se entrenaron en la tarea de CMC, cuya duración es de 11 min divididos de la siguiente forma: en los primeros 3 minutos (sesión de pre-choque) solo estuvo presente el contexto, y en los minutos 4-11 (sesión post-choque) se aplicaron choques eléctricos cada minuto durante 1 s, de intensidad de 0.0 mA para el grupo “entrenado sin choque”, de 1-0 mA para el grupo de “intensidad baja”, y de 3.0 mA para el grupo “intensidad alta”, con excepción del último minuto. La retención de las ratas se evaluó a las 48 h y posteriormente se realizaron dos pruebas de extinción cada 24 h después de la retención. Tanto en la retención como en las sesiones de extinción, solo está presente el contexto en la cámara de condicionamiento.

Obtención de muestras

Para la colecta de sangre y la obtención de tejido cerebral, se sacrificaron a las ratas por decapitación (Figura 10). En el caso del grupo Control, el sacrificio se realizó al día siguiente de la manipulación y para el resto de los grupos se efectuó 15 min después de la sesión de entrenamiento. Inmediatamente se colectó la sangre en tubos de vidrio estériles sin heparina a temperatura ambiente. Al mismo tiempo, se extrajo el cerebro y se colocó en una matriz de disección de cerebro de rata colocada sobre hielo; con el uso de navajas, se efectuaron cinco cortes: el primero en el bulbo olfatorio (BO), los dos siguientes fueron a la tercera y a la quinta ranura posterior al BO (de esta rebanada se extrajo el estriado), el cuarto se realizó en la hipófisis y el último dos ranuras posteriores al corte anterior (de esta rebanada se extrajo la amígdala). Para ambas estructuras, la extracción fue bilateral, juntando en un solo tubo tipo Eppendorf las muestras de ambos hemisferios.

Para la obtención del suero, las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 30 min con una temperatura de 4 °C, el sobrenadante fue colectado en tubos Eppendorf y centrifugados a 250 rpm durante 10 min., el nuevo sobrenadante se almacenó en tubos Eppendorf a -80 °C. Las muestras de amígdala fueron almacenadas de forma individual a -80 °C inmediatamente después de su extracción para su uso posterior.

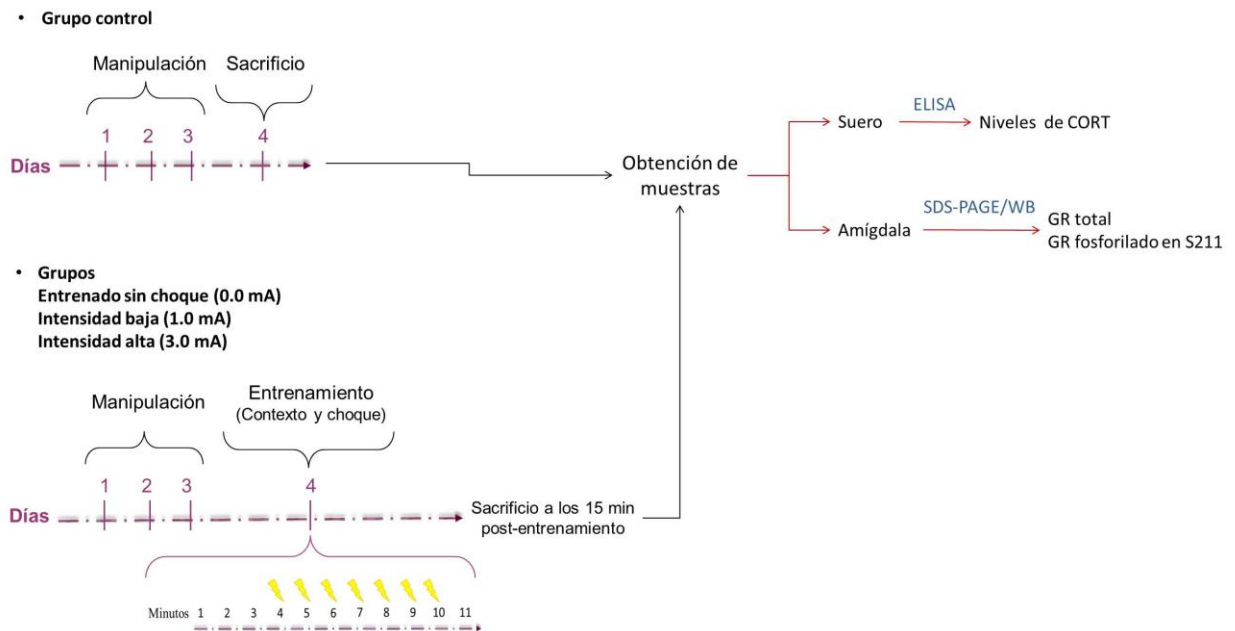


Figura 10. Diagrama del protocolo para la obtención de muestras. Para el grupo control, las ratas fueron sacrificadas al día siguiente de la última sesión de manipulación. Para los grupos: entrenado sin choque, intensidad baja e intensidad alta, las ratas se manipularon y se entrenaron siguiendo el mismo protocolo del CMC, y se sacrificaron 15 min post-entrenamiento. El sacrificio se realizó por el método de decapitación e inmediatamente se colectó la sangre y se extrajo la amígdala. Con las muestras de sangre se obtuvo el suero y se midieron los niveles de CORT con el método de ELISA, mientras que con el tejido de amígdala se midieron los niveles de GR total y de GR fosforilado en la S211 mediante las técnicas de SDS-PAGE y western-blot (WB).

Cuantificación de corticosterona en suero

Para la medición de los niveles de CORT en cada uno de los grupos las muestras de suero fueron analizadas con el método de ELISA utilizando el kit comercialmente disponible Corticosterone EIA Kit (ENZO LIFE SCIENCE INT'L INC., Pennsylvania, EUA). La descripción en detalle de la composición de las soluciones utilizadas se puede consultar el Apéndice-A. El protocolo consiste en colocar 100 µL de las soluciones estándar y de las muestras de suero diluidas en cada contenedor de la placa, todas por duplicado, seguido de 50 µL de la

solución conjugado y de anticuerpo. La placa fue incubada durante 2 h a temperatura ambiente y con agitación constante, posteriormente se le hicieron tres lavados para eliminar el exceso de esteroides no unidos. Se agregaron 200 μ L del substrato a cada contenedor y la reacción se detuvo después de 1 h con la solución de paro. Para la lectura de la densidad óptica de la placa, se utilizó un lector de absorbancia de microplacas (iMark, BIO-RAD, EUA) a 405 nm, con una corrección de entre 570-590 nm. El anticuerpo presenta reactividad cruzada con corticosterona (100 %), deoxicorticosterona (28.6 %) y progesterona (1.7 %), así como con otros compuestos (<1 %).

Medición de los niveles de GR fosforilado

Para conocer los detalles de la composición de las soluciones utilizadas se puede consultar el Apéndice B. Los extractos de tejido de amígdala se mantuvieron en hielo y fueron homogenizados con amortiguador de lisado RIPA 1x (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers MA, EUA) preparado con el inhibidor de proteasas COMPLETE 1x, utilizando un volumen proporcional a la cantidad de tejido. Posteriormente los tejidos se sonificaron durante 5 min en baño maría y se agitaron durante 2 h a 7 °C. Las muestras se centrifugaron a 10,000 g durante 15 min a 4 °C, se aisló el sobrenadante y se mantuvo a 4 °C. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford y se seleccionó el volumen necesario de cada muestra que correspondiera a una concentración de 50 μ g de proteína total, el resto se almacenó a -80 °C para su uso posterior. Cada muestra fue estabilizada agregándole el volumen correspondiente de la solución amortiguadora (1.0 mL TRIS-HCl 1.5 M pH 8.8, 0.8 mL glicerol, 1.6 mL SDS 10 %, 0.2 mL azul de bromofenol 0.05 %, 4 mL agua destilada) para un total de 20 μ L, y se colocaron en baño maría durante 5 min.

Para la electroforesis se utilizaron geles pre-formados de poliacrilamida al 10 % Mini-PROTEAN TGX Precast Geles (BIO-RAD; CA, EUA) de 10 pozos. Como marcador de peso molecular se emplearon los estándares de 10-250 kD, Precision Plus Protein Kaleidoscope (BIO-RAD; CA, EUA); se utilizaron 7 μ L del marcador mezclado con 13 μ L de la solución amortiguadora utilizada en la preparación de las muestras. Cada gel incluyó muestras de todos los grupos de ratas, que fueron cargadas en los carriles en el orden siguiente: marcador de peso molecular, grupo control (únicamente manipulado), grupo de 0.0 mA, grupo de 1.0 mA y grupo de 3.0 mA. Una vez que el gel estuvo cargado con el marcador y las muestras, a la cámara de

electroforesis se le agregó la solución amortiguadora de corrida (15 gr/L TRIS-base 0.025 M, 72 gr/L glicina, 5 gr/L SDS, pH 8.3) y se corrió a 100 V durante 1 h y 30 min aproximadamente, en hielo.

Una vez terminada la electroforesis, se equilibraron el gel y la membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD; CA, EUA) con amortiguador de transferencia (25 mM TRIS, 192 mM glicina, 20 % metanol, pH 8.3) dos veces, la primera durante 5 min y la segunda durante 10 min. Al mismo tiempo se remojaron las fibras y el papel filtro en el amortiguador de transferencia. Se colocó un refrigerante y un agitador electromagnético dentro de la cámara y se dejó correr a 200 mA durante 1 h. Al terminar, la membrana se colocó en TBS 1x (100 nM TRIS, 2.5 M NaCl, pH 7.5) y se agitó durante 10 min. Para el bloqueo, la membrana se expuso a la solución bloqueadora (BIO-RAD) al 5 % en TBS 1x durante 1 h en agitación. Posteriormente, la membrana se lavó con TTBS 1x (TBS + Tween al 20 %) tres veces durante 10 min cada uno, en agitación.

Para la detección de GR y de GR fosforilado en la serina 211 (P-S211), se utilizaron los anticuerpos primarios GR-H300: sc-8992 (Santa Cruz Biotechnology, INC; CA, EUA) y Phospho GR (Ser 211) (Cell Signaling TECHNOLOGY; Danvers MA, EUA) respectivamente, ambos anticuerpos policlonales de conejo. Como control de carga, se utilizó el anticuerpo monoclonal contra actina sc-58673 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC; CA, EUA). Todos los anticuerpos se prepararon, por separado, en una solución con TTBS 1x y solución bloqueadora al 1 %, diluidos de la siguiente manera: 1:2000 para el GR-H300, 1:1000 para el GR fosforilado y 1:1000 para el anticuerpo anti actina. La incubación de la membrana con cada uno de los tres anticuerpos se realizó durante toda una noche. Al terminar la incubación, la membrana se lavó tres veces con TTBS 1x, 10 min cada lavado.

Como anticuerpo secundario para los anticuerpos GR-H300 y Phospho GR, se utilizó el anti IgG de conejo hecho en cabra y conjugado con peroxidasa, a una dilución de 1:3000 en TTBS + leche al 1 %. Como anticuerpo secundario para el anticuerpo contra actina se utilizó el anticuerpo de ratón sc-58673 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC; CA, EUA), a una dilución de 1:3000. La incubación de la membrana con ambos anticuerpos fue de 2 h en agitación constante. Posteriormente, se le hicieron 3 lavados con TTBS 1x y 3 con TBS 1x, de 10 min cada uno.

Como sustrato de revelado se utilizaron los reactivos de detección ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham; Buckinghamshire, UK), mezclando las soluciones 1 y 2 en una

proporción 1:1 (4 mL totales por membrana). Se colocó la membrana en una bolsa de plástico y posteriormente la solución substrato, se incubó por 5 min y se evitó la formación de burbujas sobre la membrana. En un cuarto oscuro, se colocó la bolsa con la membrana en un cassette de revelado y encima se colocó la placa radiográfica Hyperfilm ECL (Amersham; Buckinghamshire, UK). El tiempo de exposición varió de acuerdo al anticuerpo primario utilizado: 1 min para la detección de GR-H300 y de actina tipo GBX, y 1 hr para Phospho GR. Para el revelado, se prepararon las soluciones reveladora y fijadora (Kodak), según lo indican los fabricantes. Inmediatamente después de la exposición al sustrato, la placa se sumergió en el siguiente tren de soluciones: 1 min en la solución reveladora, 1 min de enjuague en agua, 1 min en la solución fijadora y 1 min de enjuague en agua. Finalmente, la placa se dejó secar y se analizó por densitometría, utilizando el programa Image Lab (BIO-RAD).

Análisis estadístico

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

Sesión conductual de CMC: Para cada una de las intensidades de choque, se graficó la media \pm error estándar (EE) del porcentaje de congelamiento de los minutos 1-3 de la sesión de entrenamiento (sesión de pre-choque), de los minutos 4-11 de la sesión de entrenamiento (sesión de post-choque), de los once minutos de la sesión de retención, y de los once minutos de cada una de las sesiones de extinción. Para el análisis estadístico se realizó una comparación entre los grupos utilizando el análisis de varianza (ANDEVA) de medidas repetidas donde los factores fueron: A, la sesión conductual (pre-choque, post-choque, retención, extinción 1 y extinción 2) y B, la intensidad del choque (0.0, 1.0 y 3 mA). Como prueba post-hoc se utilizó el método de Bonferroni, con una $p \leq 0.05$.

Cuantificación de CORT en suero: Se graficó la media \pm EE de la concentración de hormona (ng/L) para cada grupo de ratas y se realizó una prueba ANDEVA de una vía donde el factor fue la intensidad del choque (Control, 0.0, 1.0 y 3 mA). Como prueba post-hoc se utilizó el método de Bonferroni, con una $p \leq 0.05$.

Medición de los niveles de GR total y fosforilado: Para cada grupo se graficó la media \pm EE de la densidad de la señal de banda de proteína. El análisis estadístico se realizó con la prueba

ANDEVA de una vía donde el factor fue la intensidad del choque (Control, 0.0, 1.0 y 3 mA). Como prueba post-hoc se utilizó el método de Bonferroni, con una $p \leq 0.05$.

Análisis de correlación entre las variables medidas: Se compararon las mediciones del porcentaje de congelamiento de la sesión de post-choque, los niveles de CORT en suero, la densidad óptica de GR total y de GR fosforilado, así como el porcentaje de GR fosforilado, utilizando el método de análisis del coeficiente de correlación producto-momento de Pearson, con una $p \leq 0.05$.

9. Resultados

Condicionamiento de Miedo al Contexto

Se entrenaron ratas en la tarea de CMC utilizando intensidades de choque eléctrico de 0.0, 1.0 y 3.0 mA. Para cada uno de estos grupos, el análisis conductual se realizó tomando en cuenta el porcentaje del tiempo de congelamiento de los minutos de las sesiones de la tarea de aprendizaje: pre-choque, post-choque, retención, extinción 1 y extinción 2. Se observó un efecto global entre las intensidades ($F_{2, 27} = 16.48, p < 0.001$) a lo largo de la tarea, así como diferencias estadísticamente significativas entre las sesiones ($F_{4, 27} = 28.145, p < 0.001$) y un efecto en la interacción ($F_{8, 27} = 4.065, p < 0.001$).

La cámara es un ambiente nuevo para las ratas y es de esperarse que la exploren libremente durante la sesión de pre-choque, haciéndose evidente en la carencia de diferencias entre intensidades (Figura 11). Durante el condicionamiento o la sesión de post-choque, la aplicación de los choques eléctricos resultó en un aumento significativo del tiempo de congelamiento respecto al grupo entrenado con 0.0 mA y no se observaron diferencias entre las intensidades de 1.0 y 3.0 mA. Este comportamiento se mantuvo en la sesión de retención realizada 48 h después del entrenamiento, sin embargo, se observa una ligera separación entre las dos intensidades, de forma que la conducta de las ratas entrenadas con 1.0 mA tendió al comportamiento del grupo control, es decir, se encontraban en proceso de extinción, mientras que las de 3.0 mA mantuvieron niveles altos de congelamiento.

La diferencia conductual entre los grupos de 1.0 y 3.0 mA se hizo evidente hasta la primera sesión de extinción, en la que las ratas entrenadas con la intensidad de choque baja completaron este proceso y se comportaron de igual forma que las del grupo de 0.0 mA. En el caso del grupo entrenado con la intensidad de choque alta, la extinción se observó hasta las siguientes 24 h, ya que es hasta este periodo en donde se descarta cualquier diferencia significativa en el tiempo de congelamiento con el resto de los grupos (0.0 vs 1.0 mA, $t = 1.84, p = 0.201$; 0.0 vs 3.0 mA, $t = 0.950, p = 1.00$; 1.0 vs 3.0 mA, $t = 0.897, p = 1.00$)

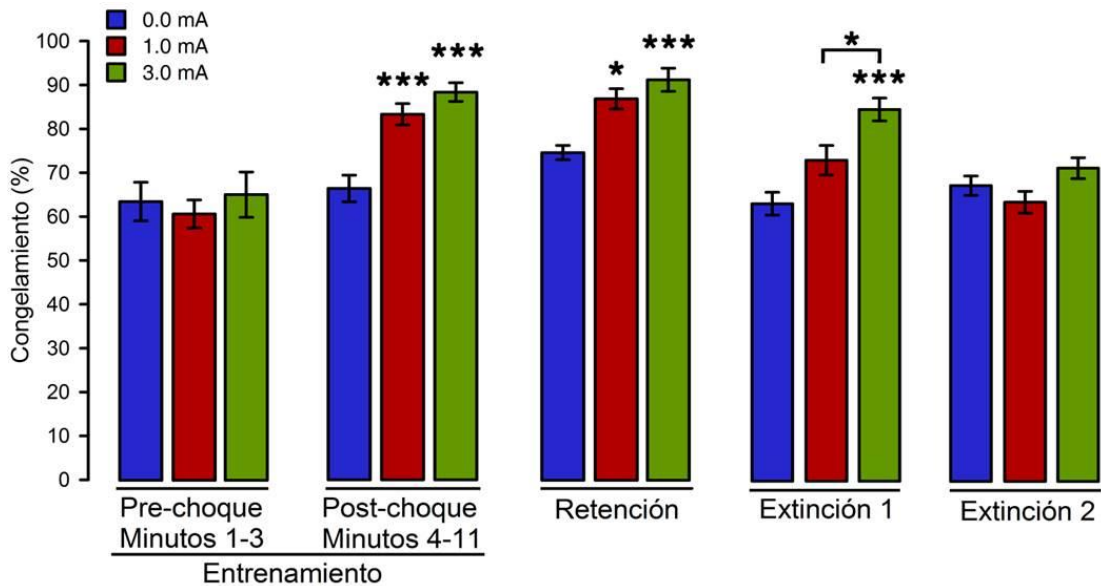


Figura 11. Porcentaje de congelamiento de las diferentes sesiones de la tarea de CMC. Se muestra el promedio del porcentaje de congelamiento de cada intensidad de choque, 0.0, 1.0 y 3.0 mA, en las sesiones de Pre-choque (promedio de los minutos 1-3 de la sesión de entrenamiento), post-choque (promedio de los minutos 4-11 de la sesión de entrenamiento), retención (promedio de los 11 minutos de esta sesión, efectuada 48 h después del entrenamiento), extinción 1 (promedio de los 11 minutos de esta sesión, efectuada 24 h después de la retención) y extinción 2 (promedio de los 11 minutos de esta sesión, efectuada 24 h después de la extinción 2). Los resultados están representados como la media \pm EE. Análisis estadístico utilizando ANDEVA de dos vías de medidas repetidas (Factor A, Intensidad del choque (0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA); Factor B, sesión de la tarea (pre-choque, post-choque, retención, extinción 1 y extinción 2)). Se utilizó el método de Bonferroni como prueba post-hoc. Diferencia significativa de los grupos 1.0 y 3.0 mA vs el grupo de 0.0 mA (***, $p < 0.001$); diferencia significativa del grupo 1.0 mA vs el grupo de 0.0 mA, y del grupo 3.0 mA vs el grupo de 3.0 mA (*, $p < 0.05$). Se utilizó una $n = 10$ en todos los grupos.

Medición de los niveles de CORT

Se sabe que dependiendo de la intensidad del estímulo estresante varían los niveles de CORT circulantes de ratas entrenadas en diferentes tareas de aprendizaje, incluido el CMC, por lo que para determinar si esta relación se aplica a nuestras condiciones de condicionamiento, se midieron los niveles de CORT en suero para ratas del grupo “control” (sacrificadas un día después de la última sesión de manipulación) y de los grupos 0.0, 1.0 y 3.0 mA (sacrificadas 15 min después del entrenamiento). Se encontró un efecto global entre los grupos ($F_{3,24} = 15.36$, $p < 0.001$), siendo todos diferentes al grupo control, incluso el entrenado sin choque eléctrico. Sin embargo, el único grupo que presentó diferencias con el resto de las intensidades fue el de la intensidad alta [Control vs 3.0 mA, $t = -4.488$, $p < 0.001$; 0.0 vs 3.0 mA, $t = -3.768$, $p < 0.01$; 1.0 vs 3.0 mA, $t = -3.609$, $p < 0.01$] (Figura 12).

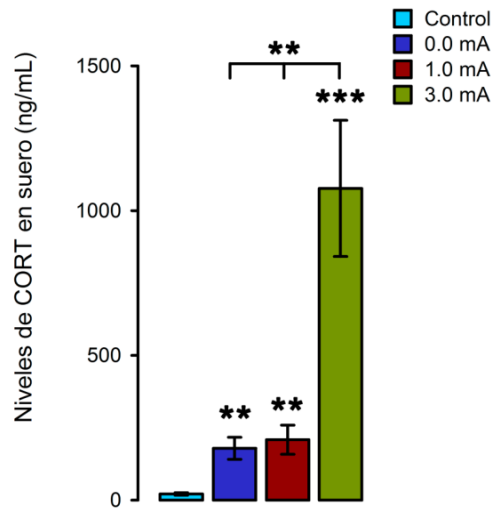


Figura 12. Niveles de CORT. Concentración de CORT en suero (ng/L) obtenido un día después de la última sesión de manipulación para el grupo Control, y 15 min después del entrenamiento de los grupos: 0.0, 1.0 y 3.0 mA. Los resultados están representados como la media \pm EE. Análisis estadístico utilizando ANDEVA de una vía y el método de Bonferroni como prueba post-hoc. *** ($p < 0.001$), ** ($p < 0.01$) respecto al grupo control, para las comparaciones indicadas. $n = 7$ en todos los grupos.

Medición de los niveles de GR fosforilado

El GR presenta diferencias en el patrón de fosforilación dependiendo del estado en el que se encuentre, activo y no activo, permitiendo el desarrollo de anticuerpos específicos para el GR en sus dos conformaciones. Uno de estos anticuerpos es selectivo para el receptor fosforilado en el residuo S211, cuyo análogo en rata es S232, y que como se dijo anteriormente, es un residuo clave para la actividad del GR en presencia de CORT. Al calcular los niveles de GR total (fosforilado y no fosforilado) y de GR fosforilado en la amígdala, se encontró que ambas mediciones son iguales en todos los grupos (Figura 13-A, B), aunque se observa una ligera tendencia en aumentar la conformación fosforilada del GR con las intensidades de 0.0, 1.0 mA y 3.0 mA. Al extraer el porcentaje de GR fosforilado de la cantidad de GR total, se observan diferencias entre el control y el resto de los grupos [Control vs 0.0 mA, $t = -3.075$, $p < 0.05$; Control vs 1.0 mA, $t = -2.505$, $p < 0.05$; Control vs 3.0 mA, $t = -2.819$, $p < 0.05$], (Figura 13-C).

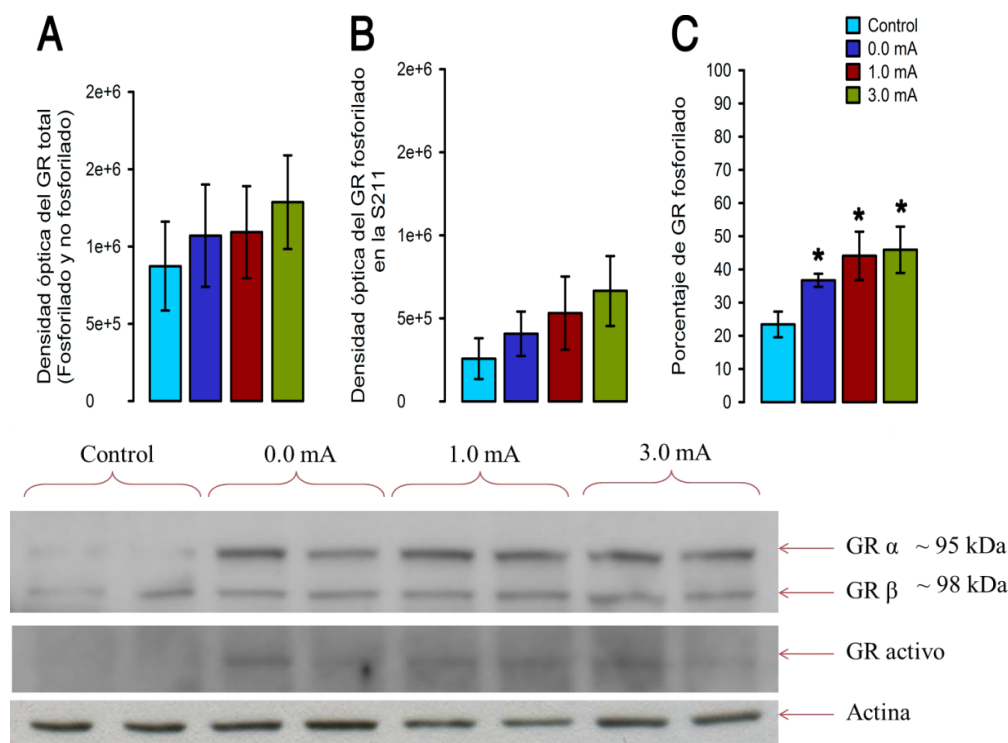


Figura 13. GR total y GR fosforilado en la amígdala. A) Cantidad de GR total (fosforilado y no fosforilado), y las isoformas α y β) cuantificado por densidad óptica de la banda. B) Cantidad de GR fosforilado, cuantificado por densidad óptica de la banda. C) Porcentaje de GR fosforilado (respecto del total, tomando en cuenta ambas isoformas). En la parte inferior se muestran los resultados de un WB representativo: las bandas corresponden al GR total (isoformas α y β), al GR fosforilado y a actina como control de carga. Cada carril corresponde a un animal diferente, de tal forma que los dos primeros son muestras de amígdala de ratas control (únicamente manipuladas) los dos siguientes son ratas entrenadas sin choque eléctrico (0.0 mA), posteriormente son ratas entrenadas con 1.0 mA y los dos últimos son ratas entrenadas con 3.0 mA. Los resultados están representados como la media \pm EEM. Análisis estadístico utilizando ANDEVA de una vía y Bonferroni como prueba post-hoc, * ($p < 0.05$) respecto al grupo control; $n = 6$ en todos los grupos.

Al realizar el análisis de correlación de los valores del porcentaje de congelamiento de la sesión de post-choque con los niveles de CORT en suero y las mediciones del GR para los grupos que fueron entrenados en la cámara de condicionamiento con las distintas intensidades de choque, no se observa correlación con CORT, $r(21) = 0.199$, $p = 0.388$, ni con los valores del GR total, $r(18) = 0.419$, $p = 0.0832$. Sin embargo, sí se relacionan con los valores de la densidad de GR fosforilado en la S211, $r(18) = 0.503$, $p = 0.033$ (Figura 14-A). Al correlacionar los valores de CORT de todos los grupos, incluyendo al grupo control (no manipulado), con la cantidad de GR total y fosforilado, se observa que la cantidad de hormona en suero influye de forma directa con la cantidad de GR total [$r(24) = 0.451$, $p = 0.0269$] y de GR fosforilado en S211 [$r(24) =$

0.612, $p = 0.0014$], así como con el porcentaje de GR fosforilado [$r(24) = 0.602$, $p = 0.0018$] (Figura 14-B, C, D).

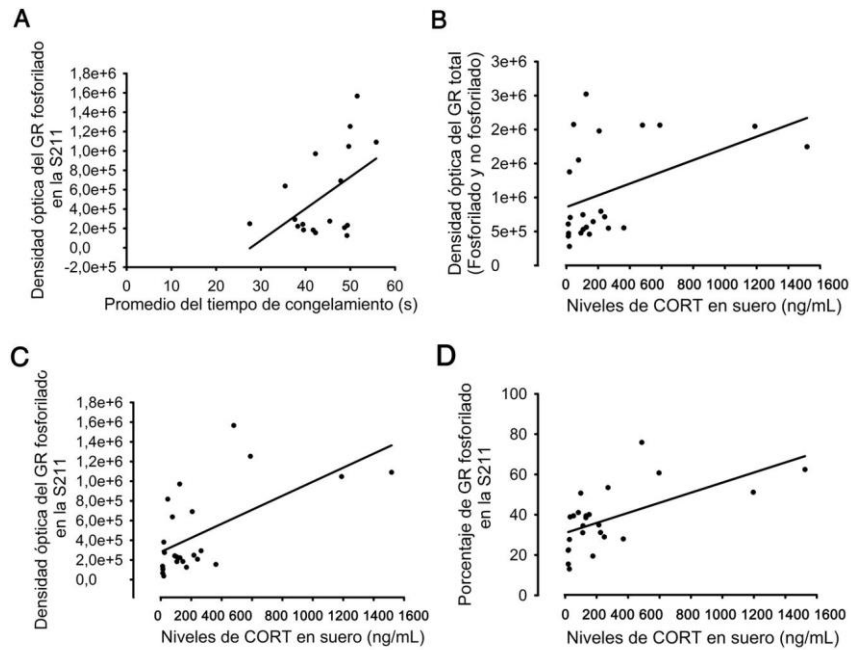


Figura 14. Correlaciones de Pearson entre algunas variables medidas. A) Representación de la correlación del porcentaje de congelamiento de la sesión de post-choque con la densidad óptica del GR fosforilado en la S211 en los grupos entrenados con las diferentes intensidades de choque (0.0, 1.0 y 3.0 mA). B-D) Representación de la correlación de los niveles de CORT con las distintas mediciones del GR: B, densidad óptica del GR total (fosforilado y no fosforilado); C, densidad óptica del GR fosforilado; y D, porcentaje de GR fosforilado en la S211. Se tomaron en cuenta los grupos: Control (únicamente manipulado), 0.0, 1.0 y 3.0 mA.

10. Discusión

Los resultados conductuales indican que las ratas entrenadas en la tarea de CMC con diferente intensidad de choque eléctrico aprenden y retienen de igual forma, debido a que los grupos de 1.0 y 3.0 mA muestran niveles similares de porcentaje de congelamiento, pero difieren en el tiempo de extinción. Usualmente, los sujetos “normales” que son entrenados en el CMC, muestran porcentajes de congelamiento alrededor del 10 % durante la sesión de pre-choque (Conrad et al., 2004; Cordero, Merino, & Sandi, 1998; Maren & Holt, 2004) y del 60 - 80 % en la sesión de post-choque utilizando la intensidad de 1.0 mA durante el entrenamiento (Cordero et al., 1998; Goosens & Maren, 2001.; Schutsky, Ouyang, Castelino, Zhang, & Thomas, 2011; Sullivan et al., 2004), sin embargo, estos valores varían dependiendo del protocolo y de la cepa utilizada. En este trabajo, las ratas mostraron porcentajes altos de congelamiento desde la sesión de pre-choque (~ 60%) sin importar la intensidad del choque, mientras que las ratas entrenadas con 1.0 tienen valores por encima del 80% de la sesión de post-choque. A pesar que se ha demostrado que la exposición al contexto durante la sesión de pre-choque facilita el condicionamiento de miedo (Rudy & O'Reilly, 1999), diversos reportes en los que se utiliza el CMC dentro de los protocolos, incluyen un día de exploración de la cámara de condicionamiento antes de someter a los animales a la sesión de entrenamiento, esto con el objetivo de habituarlos al estrés generado por un ambiente nuevo, que consiste en la presentación de un animal a componentes que normalmente no están en su ambiente natural y que funcionan como agentes estresantes (Pagé & Cooper, 2004), de forma que cualquier efecto sobre la respuesta de miedo sea debido a la aplicación del choque y no a la exposición a un ambiente novedoso (Ferreira, Moreira, Ikeda, Bueno, & Oliveira, 2003; Morgan & LeDoux, 1995; Phillips & LeDoux, 1992). Basándonos en esto, proponemos la incorporación de un día de exploración de la cámara para disminuir los niveles de congelamiento observados en la sesión de pre-choque y asegurar que la medición de la respuesta de miedo se deba únicamente a la aplicación del choque.

En cuanto al grupo de ratas entrenadas con la intensidad de 3.0 mA, esperábamos encontrar valores de congelamiento mayores al grupo de 1.0 mA, pero a pesar de que fueron significativamente diferentes al grupo entrenado sin choque, los valores entre ambos grupos fueron muy similares. Es muy raro encontrar reportes en la literatura donde utilicen 3.0 mA en el entrenamiento de animales en una tarea de aprendizaje, sin embargo, existe un estudio en donde se midió la magnitud de las respuestas de sobresalto y de congelamiento utilizando choques de

1.0 y de 3.0 mA, y lo que se observó fue un efecto en forma de U invertida sobre ambas respuestas, en la que intensidades altas de choque inducen su atenuación (Leaton & Borszcz, 1985; Witnauer, J. E. & Miller, 2014), por lo que es probable que estemos observando este fenómeno con las condiciones utilizadas en nuestro trabajo. Así también, no se descarta la idea de que 3.0 mA fue un choque doloroso de intensidad tan alta que permitió la asociación del contexto, ya que se observaron las etapas de retención y de extinción, pero que también indujo la activación de respuestas de miedo debidas al dolor que contrarrestaron a la respuesta de congelamiento, por lo que no se observaron porcentajes mayores a las obtenidas con el grupo de 1.0 mA.

Los resultados de las mediciones de CORT tampoco permiten establecer una relación proporcional entre la intensidad del choque y los niveles de hormona, ya que únicamente intensidades altas inducen un cambio considerablemente mayor de CORT. Respecto al grupo entrenado sin choque, pareciera que la simple experiencia de estar en la cámara de condicionamiento afecta los niveles de hormona, asemejándose a la exposición a un ambiente novedoso. Se ha encontrado que dicho estrés provoca un aumento de 3 a 5 veces respecto a los niveles basales de CORT en suero de ratas expuestas a la tarea de campo abierto (Weinstock et al., 1992). En el caso del CMC, se ha encontrado que los niveles de CORT medidos durante la sesión de pre-choque son de aproximadamente 200 ng/mL, que es un valor mayor al que se observa en estado de reposo, pero no alcanza niveles tan altos como los que se obtienen 2-3 min después de la aplicación de los choques (Weinstock et al., 1998). En nuestro caso, este mismo efecto se observó en el grupo de ratas entrenadas con 0.0 mA, a las que el cambio de las cajas individuales hacia la cámara, es decir, hacia un entorno nuevo, les genera un tipo de estrés que resulta en una concentración de CORT cercana a 180 ng/mL, que es mayor a la del grupo Control pero que es similar a la que se observó en el grupo entrenado con la intensidad de 1.0 mA. De hecho, no existen diferencias significativas entre estos dos grupos, lo que va en contra de la varios reportes, en los que se encuentran diferencias entre los niveles de hormona en suero entre intensidades de choque que varían en un rango de 0.0 a 1.0 mA (Cordero et al., 1998; Luyten, Vansteenwegen, van Kuyck, Deckers, & Nuttin, 2011; Phillips & LeDoux, 1992). Debido a que el grupo Control (únicamente manipulado) presentó niveles de hormona característicos del estado de reposo, la sesión de manipulación y el método de sacrificio no fueron factores que influenciaron la falta de diferencias en la concentración de CORT entre los grupos de 0.0 y 1.0

mA, lo que sugiere que fueron las condiciones del paradigma de CMC las que no permitieron generar diferencias en la concentración de los niveles de hormona entre ambas intensidades, tales como la incapacidad de regular la frecuencia del choque (en unidades de hertz) en el generador de corriente o las grandes dimensiones de la caja de condicionamiento respecto a las usualmente reportadas en la literatura, que impide la aplicación de un choque uniforme a lo largo de la gradilla donde se encuentra el animal.

Las ratas entrenadas con la intensidad de 3.0 mA tuvieron un retardo en la extinción y fueron los únicos que mostraron valores de CORT significativamente mayores al resto de las intensidades. Estos resultados pueden estar asociados, ya que se sabe que dependiendo de la intensidad y la duración del estrés es el tipo de efecto fisiológico provocado, de tal forma que niveles bajos de estrés inducen alteraciones transitorias en los sistemas motivacionales y emocionales que influyen en procesos cognitivos; niveles moderados inducen modificaciones duraderas relacionadas con la plasticidad sináptica, como la LTP; niveles altos estimulan cambios morfológicos permanentes, tales como el aumento en la arborización dendrítica y cambios en el soma; mientras que niveles crónicos de estrés causan neurotoxicidad (Kim & Yoon, 1998). Estudios donde se ha medido la cinética de la hormona en suero indican que los niveles son mayores en un lapso de 10 a 15 min después de un evento estresante, y que permanecen elevados durante 30 min (Báez et al, 1996). Por lo tanto, es muy probable que la CORT liberada después del entrenamiento con la intensidad de 3.0 mA indujo la formación de cambios plásticos durante este periodo de tiempo, y que estos cambios se mantuvieron hasta el tiempo en el que se observó la extinción.

Se sabe que para generar la conducta de congelamiento en el CMC se requiere de la activación del GR en el núcleo lateral. En el presente trabajo observamos señal de la presencia del GR total (fosforilado y no fosforilado) y del GR activo (fosforilado en la S211), pero no encontramos diferencias entre la densidad de la señal entre todos los grupos de ratas. Sin embargo, al obtener el porcentaje de GR activo, resultaron diferencias significativas de todas las intensidades con el grupo control, pero no entre intensidades, además de que también se observó el efecto estresante ejercido por la cámara de condicionamiento sobre la activación del GR, ya que las ratas entrenadas con 0.0 mA mostraron un aumento en la fosforilación del GR, que de acuerdo a los antecedentes, sucede al aumentar la concentración de CORT debido a estrés. Esto permite establecer que el contexto utilizado en el CMC, ya sea la luz del cuarto donde se realizó

el condicionamiento o el patrón de rayas dispuesto en la cámara, o ambos, no son estímulos neutros adecuados para funcionar como EC. Otra posible razón por la que no se encuentran diferencias en el porcentaje de fosforilación del GR entre los grupos entrenados con las diferentes intensidades, es el periodo de tiempo posterior al entrenamiento en el que se obtuvieron las muestras. Diversos reportes en donde miden la cinética de fosforilación del residuo S211, han observado que la señal aumenta en un lapso de 30 min a 1 h después del tratamiento con algún agonista, teniendo el pico máximo entre las 2 y 3 h (Lamber et al 2013; Blind & Garabedian, 2008), por lo que es probable que no se dio el tiempo suficiente para completar la fosforilación del GR.

Es de destacar que la medición de la fosforilación involucra únicamente al residuo S211 en humanos), que si bien ha sido considerado como un elemento clave para la regulación transcripcional que ejerce el GR, existen otros aminoácidos que sufren esta modificación en el receptor, tales como la S203 y S226, cuyas funciones son igual de importantes para su actividad. Se sabe que hay diferencias en el requerimiento de ciertos residuos fosforilados para la regulación de genes específicos, es decir, existen isoformas del GR que son reclutadas de forma diferencial y de una forma gene específica (Blind & Garabedian, 2008), de hecho, cabe la posibilidad de que en estado basal existan subpoblaciones de GR con distintas combinaciones de residuos fosforilados, y que la hiperfosforilación inducida por la hormona altere la distribución de estas subpoblaciones (Bodwell, et al., 1995). Por lo tanto, debido a que el presente trabajo no considera a todos los residuos principales del GR que se fosforilan en presencia de ligando y que son importantes para regular su actividad, no se descarta la posibilidad de que el efecto del entrenamiento con diferentes intensidades de choque se relacione con la fosforilación del GR en otro residuo.

11. Conclusión

Con las condiciones utilizadas durante el desarrollo de la tarea de CMC y los parámetros de medición de hormona y de receptor que se utilizaron en este trabajo, se encontró que los eventos aversivos con diferente grado de emotividad tienen la misma adquisición y retención, pero difieren en el proceso de extinción de forma proporcional a la intensidad del estímulo estresante. El desempeño conductual de los animales debido a la intensidad de choque eléctrico

utilizado durante el entrenamiento no se relaciona con la cantidad de CORT liberada en suero, ni con la densidad de GR fosforilado en la S211.

12. Perspectivas:

- Incluir una sesión de exploración de las ratas en la cámara de condicionamiento, un día antes de la sesión de entrenamiento, con el objetivo de disminuir los niveles basales de porcentaje de congelamiento.
- Medir los niveles de fosforilación del GR a los 30 y 60 min después del entrenamiento de la tarea de CMC en cada una de las intensidades de choque para contemplar la cinética de fosforilación de forma más detallada.
- Con las mismas intensidades de choque utilizadas en el presente trabajo, medir la densidad de GR fosforilado en otro(s) residuo(s) importante(s) en el funcionamiento del receptor, tales como la S203 y la S226 que poseen un efecto diferente sobre la actividad del GR. De esta forma se distinguiría el tipo de regulación transcripcional que realiza el receptor en relación con la intensidad de choque utilizado durante el entrenamiento del CMC.
- Realizar estudios de PCR en genes que se sabe son regulados por el GR, para saber si su expresión se modifica en la amígdala debido al entrenamiento en el CMC, y sí esto depende de la intensidad del choque.

13. Referencias bibliográficas

- Adzic, M., Djordjevic, J., Djordjevic, A., Niciforovic, A., Demonacos, C., Radojicic, M., & Krstic-Demonacos, M. (2009). Acute or chronic stress induce cell compartment-specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alter its transcriptional activity in Wistar rat brain. *The Journal of Endocrinology*, 202(1), 87-97.
- Baez, M., Siriczman, I., & Volosin, M. (1996). Corticosterone is involved in foot shock-induced inactivity in rats. *Physiology & Behavior*, 60(3), 795-801.
- Blind, R. D., & Garabedian, M. J. (2008). Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 109(1-2), 150-157.
- Bodwell, J. E., Hu, J. M., Orti, E., & Munck, A. (1995). Hormone-induced hyperphosphorylation of specific phosphorylated sites in the mouse glucocorticoid receptor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 52(2), 135-140.
- Buckingham, J. C. (2006). Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *British Journal of Pharmacology*, 147 Suppl 1, S258-268.
- Conrad, C.D., MacMillan II, D.D., Tsekhanov, S., Wright, R.L., Baran, S.E. and Fuchs, R.A. (2004) Influence of chronic corticosterone and glucocorticoid receptor antagonism in the amygdala on fear conditioning. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 81: 185–199.
- Cordero, M. I., Merino, J. J., & Sandi, C. (1998). Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 112(4), 885-891.
- de Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., & Joëls, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews*, 19(3), 269-301.
- 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.
- Ferreira, T. L., Moreira, K. M., Ikeda, D. C., Bueno, O. F. a, & Oliveira, M. G. M. (2003). Effects of dorsal striatum lesions in tone fear conditioning and contextual fear conditioning. *Brain Research*, 987(1), 17–24.

- Ferry, B., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1999). Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: a critical involvement of the amygdala. *Biological Psychiatry*, *46*(9), 1140–52.
- Flor, H., & Birbaumer, N. (2000). Fear Conditioning. *Fatherhood*, 5422-5425.
- Geuze, E., Wingen, G. A. Van, Zuiden, M. Van, Rademaker, A. R., Vermetten, E., & Kavelaars, A. (2012). Glucocorticoid receptor number predicts increase in amygdala activity after severe stress. *Psychoneuroendocrinology*, *37*, 1837—1844.
- Gallagher-Beckley, A. J., & Cidlowski, J. a. (2009). Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB Life*, *61*(10), 979–86.
- Goosens, K. A., & Maren, S. (n.d.). Contextual and Auditory Fear Conditioning are Mediated by the Lateral , Basal , and Central Amygdaloid Nuclei in Rats. doi:10.1101/Im.37601.Doron
- Goshen-Gottstein, Y. (2003). Learning and Memory. En *Encyclopedia of the life sciences* (pp. 1-6): John Wiley & Sons, Ltd.
- ILAR. (1996). *Guide for the care and use of laboratory animals* Washington, DC: National Academy Press.
- Jacobs, N. S., Cushman, J. D., & Fanselow, M. S. (2010). The accurate measurement of fear memory in Pavlovian conditioning: Resolving the baseline issue. *Journal of Neuroscience Methods*, *190*(2), 235-239.
- Joëls, M., & Karst, H. (2012). Corticosteroid effects on calcium signaling in limbic neurons. *Cell Calcium*, *51*(3-4), 277-283.
- Joëls, M., Karst, H., DeRijk, R., & de Kloet, E. R. (2008). The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends in Neurosciences*, *31*(1), 1-7.
- Johansen, J. P., Cain, C. K., Ostroff, L. E., & LeDoux, J. E. (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, *147*(3), 509–24.
- Johnson, L. R., Farb, C., Morrison, J. H., McEwen, B. S., & LeDoux, J. E. (2005). Localization of glucocorticoid receptors at postsynaptic membranes in the lateral amygdala. *Neuroscience*, *136*(1), 289-299.
- Kadmiel, M., & Cidlowski, J. A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, *34*(9), 518-530.
- Kim, J. J., & Yoon, K. S. (1998). Stress: metaplastic effects in the hippocampus. *Trends in Neurosciences*, *21*(12), 505–9.

- Krstic, M. D., Rogatsky, I., Yamamoto, K. R., & Garabedian, M. J. (1997). Mitogen-activated and cyclin-dependent protein kinases selectively and differentially modulate transcriptional enhancement by the glucocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(7), 3947-3954.
- Lambert, W. M., Xu, C. F., Neubert, T. A., Chao, M. V., Garabedian, M. J., & Jeanneteau, F. D. (2013). Brain-derived neurotrophic factor signaling rewrites the glucocorticoid transcriptome via glucocorticoid receptor phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, *33*(18), 3700-3714.
- Leaton, R. N., & Borszcz, G. S. (1985). Potentiated startle: Its relation to freezing and shock intensity in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *11*, 421-428.
- LeDoux, J. (2007). The amygdala. *Current Biology : CB*, *17*(20), R868–74.
- López, J. K., Akil, H., & Watson, S. J. (1999). Role of biological and psychological factors in early development and their impact on adult life Neural circuits mediating stress. *Biological Psychiatry*, *46*, 1461-1471.
- Luyten, L., Vansteenwegen, D., van Kuyck, K., Deckers, D., & Nuttin, B. (2011). Optimization of a contextual conditioning protocol for rats using combined measurements of startle amplitude and freezing: the effects of shock intensity and different types of conditioning. *Journal of Neuroscience Methods*, *194*(2), 305–11.
- Maren, S., Phan, K. L., & Liberzon, I. (2013). The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nature Reviews. Neuroscience*, *14*(6), 417–28.
- McGaugh, J. L. (2000). Memory-a century of consolidation. *Science*, *287*(5451), 248-251.
- McIntyre, C. K., & Roozendaal, B. (2007). Adrenal stress hormones and enhanced memory for emotionally arousing experiences. En F. Bermúdez-Rattoni (Ed.), *Neural plasticity and memory: From genes to brain imaging* (pp. 265-284). Boca Raton (FL): CRC Press.
- Mitra, R., Jadhav, S., McEwen, B. S., Vyas, A., & Chattarji, S. (2005). Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(26), 9371–6.

- Morgan, M. a, & LeDoux, J. E. (1995). Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. *Behavioral Neuroscience*, *109*(4), 681–8.
- Necela, B. M., & Cidlowski, J. A. (2003). Crystallization of the human glucocorticoid receptor ligand binding domain: a step towards selective glucocorticoids. *Trends in Pharmacological Sciences*, *24*(2), 58-61.
- Page, M. P., & Cooper, R. L. (2004). Novelty stress and reproductive state alters responsiveness to sensory stimuli and 5-HT neuromodulation in crayfish. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, *139*(2), 149-158.
- Patrick, G. (2013). History of Cortisone and Related Compounds. En *Encyclopedia of the life sciences* (pp. 1-5): John Wiley & Sons, Ltd.
- 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.
- Pravosudov, V. V. (2010). Memory, Learning, Hormones and Behavior. En M. D. Breed & J. Moore (Eds.), *Encyclopedia of Animal Behavior* (pp. 429-437): Oxford: Academic Press.
- Orsini, C. A., & Maren, S. (2012). Neuroscience and Biobehavioral Reviews Neural and Cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *36*(7), 1773–1802.
- Ramamoorthy, S., & Cidlowski, J. A. (2013). Ligand-induced repression of the glucocorticoid receptor gene is mediated by an NCoR1 repression complex formed by long-range chromatin interactions with intragenic glucocorticoid response elements. *Molecular and Cellular Biology*, *33*(9), 1711-1722.
- Reilly, M. A., & Kim, J. J. (2013). Learning and Memory. En *Encyclopedia of the life sciences*. (pp. 1-8): John Wiley & Sons, Ltd.
- Rodrigues, S. M., Schafe, G. E., & Ledoux, J. E. (2004). Emotional Learning and Memory in the Lateral Amygdala Fear conditioning is a valuable behavioral paradigm, *44*, 75–91.
- 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.

- Roozendaal, B. (2000). Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*, *25*(3), 213–238.
- Roozendaal, B., Barsegyan, A., & Lee, S. (2008). Adrenal stress hormones, amygdala activation, and memory for emotionally arousing experiences. En E. R. De Kloet & E. Vermetten (Eds.), *Stress hormones and post traumatic stress disorder: basic studies and clinical perspectives* (pp. 79-+).
- Roozendaal, B., McEwen, B. S., & Chattarji, S. (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(6), 423-433.
- Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1997). Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. *Neurobiology of Learning and Memory*, *67*(2), 176-179.
- Rudy, J. W., & O'Reilly, R. C. (1999). Contextual fear conditioning, conjunctive representations, pattern completion, and the hippocampus. *Behavioral Neuroscience*, *113*(5), 867–80.
- Sah, P., Faber, E. S. L., De Armentia, M. L., & Power, J. (2003). The amygdaloid complex: Anatomy and physiology. *Physiological Reviews*, *83*(3), 803-834.
- Sandi, C. (2003). Implicacion de los glucocorticoides en la consolidacion de la memoria. *Revista de Neurologia*, *37*(9), 843-848.
- Sandi, C. (2004). Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(12), 917-930.
- Sandi, C. (2011). Glucocorticoids act on glutamatergic pathways to affect memory processes. *Trends in Neurosciences*, *34*(4), 165-176.
- Sandi, C., Loscertales, M., & Guaza, C. (1997). Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *European Journal of Neuroscience*, *9*(4), 637-642.
- 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.
- Sanford, L. D., Fang, J., & Tang, X. (2003). Sleep after differing amounts of conditioned fear training in BALB/cJ mice. *Behavioural Brain Research*, *147*(1-2), 193-202.
- Schutsky, K., Ouyang, M., Castelino, C. B., Zhang, L., & Thomas, S. A. (2011). Stress and Glucocorticoids Impair Memory Retrieval via β_2 -Adrenergic, $G_{i/o}$ -Coupled Suppression of cAMP Signaling. *Journal of Neuroscience*, *31*(40), 14172–14181.

- Schwabe, L., Böhringer, A., & Wolf, O. T. (2009). Stress disrupts context-dependent memory. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 16(2), 110–3.
- Sigurdsson, T., Doyère, V., Cain, C. K., & LeDoux, J. E. (2007). Long-term potentiation in the amygdala: a cellular mechanism of fear learning and memory. *Neuropharmacology*, 52(1), 215–27.
- Sullivan, G. M., Apergis, J., Bush, D. E. a, Johnson, L. R., Hou, M., & Ledoux, J. E. (2004). Lesions in the bed nucleus of the stria terminalis disrupt corticosterone and freezing responses elicited by a contextual but not by a specific cue-conditioned fear stimulus. *Neuroscience*, 128(1), 7–14.
- Ursin, H., & Eriksen, H. R. (2004). The cognitive activation theory of stress. *Psychoneuroendocrinology*, 29(5), 567–92.
- 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.
- Weinstock, M.; Matlina, E.; Maor, G. I.; Rosen, H.; McEwen, B. S. Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic– pituitary adrenal system in the female rat. *Brain Res.* 595:195–200; 1992.
- Weinstock, M., Poltyrev, T., Schorer-Apelbaum, D., Men, D., & McCarty, R. (1998). Effect of prenatal stress on plasma corticosterone and catecholamines in response to footshock in rats. *Physiology & Behavior*, 64(4), 439–444.
- Witnauer, J. E. & Miller, R. R. (2014). Conditioned suppression is an inverted-U function of footshock intensity. *Learning Behavioral*, 41(1), 94–106.

14. Apéndices

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

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

B Composición de sustancias utilizadas para la medición de GR fosforilado

- COMPLETE: Mezcla de varios inhibidores de proteasas con especificidad de amplio rango. Inhibe proteasas de serina, cisteína y metaloproteasas en bacterias, mamíferos, levadura y extractos de plantas.
- RIPA: Buffer compuesto de Tris-HCl 20 mM (pH 7.5); NaCl 150 mM; Na₂EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; NP-40 al 1%; desoxicolato de sodio al 1%; pirofosfato de sodio 2.5 mM; β-glicerofosfato 1 mM; Na₃VO₄ 1 mM; 1 μg/ml de leupeptina.