



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

EFEECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN EL ESTRIADO Y EL HIPOCAMPO
SOBRE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE UNA TAREA DE
CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL TONO

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

PRESENTA:

BIÓL. VIRIDIANA ARACELI ARENAS MARTÍNEZ

TUTOR:
DRA. GINA LORENA QUIRARTE
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D. F. JUNIO 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: Viridiana Araceli Arenas Martínez es: “Efecto de los glucocorticoides en el estriado y el hipocampo sobre la consolidación de la memoria de una tarea de condicionamiento de miedo al tono” 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. Maricela Luna Muñoz

Secretario

Dra. Gina Lorena Quirarte

Vocal

Dr. Francisco Sotres Bayón

Suplente

Dra. Wendy Portillo Martínez

Suplente

Dr. Víctor Hugo De Lafuente Flores

Aprobado por el Comité Académico

Dr. Alfredo Varela Echeverría

Coordinador del Programa
Maestría en Ciencias (Neurobiología)

RESUMEN

La formación de la memoria de condicionamiento de miedo involucra la participación de estructuras cerebrales como el hipocampo, la amígdala y el estriado. Lesiones electrolíticas y neurotóxicas en el estriado dorsal interfieren con la consolidación de la memoria de una tarea de condicionamiento de miedo al tono (CMT), mientras que lesiones en el hipocampo dorsal no afectan este proceso. Por otra parte, los glucocorticoides también pueden modular la consolidación de la memoria. Hallazgos de nuestro laboratorio mostraron que la administración de corticosterona en el estriado dorsal inmediatamente después del entrenamiento en la tarea del laberinto acuático en su versión de procedimiento produce un efecto de facilitación dosis-dependiente. Sin embargo, aún es escaso el conocimiento sobre el papel de la activación de los receptores a glucocorticoides en la consolidación de la memoria de la información del CMT. Para aportar más información a este respecto, se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar a las que se les implantó cánulas bilaterales en el estriado dorsal o en el hipocampo dorsal. Una semana después se entrenaron en la tarea CMT e inmediatamente después se les administró corticosterona (5, 10, ó 20 ng) o solución vehículo. La prueba de retención se realizó 48 horas después. El análisis de los resultados mostró que la administración de corticosterona en el estriado dorsal produjo facilitación de la memoria de la tarea de CMT en forma dosis dependiente. Se observó un efecto facilitador de la consolidación de la memoria al administrar 5 ng de corticosterona, en contraste con la administración de 10 y 20 ng de que no causaron efectos. Sin embargo, la administración de corticosterona en el hipocampo dorsal no mostró efectos sobre la consolidación de la memoria de esta tarea. Por otro lado, la administración del antagonista RU 486 en el estriado dorsal bloqueó el efecto facilitador causado por la administración de corticosterona. Estos resultados sugieren que los receptores a glucocorticoides tipo II del estriado dorsal están involucrados en la formación de la memoria de procedimiento.

Retrasé cc de acuerdo

SUMMARY

Formation of conditioned fear memory involves the participation of different brain structures such as the hippocampus, amygdala and striatum. Electrolytic and neurotoxic lesions in the dorsal striatum interfere with memory consolidation of a tone fear conditioning task (TFC), while lesions in the dorsal hippocampus do not affect this process (Ferreira et al., 2003). Furthermore, glucocorticoids can also modulate memory consolidation (Roosendaal, 2000). Findings from our laboratory showed that administration of corticosterone in the dorsal striatum immediately after training in the water maze task in its spatial version produced a dose-dependent enhancement effect (Quirarte et al., 2009). However, there is little knowledge about the effect of activation of glucocorticoid receptors on TFC memory consolidation. To further study this issue, male Wistar rats were bilaterally implanted with cannulae into dorsal striatum or dorsal hippocampus. One week later, the rats were trained and immediately afterwards they received an infusion of corticosterone (5, 10, or 20 ng) or vehicle solution. Retention was tested 48 hours later. The results showed that corticosterone infused into dorsal striatum caused a dose-dependent effect on tone fear memory consolidation. A memory enhancement was caused by 5 ng corticosterone infusion, in contrast to lack of effect produced by 10 ng and 20 ng of corticosterone. By contrast, corticosterone infusion into dorsal hippocampus showed no effect on memory consolidation. Furthermore, the corticosterone antagonist RU486 infused into dorsal striatum blocked the effect caused by corticosterone. These results suggest that dorsal striatum type II glucocorticoid receptors are involved in memory consolidation of procedural information.

AGRADECIMIENTOS

La realización de la presente tesis fue posible gracias a la ayuda, apoyo y aportaciones de las siguientes personas y dependencias a las cuales deseo expresar mi más sincero agradecimiento.

- A la Dra. Gina L. Quirarte, por permitirme seguir formando parte de su equipo de trabajo. Por su apoyo y guía a lo largo de la realización de este proyecto.
- Al Dr. Roberto A. Prado Alcalá por sus valiosas aportaciones y sugerencias durante la revisión del proyecto.
- A la M. V. Z. Norma Serafín López, por su invaluable ayuda durante mi estancia en el laboratorio.
- A la Dra. Cristina Medina Fragoso sus consejos, opiniones y observaciones que contribuyeron a mejorar el trabajo.
- Al Sr. Ángel Méndez Olalde por su apoyo en el cuidado de los animales.
- Al comité tutelar integrado por la Dra. María Magdalena Giordano Noyola y la Dra. Wendy Portillo Martínez.
- Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT 130524) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM IN214111 y IN202414).
- A todas mis compañeras con quienes compartí mi estancia en el laboratorio.

A las siguientes personas de las unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología, UNAM, campus Juriquilla.

1. M. V. z. Martín García Servín, Bioterio.
2. Ing. Ramón Martínez Olvera, Ing. Alberto Lara Ruvalcaba e Ing. Omar González Hernández, Cómputo.
3. Mtra. Leonor Casanova Rico, Enseñanza.
4. Lourdes Lara, Videoconferencia.
5. Lic. Francisco Javier Valles Valenzuela y Lic. Soledad Medina Malagón, Biblioteca.

DEDICATORIA

A Victoria, Rogelio, Jesús. Roge y Gerardo

ÍNDICE

RESUMEN	III
SUMMARY	IV
AGRADECIMIENTOS	V
DEDICATORIA	VI
1. INTRODUCCIÓN	9
2. ANTECEDENTES	10
2.1. Memoria	10
2.2. Condicionamiento clásico	12
2.2.1. Condicionamiento de miedo	12
2.2.2. Estructuras cerebrales implicadas en el condicionamiento de miedo	13
2.2.2.1. Estriado	14
2.2.2.2. Hipocampo	16
2.3. Corticosteroides	20
2.3.1. Glucocorticoides	20
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS	30
6. MATERIALES Y MÉTODO	31
6.1. Sujetos	31
6.2. Cirugía	31
6.3. Sesión de manipulación y habituación	32
6.4. Cámara de condicionamiento del miedo al tono	32
6.4.1. Sesión de entrenamiento	33
6.4.2. Fármacos y microinyección	34
6.4.3. Sesión de prueba	35
6.5. Perfusión	35
6.6. Análisis histológico	36
6.7. Diseño experimental y análisis estadístico	36
6.7.1. Experimento I	36
6.7.2. Experimento II	36
6.7.3. Experimento III	37
6.7.4. Experimento IV	37
7. RESULTADOS	39
7.1.1. Estriado	39

7.1.2.Hipocampo.....	41
7.2.Experimento I: Determinación de las condiciones experimentales.....	41
7.2.1.Efecto de la intensidad del tono sobre la consolidación de la memoria de la tarea de CMT	42
7.2.2.Efecto de la intensidad de choque sobre la consolidación de la memoria de la tarea de CMT	46
7.3.Experimento II: efecto de la activación de los receptores a glucocorticoides en el estriado dorsal sobre la consolidación de la memoria de la tarea de CMT	49
7.4.Experimento III: Efecto de la activación de los receptores a glucocorticoides en el hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria de CMT	52
7.5.Experimento IV: Efecto de la administración del antagonista RU 486 en el estriado dorsal sobre la consolidación de la memoria de la tarea de CMT ..	56
8. DISCUSIÓN.....	60
9. CONCLUSIONES.....	66
10. REFERENCIAS.....	67
ÍNDICE DE FIGURAS	73
ÍNDICE DE CUADROS	76
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	77

1. INTRODUCCIÓN

La sobrevivencia de los organismos depende de mecanismos que los posibiliten para hacer frente a las diversas situaciones de peligro a las que se encuentran expuestos. Por tal motivo, es de vital importancia predecir eventos aversivos, así como planear, organizar y ejecutar respuestas fisiológicas y conductuales defensivas que permitan enfrentar dichas situaciones (Kim & Jung, 2006).

El miedo es una respuesta conductual altamente adaptativa que actúa como mecanismo de defensa y permite almacenar información de estímulos o situaciones potencialmente peligrosa (Krugers, Zhou, Joels, & Kindt, 2011).

Los eventos con un componente altamente emocional como las que producen miedo, se constituyen con mayor rapidez como memorias estables y son fácilmente recordadas en contraste con la información neutra derivada de las experiencias de nuestra vida diaria. (Orsini & Maren, 2012).

Durante los eventos emocionalmente significativos es inherente la liberación de hormonas esteroides tales como los glucocorticoides. Dichas evidencias se basan entre otras cosas en el estudio de modelos animales bajo condiciones de estrés. Existen estudios que sugieren que estas hormonas afectan el proceso de formación la memoria a través de la activación de sus receptores localizados distribuidos en estructuras cerebrales implicadas en este proceso (Cahill & McGaugh, 1998).

La memoria de miedo es un proceso complejo que contiene diversos componentes dependiendo de los tipo de estímulos, por lo que se requiere de la participación de diferentes estructuras cerebrales para codificarla. Aunque la amígdala juega un papel central en la formación de la memoria de miedo (Fanselow & Gale, 2003), existes estudios que han demostrado que lesiones en estructuras como el hipocampo y el estriado también interfieren con el establecimiento de este tipo de memoria (Anastagoras, Gale & Fanselow, 2001).

El condicionamiento de miedo es un protocolo utilizado en los laboratorios de investigación para evaluar la participación de estas estructuras en la formación de la memoria de miedo y los factores que pueden estar regulándola.

2. ANTECEDENTES

2.1. Memoria

La memoria es un proceso dinámico que permite a los organismos retener y recuperar diversos tipos de información de su entorno (McDonald et al., 2004). La memoria puede ser cuantificada a través de ciertos cambios conductuales que surgen como resultado del aprendizaje. Con base a la duración, la memoria se clasifica en memoria de corto plazo (MCP) y de largo plazo (MLP). Existe también otra clasificación que divide a la memoria en memoria explícita y memoria implícita. La memoria explícita depende del lóbulo temporal y estructuras diencefálicas tales como el hipocampo, el subículo y la corteza entorrinal. La memoria implícita involucra al cerebelo, la amígdala y los ganglios basales, principalmente el estriado (Lynch, 2004).

La formación de la memoria requiere de la participación de sistemas cerebrales. Estos sistemas pueden funcionar de manera paralela o interactuar entre sí para procesar información y formar así, la memoria (McDonald et al., 2004). Cada sistema consta de una estructura central y un conjunto de conexiones aferentes y eferentes provenientes de otras estructuras (White & McDonald, 2002). Anteriormente se reconocía al hipocampo como la estructura central moduladora de los procesos de memoria, sin embargo, recientemente se considera además la participación de la amígdala y el estriado como estructuras centrales de otros sistemas de memoria. Esta idea está sustentada en el estudio pionero del paciente HM en el que se demostró que la memoria es un proceso independiente de otras facultades cognitivas y que aunque el hipocampo tiene un papel prominente en la consolidación de la memoria, lesiones en esta estructura no afectan otro tipo de memoria.

Aunque la formación de la memoria es un proceso continuo, para su estudio se reconocen la fase de adquisición, consolidación y recuperación o evocación. La adquisición se refiere al proceso en el que un individuo obtiene información del medio que lo rodea. La evocación es el proceso que permite el uso de esa información mediante el recuerdo en momentos en que así se requiere. La fase que se desarrolla entre la adquisición y la evocación es consolidación. Esta representa el paso en el que la información recientemente adquirida y almacenada como memoria de corto plazo se transforma en memoria de largo plazo (Collins, 2007) (Figura 1).

ANTECEDENTES

Se define como el proceso mediante el cual la información lábil e inestable se estabiliza progresivamente. Durante la etapa de consolidación, factores tales como la estimulación eléctrica de regiones involucradas en la memoria (Paré, 2003), trauma cerebral, choques electroconvulsivos, inhibidores de la síntesis de proteínas y algunos tratamientos farmacológicos pueden interferir con la consolidación de la memoria (Alberini, 2005).

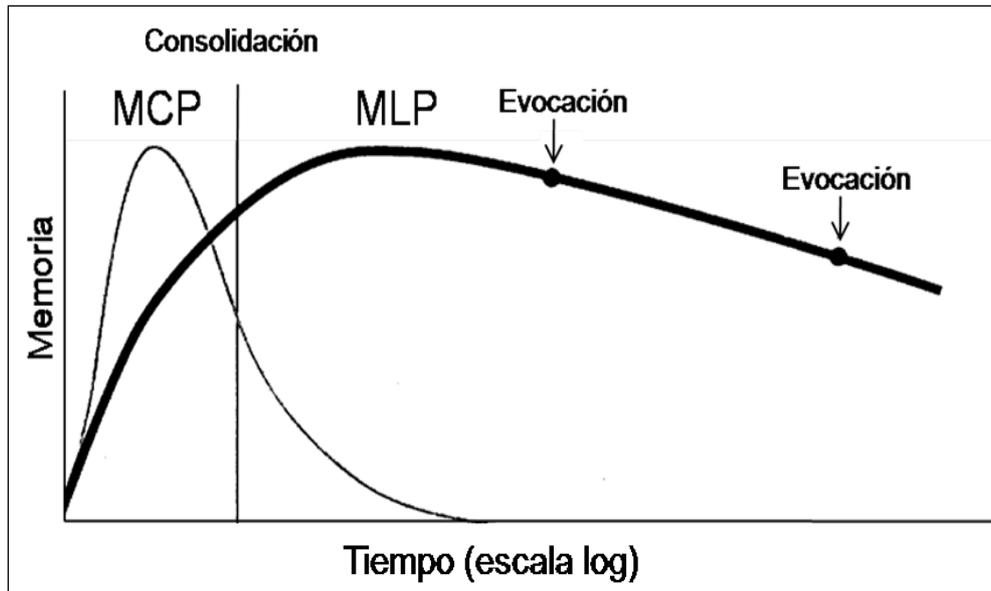


Figura 1. Etapas de la memoria de acuerdo a su clasificación temporal. La memoria puede ser de corto plazo (MCP) o de largo plazo (MLP). La consolidación es el proceso que permite la transición entre MCP y MLP. La capacidad de recuperación de información establecida como memoria disminuye a lo largo del tiempo. Modificada de (Dudai, 2004).

En la formación de la memoria, las modificaciones morfológicas, celulares y moleculares, además de la producción de diferentes neurotransmisores son cruciales para hacer que los cambios temporales causados por la información recientemente adquirida se conviertan en modificaciones duraderas e incluso permanentes y que como consecuencia se vuelvan resistentes a las interferencias (Abel & Lattal, 2001). Para consolidar la nueva información además, se requiere de la expresión de genes, síntesis de proteínas de *novo* y la formación de nuevas conexiones sinápticas. Las nuevas conexiones sufren cambios en la comunicación sináptica que permiten reforzar las asociaciones entre neuronas. Hebb propuso que cuando dos neuronas se activan de manera simultánea, la eficiencia sináptica se fortalece. En un intento para entender cómo ocurre este reforzamiento surgió el modelo de potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés). La LTP es un

mecanismo de plasticidad neuronal que refleja los eventos celulares necesarios para que ocurra el almacenamiento de información. Representa la base de procesos como el aprendizaje y la memoria.

2.2. Condicionamiento clásico

El estudio del aprendizaje y la memoria ha permitido el uso de diversos paradigmas para tratar de dilucidar los mecanismos que subyacen a estos procesos. El condicionamiento clásico, también llamado Pavloviano, es un modelo comúnmente utilizado para estudiar la formación de la memoria. Consiste en establecer una asociación entre dos estímulos, un estímulo neutro o estímulo condicionado (EC) que no produce respuestas fisiológicas específicas (generalmente un tono o un contexto) y un estímulo incondicionado (EI) que puede producir una respuesta fisiológica (generalmente un choque eléctrico). A la respuesta producida por el EI se le llama respuesta incondicionada (RI). Después de varias asociaciones del EC con el EI, el EC por sí sólo es capaz de producir la respuesta fisiológica y ahora es llamada respuesta condicionada (RC) (Ninomiya, 1991) (Figura 2).

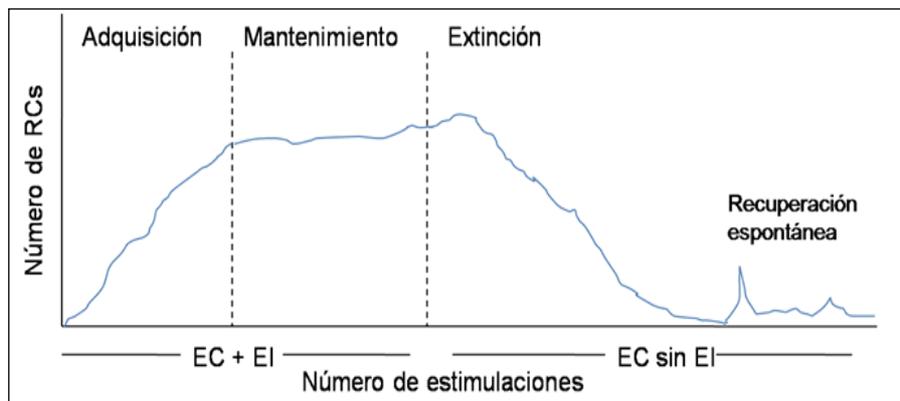


Figura 2. Etapas del condicionamiento de miedo. Muestra la curva del número de respuestas condicionadas (RCs) durante la presentación de los estímulos (EC + EI). En la adquisición, el número de respuesta incrementa conforme aumenta el número de estimulaciones y se mantiene así durante un periodo de tiempo (Mantenimiento). En ausencia del EI, el número de respuestas disminuye conforme se incrementa el número de estimulaciones (Extinción).

2.2.1. Condicionamiento de miedo

Se ha demostrado que el condicionamiento de miedo es un proceso elemental de aprendizaje que existe en un amplio rango de especies, tanto de vertebrados como de invertebrados. El aprendizaje del condicionamiento de miedo se expresa mediante la habilidad del EC para producir una respuesta conductual o fisiológica

ANTECEDENTES

adoptada para anticipar un estímulo aversivo, generalmente es la respuesta de congelamiento (en inglés, freezing). El congelamiento se define como la ausencia total de movimiento excepto el necesario para la respiración (Fanselow, 1980) e implica un patrón distintivo de cambios autónomos como alteraciones en la frecuencia cardíaca, en la presión arterial y piloerección, además ocurren cambios en la actividad del sistema endócrino y en la expresión de conductas de alerta potenciadas por el miedo (Staimer, 2002). Se utiliza como índice para cuantificar la memoria.

Existen dos modalidades del condicionamiento de miedo que se utilizan para establecer una asociación de estímulos. La modalidad en la que el EC co-termina con el EI (delay) y la modalidad en la que existe un intervalo de tiempo entre la terminación de EC y el inicio de EI (trace). Diversas evidencias apuntan a que las características de los estímulos de cada una es procesada por diferentes sistemas cerebrales. En el caso del trace, se sabe que el hipocampo es indispensable para su procesamiento, sin embargo, nuevas evidencia revelan que es importante durante la adquisición de la información pero no durante la expresión.

El intervalo de tiempo entre los estímulos es importante para el establecimiento del aprendizaje ya que cuando los estímulos se presentan con un patrón de configuración pareado el aprendizaje de la asociación es más estable y resistente en contraste con el aprendizaje causado cuando los estímulos están separados por un intervalo de tiempo. El mecanismo a través del cual el cerebro procesa y evalúa las características de una asociación de estímulos temporalmente distantes no sólo se requieren durante la formación de esta asociación sino también durante la evaluación independiente cada uno los de los estímulos.

Las tarea de condicionamiento de miedo utilizadas principalmente son el condicionamiento de miedo al tono (CMT) y el condicionamiento de miedo al contexto (CMC).

2.2.2. Estructuras cerebrales implicadas en el condicionamiento de miedo

Se ha establecido que la amígdala tiene un papel decisivo en la adquisición y expresión de la memoria de miedo condicionado. El análisis de la información proveniente del EC y el EI convergen en el núcleo de la amígdala lateral. Existen

ANTECEDENTES

proyecciones directas de la porción medial del cuerpo geniculado medial hacia la amígdala, específicamente hacia el núcleo lateral (Schafe, Nader, Blair, y LeDoux (2001). Estas proyecciones llevan la información del EC (si se trata de un condicionamiento auditivo) al núcleo lateral de la amígdala y finalmente, este núcleo tiene eferencias hacia el núcleo central y basolateral de la amígdala. Lesiones en alguno de los diferentes núcleos de la amígdala ejercen diferentes efectos sobre el condicionamiento de miedo. Lesiones en el núcleo lateral interfieren con la adquisición de la respuesta condicionada y lesiones en el núcleo central afectan la expresión del aprendizaje. Sin embargo, la amígdala proyecta a diferentes áreas que controlan diferentes respuestas conductuales (Aguado, 2003). Por ello, se ha establecido que diferentes regiones cerebrales pueden participar en la formación de la memoria del miedo condicionado. En estudios realizados con ratas se ha demostrado que el hipocampo y el estriado se encargan de procesar información que se establecerá más tarde como diferentes formas de memoria.

2.2.2.1. Estriado

El estriado, en conjunto con el globo pálido, el núcleo subtalámico, las sustancia nigra y el núcleo acumbens conforman los denominados ganglios basales (Bolam, Hanley, Booth & Bevan, 2000). Estos núcleos integran un circuito que está involucrado en la regulación de los movimientos mediante una vía directa y una indirecta.

El estriado es el sitio de mayor plasticidad dentro de los ganglios basales y representa el punto preponderante de entrada de información del conjunto de núcleos. Recibe proyecciones glutamatérgicas de la corteza y del núcleo subtalámico. Su función en general, es la de integrar información para posteriormente enviarla a los núcleos de salida, donde se produce una conducta en respuesta a la información recibida. Dentro de estas respuestas destacan la ejecución de secuencias de movimientos y aquellas que determinan la orientación e incluso la emisión de respuestas requeridas como consecuencia a la activación hipotalámica que activan funciones autonómicas (Gerfen & Bolam, 2010).

Aunque diversos estudios apuntaban a que el estriado participa sólo en el proceso de generación y control de movimientos y en la formación de hábitos, posteriormente se propuso su participación en procesos de aprendizaje y memoria (Packard &

ANTECEDENTES

Knowlton, 2002). Además se ha estudiado la contribución de las diferentes regiones del estriado en el aprendizaje, la selección competitiva de respuestas alternativas y la modulación motivada de la conducta motora.

El estriado está integrado por el núcleo caudado, el putamen y el núcleo acumbens. Se denomina estriado dorsal a la asociación del núcleo caudado y putamen. En los roedores no se distingue el caudado del putamen por lo que conforman una sola estructura denominada caudo-putamen (Devan, 1997). El núcleo acumbens conforma el estriado ventral. Existen diversas evidencias con respecto a la participación del estriado dorsal en procesos de aprendizaje y memoria de procedimiento, de hábitos y durante la formación de la memoria de condicionamiento clásico, mientras que al estriado ventral se le relaciona con el procesamiento de información afectiva y motivacional (Pennartz et al., 2011).

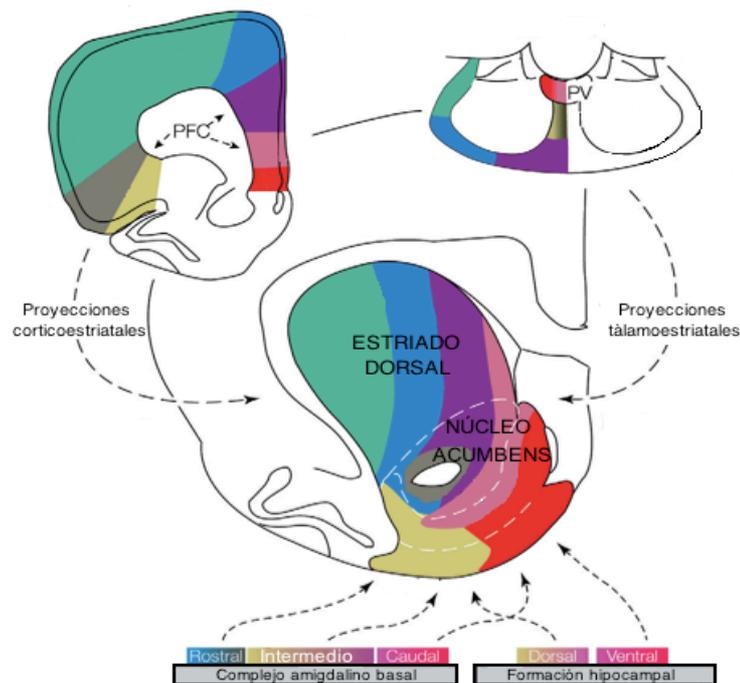


Figura 3. Representación esquemática del estriado. Muestra sus las aferencias provenientes de la corteza motora, el tálamo, la amígdala y el hipocampo. Modificado de Takahashi, Shoenbaum & Niv, 2008.

A diferencia del arreglo celular estratificado que poseen otras estructuras cerebrales, en el estriado se observa una distribución citoarquitectónica homogénea. Está integrado en un 95% por las células denominada espinosas medianas (MS). Este tipo celular está caracterizado anatómicamente por poseer una arquitectura somatodendrítica uniforme, numerosas espinas dendríticas y el tamaño de soma de

ANTECEDENTES

10-20 μm . Las espinosas medianas son las células de proyección del estriado y poseen un sistema de neurotransmisión inhibitorio ácido aminobutírico GABAérgico

El resto de las células que integran al estriado son interneuronas que hacen sinapsis con las medianas espinosas, por lo que la proyección de sus axones se mantiene dentro del estriado. Al igual que las MS, las interneuronas reciben aferencias de la corteza y en contraste con estas, poseen menos espinas dendríticas.

Algunos trabajos han aportado información acerca del efecto que tienen las lesiones, la electro-estimulación o la aplicación de drogas sobre las facultades cognitivas del estriado. Ferreira et al. (2003), encontraron que las lesiones electrolíticas y neurotóxicas afectan la respuesta de congelamiento de una tarea de CMT. Aunque dichos resultados no muestran un bloqueo total de la memoria de éste tipo de información, si se observa una disminución. Las evidencias de la funcionalidad de las diferentes regiones del estriado en la regulación de diversos procesos sugiere que la falta de especificidad en la realización de la lesiones produce dichos resultados.

Featherstone y McDonald (2004), mediante lesiones realizadas en ratas confirmaron la participación del estriado dorsolateral en la formación de la memoria de asociación estímulo-respuesta. Sin embargo, aunque con estos estudios se ha podido determinar la participación del estriado en la formación de la memoria, la falta de regionalización y la magnitud del daño que una lesión electrolítica o neurotóxica producen representan una limitante de estos resultados. Por tal razón, Kishioka et al. (2009) evaluaron la memoria de largo plazo del condicionamiento de miedo auditivo de un grupo de ratones mutantes que presentaban ablación del 90 % de las células de proyección del estriado. Los resultados muestran una disminución significativa en la respuesta de congelamiento comparado con el grupo control. Esto sugiere que las neuronas espinosas medianas tienen un papel en la memoria auditiva de largo plazo, pero no se encontró un efecto al evaluar la memoria de corto plazo. Además, confirman que estos resultados no se deben a deficiencias en el control motor como consecuencia de la falta de actividad de las células estriatales.

2.2.2.2 Hipocampo

La formación hipocampal es una estructura subcortical localizada en el lóbulo temporal, que junto con otras estructuras conforman el sistema límbico. Posee un

ANTECEDENTES

arreglo trilaminar y está subdividida en regiones y campos de acuerdo a la localización, la forma y el tamaño de los cuerpos celulares, así como también las terminaciones proximales, la complejidad de las espinas dendríticas y las características de sus proyecciones aferentes y eferentes. En cada región destaca además de un grupo de interneuronas, un tipo celular predominantemente distribuido en una única capa.

La formación hipocampal se divide en el giro dentado, el hipocampo propiamente dicho, el subículum y la corteza entorrinal. El giro dentado consta a su vez de tres capas. El estrato oriens, que se distingue por un conjunto de células dispersas pequeñas; el estrato medio o granular, cuyas células principales denominadas granulares se distinguen por su forma oval y, el estrato radiatum, en el que se encuentran las dendritas de las células piramidales (El Falougy, Kubikova & Benuska, 2008) (Figura 4).

En el hipocampo por su parte, también se reconocen tres estratos: estrato molecular, estrato piramidal y estrato multiforme. En el estrato piramidal se encuentran las células principales del hipocampo, denominadas células piramidales. Sin embargo, además de su estratificación, el hipocampo se subdivide en regiones CA1, CA2, CA3 y CA4 de acuerdo a la densidad, tamaño y arborización de axones y dendritas de las células piramidales. La región CA4 representa la continuidad de CA3 localizada en la concavidad del giro dentado. Dentro de estas regiones se reconoce al hilus, término utilizado para referirse al complejo formado por el estrato piramidal de CA4 y el estrato multiforme del giro dentado. Se caracteriza por tener células de naturaleza polimórfica. La región CA3 se caracteriza por la presencia de células de gran tamaño menos densamente empaquetadas. La región CA2 es una zona transicional entre CA3 y CA1. Por su parte, la región CA1 se caracteriza por poseer un conjunto de células de tamaño medio, densamente empaquetadas. El subículum representa una región de transición entre las tres capas de CA1 y las capas de la corteza entorrinal.

El área entorrinal está integrada por seis capas, caracterizadas por la presencia de un tipo celular con diferentes características. La capa I o plexiforme; la capa de células estrelladas de gran tamaño o capa II; la capa de células piramidales medianas o capa III; la capa de células grandes piramidales dispersas o capa IV que

ANTECEDENTES

además representa un área separada y la capa V y VI que están integradas por células pequeñas y medianas, respectivamente.

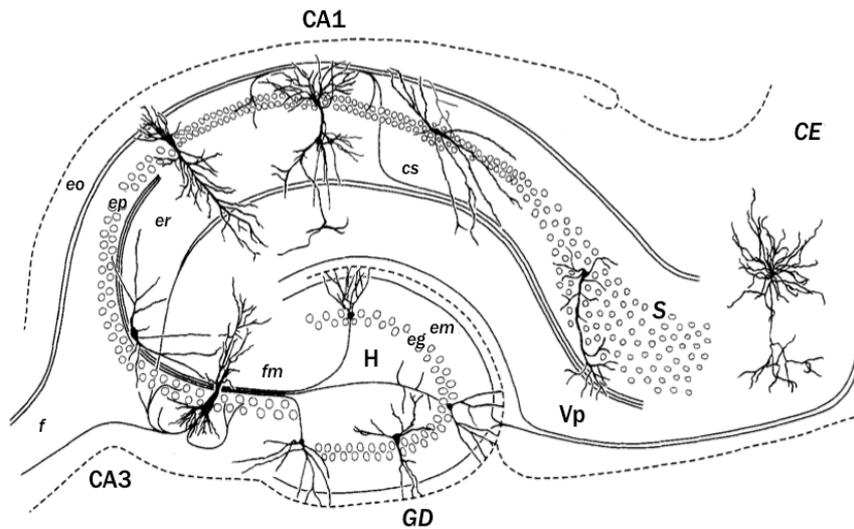


Figura 4. Representación esquemática del hipocampo. CE, corteza entorrinal; S, Subiculum, Vp, Vía perforante; GD, Giro Dentado; H, Hilus; em, estrato molecular; eg, estrato granular; fm, fibras musgosas; f, fornix; eo, estrato oriens; ep, estrato piramidal; er, estrato radiatum; cs, colaterales de Schaffer. La Figura es una modificación de Cajal (1911). Modificado de Caeser y Aertsen (1991).

El sistema glutamatérgico es el principal sistema de neurotransmisión del circuito del hipocampo. La información del circuito hipocámpal fluye a través de sus diversas regiones. Los axones provenientes de la corteza entorrinal excitan a las células granulares del giro dentado a través de las fibras musgosas; estas células a su vez excitan las células piramidales de las células de la región CA3. Consecuentemente, estas células activan a las neuronas piramidales de la región CA1. Finalmente, las piramidales de CA1 representan la vía de salida del hipocampo hacia la corteza. Sin embargo, es sabido que el flujo de información a través del hipocampo no es estrictamente lineal y consecutivo, por lo que las regiones CA3 y CA1 pueden ser activadas por proyecciones directas provenientes de la corteza entorrinal. Este circuito además constituye redes recurrentes que consiste en conexiones excitatorias modificadas que regresan a la región de proyección (Lisma, 1999).

En las últimas décadas, ha cobrado relevancia el estudio del hipocampo como una estructura relacionada el aprendizaje y la memoria. Actualmente está bien documentado que es una estructura crítica en el desarrollo de tareas que requieren el uso de información que implica la relación de estímulos y discriminación entre

ANTECEDENTES

lugares. Se sugiere que es fundamental en la codificación de la memoria espacial por lo que es una estructura crítica en el mantenimiento de la especificidad de la memoria que permite discernir entre diferentes aspectos de un contexto o entre diferentes contextos (Frankland Cestari, Filipkowski, McDonal, & Sinva, 1998).

El estudio del efecto de lesiones en el hipocampo sobre la memoria ha sido evaluado en diferentes tareas conductuales. Existen evidencias que demuestran que el hipocampo participa en la formación de la memoria de miedo condicionado (Sanders, Wiltgen & Fanselow, 2003). Se ha demostrado que de la tarea de CMC (información espacial) es dependiente del hipocampo, este su participación no es relevante en la tarea de CMT (información de procedimiento). Bast, Zhang, y Feldon (2003) investigaron el efecto de la inactivación del hipocampo ventral en una tarea de condicionamiento de miedo en la que se utilizó como estímulo condicionado un contexto o un tono en grupos independientes. Los datos mostraron que el hipocampo es necesario para la formación del CMC pero no al CMT. Este impedimento de la memoria está limitado por una ventana de tiempo relativamente corto, ya que al realizar la lesión en el hipocampo dorsal un día antes o un día después del entrenamiento se observa un deterioro en la memoria, en contraste con lo que se observó cuando se realizaron lesiones a un tiempo diferente (28, 50 y 100 días) después del entrenamiento (Kim & Fansellow, 1992; Maren et al., 1997). Sin embargo, aunque se ha demostrado que el hipocampo no participa en la formación de la memoria de CMT, existe controversia acerca de los resultados encontrados en diferentes experimentos que evalúan el efecto de la inhibición de la actividad hipocampal en esta tarea y cuyos hallazgos muestran en algunos casos un deterioro en la memoria de este tipo condicionamiento. Se sugiere que la participación del hipocampo en el CMT está limitada por la modalidad de condicionamiento utilizada (delay o trace). Bangasser y colaboradores (2006) encontraron que lesiones en el hipocampo afectan la expresión de la respuesta condicionada durante la prueba cuando el condicionamiento se llevo a cabo utilizando un intervalo de tiempo de 30 s entre los estímulos (trace) pero esto no se observó cuando este intervalo de tiempo no estuvo presente (delay). Sin embargo, se ha propuesto que la participación del hipocampo durante el CMT se modifica dependiendo del tamaño del intervalo de tiempo inter-estímulo. Burman y colaboradores (2005) encontraron que cuando el

ANTECEDENTES

intervalo entre el tono y choque es de 3 s, lesiones en el hipocampo dorsal no afectan la expresión de la respuesta condicionada. Estos mismos resultados también fueron observados por Chowdhury y colaboradores (2005). Evidencias apuntan a que la participación de hipocampo se requiere cuando el intervalo de tiempo entre EC y EI es de 15 y hasta los 30 segundos (Quinn et al., 2002; Misane et al., 2005).

Otra explicación dada a estos resultados, es el método utilizado para lesionar el hipocampo debido a que son poco restrictivos por lo que se dispersan a otras regiones que intervienen también en la formación de la memoria. En un estudio donde se utilizó kainato para lesionar el hipocampo, se observaron lesiones distales en regiones como la amígdala y la corteza. Por otro lado, al encontrarse inactiva esta estructura, el sistema opta por el uso de una estrategia dependiente del hipocampo que permite analizar los componentes del contexto de manera independiente y por tal motivo en algunos casos no se encuentra efecto en la memoria de condicionamiento de miedo al contexto.

2.3. Corticosteroides

Los corticosteroides funcionan como el principal mediador humoral del estrés y se producen primariamente en las glándulas adrenales. Sus niveles de secreción se incrementan en respuesta ante estímulos aversivos, resultando en un reajuste fisiológico y conductual que permite la activación de mecanismos de defensa ante retos futuros. En primera instancia, los corticosteroides actúan para conservar la homeostasis de sales en el organismo, estimular la gluconeogénesis y el metabolismo de lípidos, además, intervienen en las funciones cardiovasculares, pulmonares y las eritropoyéticas. Sin embargo, también inhiben funciones digestivas, reproductivas e inmunes.

2.3.1. Glucocorticoides

Los glucocorticoides son hormonas esteroideas liberadas de las glándulas adrenales como resultado de la activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA) durante situaciones estresantes o emocionalmente significativas.

La activación del eje HHA ocurre como resultado del efecto de diversos estímulos que ocasionan un desequilibrio en la homeostasis del organismo. Si el sistema nervioso percibe este estímulo como un evento estresante, activa circuitos

ANTECEDENTES

adaptativos para enfrentar las demandas del organismo. La respuesta de activación inicia con la liberación del factor liberador de corticotropina (CRF por siglas en inglés) de las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo. Proyecciones de circuitos límbicos y centros del tallo cerebral hacia el núcleo paraventricular aseguran que las células parvocelulares puedan ser activadas. El CRF a su vez estimula la liberación de hormona adrenocorticotropa de las neuronas corticotropas de la hipófisis anterior (ACTH por sus siglas en inglés). La ACTH que es liberada al torrente sanguíneo llega a la corteza adrenal, donde estimula la liberación de glucocorticoides (Figura 5). La secreción de glucocorticoides ocurren específicamente en la capa fascicular de la corteza adrenal y su liberación depende de una regulación circadiana.

El ciclo circadiano que siguen los glucocorticoides genera un patrón de liberación regulado de manera constante. Sin embargo, a lo largo del ciclo ocurre un incremento en los niveles de secreción, alcanzando así su mayor tasa de liberación. En organismos diurnos, el pico de liberación coincide con las primeras horas de la mañana, mientras que en animales nocturnos, este incremento se observa durante las primeras horas de la noche. Por otro lado, además del ritmo circádico que se observa, la liberación de glucocorticoides también está regulada por un ritmo pulsátil (ultradiano) que consisten en 1 ó 2 pulsos por hora. Estos pulsos son menos robustos y de menor amplitud en contraste con los observados durante el ciclo circadiano.

Los niveles fisiológicos de glucocorticoides pueden seguir diferentes patrones de liberación. En roedores, se observa un patrón de liberación que corresponde a una tasa baja de 1 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, mientras que una tasa alta oscila entre los 10 y 50 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ de corticosterona en plasma. El cambio entre ambos índices ocurre a lo largo del ciclo circadiano. Las concentraciones bajas de corticosterona corresponden a la fase de reposo y altas concentraciones corresponde al periodo de actividad. Sin embargo, también se han observado un incremento en la concentración de glucocorticoides en plasma en respuesta a diferentes estímulos ambientales. En situaciones de estrés, se observó que el pico de liberación de glucocorticoides se alcanza entre los 15 y 30 minutos después del evento estresante, restableciéndose hacia los 60 y 90 minutos después (Piazza & Le Moal, 1997).

ANTECEDENTES

Por otra parte, la información disponible sobre las concentraciones de glucocorticoides en el cerebro surge de los datos obtenidos de mediciones realizadas en sangre a través de diferentes métodos de cuantificación. Estas mediciones consideran el total de hormona disponible, es decir, tanto la que se encuentra libre como la que está unida a la proteína transportadora o también conocida como proteína de unión a corticosteroides (CBP) (Taves, Ma, Heimovics, Saldanha, & Soma, 2011, 2011). La CBP representa un reservorio de alta afinidad de glucocorticoides en la sangre. Sus niveles son relativamente estables aunque pueden existir variaciones dependientes del sexo y de la edad (Herbert et al, 2006).

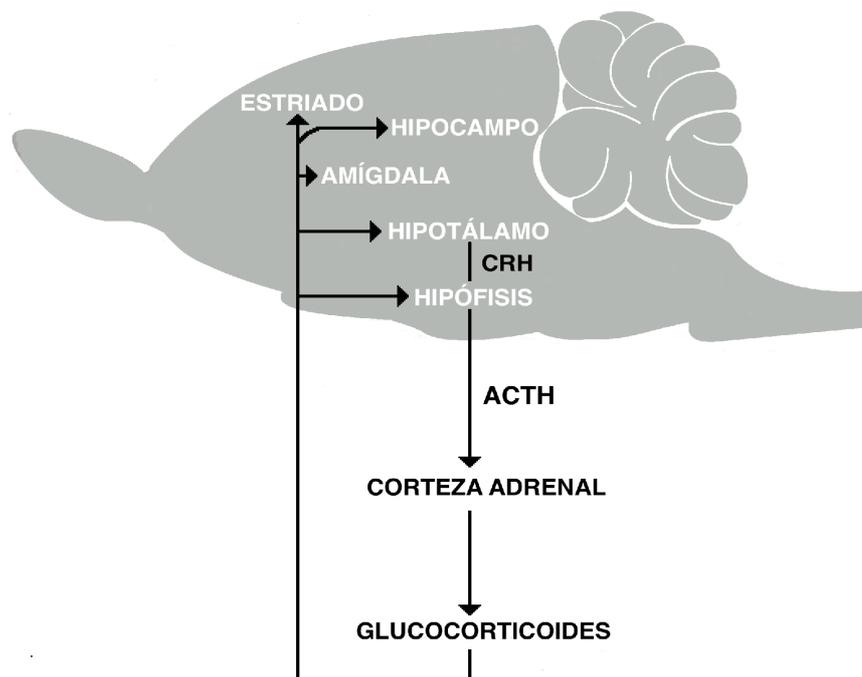


Figura 5. Representación esquemática del eje Hipotalámico-Hipofisiario-Adrenal. Señala estructuras relacionadas en la formación de la memoria y en las que los glucocorticoides ejercen sus efectos. Modificado de Joëls y Krugers, 2007.

El 90% de los glucocorticoides se encuentran unidos a la proteína transportadora, dificultando así, su acceso a las diferentes regiones del cerebro. Sin embargo, se ha sugerido que la concentración de glucocorticoides en el cerebro coincide con la concentración plasmática durante las variaciones circadianas o situaciones de estrés y además, estas concentraciones no representan valores mayores de 10^{-6} M (Makara & Haller, 2001).

Los glucocorticoides actúan sobre un amplio número de células blanco, incluyendo las células neuronales. Debido a su naturaleza lipofílica, son capaces de atravesar la

ANTECEDENTES

barrera hematoencefálica. Participan en funciones tales como la respuesta al estrés, la conducta sexual y los procesos antiinflamatorios (Tasker, Di, & Malcher-Lopes, 2006). Sin embargo, también existen evidencias de la participación de los glucocorticoides en procesos cognoscitivos como el aprendizaje y la memoria (Rooszendaal, 2000).

La actividad de los glucocorticoides en la modulación de la memoria depende de diversos factores tales como, el momento en el que se alcanza el pico de liberación como resultado de la administración de un estímulo o de la administración de exógena de glucocorticoides e incluso la concentración de glucocorticoides modulado por la magnitud del estímulo estresante o por la administración exógena. Estudios donde se administra sistémicamente corticosterona, muestran cambios en la adquisición y consolidación de la memoria. Zorawski y Killcross (2002), confirmaron que la memoria de una tarea apetitiva y de una tarea aversiva mejoraba cuando se administraba dexametasona (un agonista a los receptores de glucocorticoides) inmediatamente después del entrenamiento. Además, Hui et al. (2004), encontraron que la administración de corticosterona inmediatamente después del entrenamiento en una tarea de condicionamiento de miedo tiene un efecto sobre memoria y que la administración 3 horas después del entrenamiento no produce ningún efecto. Los resultados indican que la administración inmediata afecta la consolidación de la memoria y que además, el establecimiento de la información como una memoria estable se encuentra limitado temporalmente.

Por otro lado, los glucocorticoides ejercen un efecto dosis dependiente en forma de U-invertida sobre la formación de la memoria (Taylor, Ellenbogen, Washburn, & Jooper, 2011). Se ha sugerido que niveles moderados de glucocorticoides facilitan la memoria y niveles demasiado bajos o elevados provocan efectos nulos o un deterioro en la misma, respectivamente (Sandi, 2011). En un estudio conductual con ratas, Hui et al. (2004) observaron un aumento significativo en la supresión de la actividad durante la prueba de retención de un tarea de condicionamiento de miedo cuando se administró corticosterona en dosis de 3.0 mg/kg y no cuando se administró la dosis de 1.0 mg/kg. Además, en nuestro laboratorio, Quirarte et al. (2009), se ha encontrado que al inyectar corticosterona en el estriado dorsal, se produce facilitación sobre la consolidación de la memoria en una tarea de laberinto

acuático con claves pero no en una tarea de laberinto acuático en su versión espacial. Esto confirma que el estriado dorsal está implicado con la consolidación de la información de asociación de estímulos y no así con la información espacial y que la corticosterona en el estriado facilita la consolidación de la memoria de este tipo de información.

2.3.1.1. Receptores a glucocorticoides

El efecto que los glucocorticoides ejercen sobre el sistema nervioso está regulado mediante la activación de sus receptores. Existen dos tipos, los receptores a mineralocorticoides (MR o tipo I), que tienen una alta afinidad con el ligando y su activación requiere de bajos niveles circulantes de glucocorticoides y, los receptores a glucocorticoides (GR o tipo II), que tienen una afinidad por el ligando de 6 a 10 veces menor en comparación con los receptores tipo I. En general, se estima que el 80% de los MR son activados bajo condiciones en donde los glucocorticoides permanecen dentro de las concentraciones basales, mientras que la activación de los GR ocurre sólo cuando los niveles de glucocorticoides rebasa el estado basal, tal como se observa durante el pico de liberación de los glucocorticoides dentro del ciclo circadiano o durante situaciones de estrés.

Aunque se sabe que ambos receptores se encuentran distribuidos en el cerebro, los GR y MR se expresan asimétricamente y su densidad difiere entre regiones. Los GR se distribuyen ubicuamente (Figura 6), muestran una alta densidad de expresión en el hipocampo, al igual que en el septum y el núcleo paraventricular hipotalámico y, niveles de expresión de moderados a altos en el estriado, la amígdala y la corteza cerebral (Morimoto, Morita, Ozawa, Yokoyama, & Kawata, 1996). Por otra parte, los MR muestran un patrón de distribución más discreto, encontrando una densidad mayor de expresión en ciertas subregiones del hipocampo.

Los receptores a glucocorticoides actúan como un factor transcripcional. La caracterización del receptor permite reconocer seis regiones A, B, C, D, E, y F. La región del dominio *N*-terminal (A/B) interactúa con la maquinaria responsable de la transcripción, por lo que contiene la secuencia responsable de la activación de los genes blanco. La región central del receptor (C) constituye un sitio altamente conservado en el que se localizan dos estructuras α -hélice denominadas “dedos de zinc”. Uno de estos conforma el dominio de unión al ADN, mientras que el otro

ANTECEDENTES

regula la formación de homodímeros. Este dominio además de permitir la dimerización, regula la traslocación al núcleo y la transactivación. El dominio C-terminal o dominio de unión a la hormona (regiones D, E y F) es un sitio moderadamente conservado. Además de poseer las secuencias necesarias para que ocurra la interacción hormona-receptor, también se encuentran las secuencias requeridas para la unión de proteínas de choque térmico y para el silenciamiento de las funciones del receptor en ausencia del ligando (Gupta & Lalchandama, 2002).

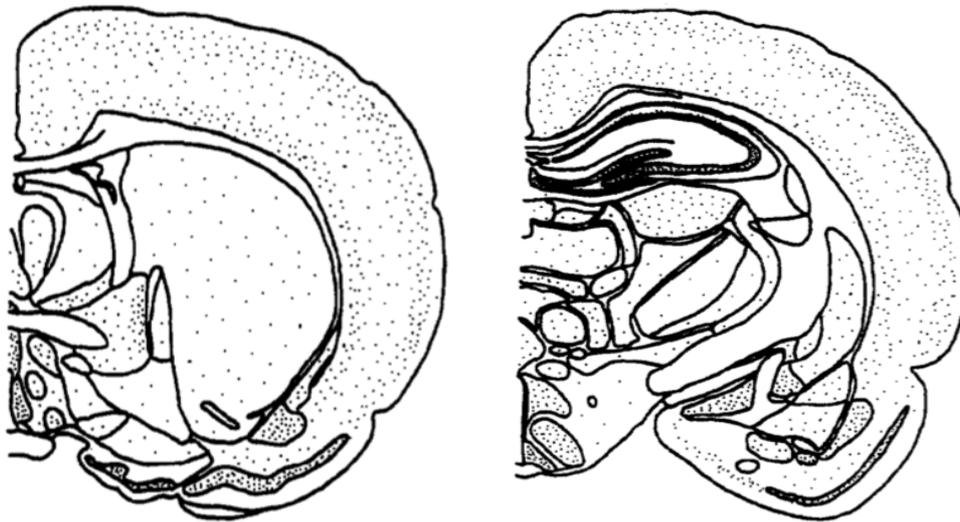


Figura 6. Representación esquemática de la distribución de los receptores a glucocorticoides tipo II en el estriado y en el hipocampo. Tomado de Morimoto et al., 1996).

En ausencia del ligando, el receptor se encuentra en el citoplasma asociado a proteínas de choque térmico, como la HSP90 principalmente, pero también se encuentra la HSP70, la fosfoproteína p23 y las inmunofilinas p59 y FKBP52. El complejo formado por los glucocorticoides y las proteínas reguladoras no puede unirse al ADN ya que el sitio de unión se encuentra bloqueado. Sin embargo, esta interacción es necesaria para mantener el dominio C-terminal en una conformación favorable para la unión con el ligando.

Durante el proceso de activación, la hormona pasa a través de la membrana plasmática y se une al receptor. Esto permite la liberación de las proteínas con las que se encuentra asociado en el citoplasma. En esta fase ocurre además un proceso de dimerización que permite su entrada al núcleo celular. En el núcleo, los receptores se unen a los elementos responsivos a glucocorticoides (GRE), secuencias específicas de ADN que reconocen al complejo receptor-ligando. El

homodímero en conjunto con co-activadores o co-represores regulan la transcripción de genes dirigen diversos procesos (Figura 7).

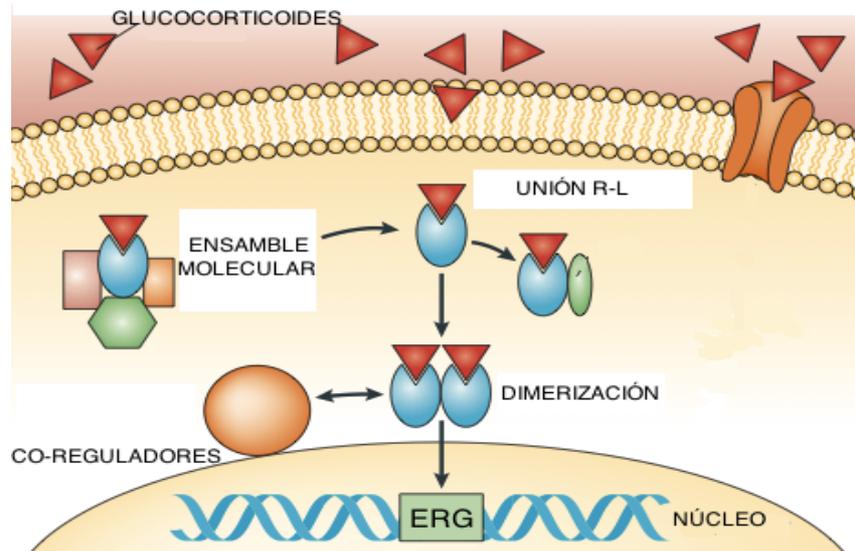


Figura 7. Esquema del proceso de activación de receptores a glucocorticoides tipo II.

Oitzl y colaboradores (2001), evaluaron la importancia de la dimerización del receptor a glucocorticoides en la consolidación de la memoria. En una cepa de ratones con mutación A458T que impide la dimerización de los receptores a glucocorticoides encontraron deficiencias en la consolidación de la memoria en la tarea del laberinto acuático.

Los glucocorticoides pueden ejercer sus efectos mediante dos vías, la vía genómica y la vía no genómica. Los efectos genómicos de los glucocorticoides están relacionados con los receptores que se encuentran distribuidos en el citoplasma. Por otra parte, la segunda vía, produce un efecto rápido y se sugiere que involucra receptores situados en la membrana. Involucra la interacción del monómero con otros factores de transcripción que permiten la activación o la represión de la transcripción de diferentes genes. Este mecanismo induce cambios a largo plazo en las funciones del sistema nervioso. Sin embargo, existen menos evidencias sobre los efectos de acción rápida de los glucocorticoides, independientes de transcripción.

Anteriormente se sabía que los principales factores que modulan la actividad de los glucocorticoides eran los niveles circulantes de hormona, la concentración y disponibilidad de la proteína transportadora y, la densidad de los dos tipos de receptores. Sin embargo, existe otro factor regulador que actúa activando o desactivando el complejo receptor-ligando, denominado metabolismo del enzima

ANTECEDENTES

mediado por pre-receptor. Este proceso consiste en regular la interacción de los glucocorticoides con sus receptores. En diversos estudios se ha demostrado el papel del enzima 11 β -hidroxisteroide deshidrogenasa (11 β -HSD) en este proceso y cuya función es catalizar la conversión de la forma activa de los glucocorticoides 11-hidroxicorticosteroides a su forma inactiva Cortisona, 11-dehidrocorticosterona, eliminando así su afinidad con los receptores a mineralocorticoides y glucocorticoides. Estudios recientes mostraron la existencia de las isoformas 11 β -HSD-1 y 11 β -HSD-2. La isoforma 11 β -HSD-1 es una proteína glicosilada de 34 KDa, ampliamente distribuida especialmente el hígado. Se localiza en el lumen y la membrana del retículo endoplásmico. La función principal de esta isoforma es generar la forma activa de los glucocorticoides a partir de su forma inactiva. La isoforma 11 β -HSD-2 de aproximadamente 40 KDa, por su parte, se ha caracterizado principalmente en la placenta y en el riñón. Posee una baja afinidad por los glucocorticoides y se le atribuye la reacción inversa de la que lleva a cabo la 11 β -HSD-1. Investigaciones recientes han demostrado la presencia de actividad del enzima 11 β -HSD en diversas regiones cerebrales como el hipocampo, el cerebelo, el hipotálamo y la hipófisis (Seckl, 1997).

3. JUSTIFICACIÓN

La investigación de los procesos de aprendizaje y memoria han permitido discernir los mecanismo neurobiológicos que subyacen la formación de la memoria de diferente tipos de información. El condicionamiento de miedo es un protocolo de interés dentro del área de aprendizaje y memoria que involucra el procesamiento de información de carácter emocional. El mal procesamiento o la respuesta exagerada hacia este tipo de información está relacionado con desórdenes emocionales. Aunque se sabe que la memoria no reside en una sola estructura cerebral, existen evidencias de que durante la formación de una memoria emocional es importante la participación de estructuras cerebrales como la amígdala, el estriado y el hipocampo. Existen factores que pueden regular la formación de la memoria condicionada, tales como la intensidad del estímulo condicionado, el intervalo entre los estímulos asociados y cambios fisiológicos causados por la administración de los estímulos (liberación de glucocorticoides y catecolaminas) por Diversas evidencias han demostrado que los glucocorticoides ejercen un efecto modulador sobre la consolidación de la memoria. Se ha demostrado que los glucococoricoides actúan a través de la activación de sus receptores. Estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro. Hui y colaboradores (2004) observaron que la administración sistémica de corticosterona ejercen un efecto dosis dependiente sobre la consolidación de la memoria de condicionamiento de miedo al tono. Sin embargo existe poca evidencia sobre el efecto de la administración intracerebral sobre la consolidación de la memoria. Quirarte y colaboradores (2009) realizó uno de los pocos estudios con esta finalidad y sugirió que la activación de los receptores a glucocorticoides del estriado es importante para la formación de la memoria de procedimiento pero no para la formación de la memoria espacial. Es por ello que el presente trabajo tiene como finalidad evaluar el efecto de activación de los receptores a glucocorticoides del estriado y el hipocampo sobre la consolidación de la memoria de una tarea de condicionamiento o de miedo al tono.

4. HIPÓTESIS

1. La administración de corticosterona en la región dorsal del estriado después del entrenamiento en la tarea de condicionamiento del miedo al tono, provocará facilitación de la consolidación de la memoria.
2. La administración de corticosterona en el hipocampo después del entrenamiento en la tarea de CMT no afectará la consolidación de la memoria.
3. La administración del antagonista de los receptores a glucocorticoides tipo II RU 486 bloqueará el efecto facilitador de la consolidación de la memoria causado por la corticosterona.

5. OBJETIVOS

General

Determinar el efecto de la activación de los receptores a glucocorticoides inmediatamente después del entrenamiento en el estriado y en el hipocampo sobre la consolidación de la memoria de la tarea de condicionamiento del miedo al tono.

Particulares

- Evaluar el efecto de la administración de corticosterona inmediatamente después del entrenamiento en la región dorsal del estriado y en el hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria en la tarea de condicionamiento del miedo al tono.

- Evaluar el efecto de la administración del antagonista de los receptores a glucocorticoides II RU 486 en el estriado dorsal sobre la consolidación de la memoria de la tarea de condicionamiento del miedo al tono.

6. MATERIALES Y MÉTODO

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)”.

6.1. Sujetos

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con peso de 250-350 gramos provenientes del bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se llevaron al bioterio del Laboratorio de Aprendizaje y Memoria y se colocaron individualmente en cajas de acrílico transparentes. Permanecieron bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12:12, 7:00 am - 7:00 pm) y temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*.

6.2. Cirugía

Una semana después de que las ratas llegaron al bioterio se les sometió a un procedimiento de cirugía esterotáxica. Cada rata fue anestesiada con pentobarbital sódico (50 mg/Kg) vía intraperitoneal. Se administró atropina (0.4 mg/ml) para evitar complicaciones respiratorias y solución salina isotónica para evitar la deshidratación durante la intervención. Después de la anestesia se rasuró la parte dorsal de la cabeza y se fijó la rata en un aparato estereotáxico. Se realizó una incisión de aproximadamente 1.5 cm a nivel de la línea media en la piel del cráneo y se retiró el tejido del periostio para mantener visible a Bregma (punto de unión entre la sutura sagital y la sutura fronto-parietal del cráneo). Con ayuda de un taladro de uso fino se realizaron orificios bilaterales en el cráneo y se implantaron cánulas guías (hechas de tubo de aguja hipodérmica de acero inoxidable del número 23) de 11 mm para el estriado dorsal y de 10 mm para el hipocampo dorsal. La inserción de las cánulas se realizó conforme las coordenadas establecidas en el atlas del cerebro de rata de (Paxinos & Watson, 2005). Para la implantación de cánulas en el estriado dorsal se utilizaron las coordenadas anteroposterior (AP)= Bregma; mediolateral (ML)= ± 3.2 mm y dorsoventral (DV)= -4.0 y en el hipocampo dorsal se utilizaron AP =3.8ML; ML= ± 2.2 mm y DV= -2.6 mm. Las cánulas se fijaron con ayuda de un tornillo y

cemento dental. Al finalizar el procedimiento, se colocó un tapón-estilete del mismo tamaño de la cánula.

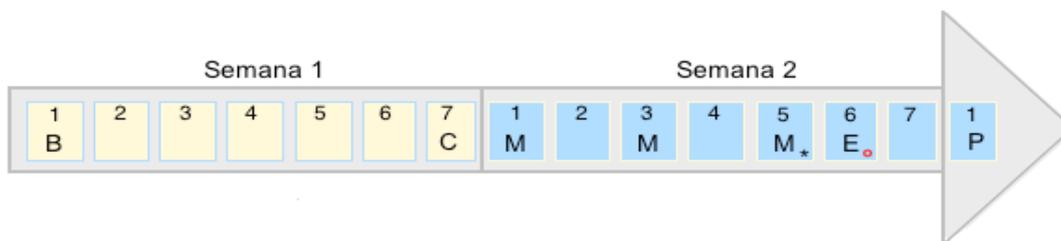


Figura 8. Línea del tiempo que muestra el proceso y desarrollo de los experimentos. B, llegada al bioterio; C, cirugía; M, manipulación; E, entrenamiento y P, perfusión.* indica el día de manipulación en el que se colocaron los falsos inyectores para simular el proceso de inyección. ° indica el proceso de microinfusión.

6.3. Sesión de manipulación y habituación

Durante la semana de recuperación, los sujetos recibieron tres sesiones de manipulación (4 minutos \pm 1). El objetivo principal fue habituarlos a la presencia y manejo del investigador. Consistió en tomar al sujeto con una toalla y darle suaves masajes en la región dorsal. En la última sesión de manipulación se colocaron inyectores guía (falsos inyectores) del mismo tamaño de las cánulas con el fin de simular las condiciones del proceso de microinyección al que fueron sometidas inmediatamente después del entrenamiento. Antes y después de cada sesión se colocó a los sujetos (dentro de su caja habitación) en un estante localizado en un pasillo adyacente a las habitaciones donde se realizaron los experimentos (Figura 8).

6.4. Cámara de condicionamiento del miedo al tono

Una semana después de la cirugía se entrenó a los sujetos en la tarea de condicionamiento de miedo al tono. La tarea se ejecutó en una cámara de condicionamiento (San Diego Instruments) localizada en una habitación aislada de sonidos. La cámara está hecha de acrílico transparente (33 x 25 x 21 cm), cuenta con un generador de sonido y una fuente de luz, colocados ambos en la parte central de la tapa. Tiene un piso electrificable hecho de 16 barras de acero inoxidable de 0.5 cm de diámetro, separadas unas de otras por una distancia de 1.4 cm. El piso está conectado a un generador de corriente.

La cámara está conectada a una computadora que mediante el software especializa-

do Freeze Monitor (San Diego Instruments) registró la actividad de los sujetos. El sistema funciona a través de una red de haces de luz infrarroja localizada en el interior de la cámara (16 x 16) que se interrumpen cada vez que el animal se mueve (Figura 9).

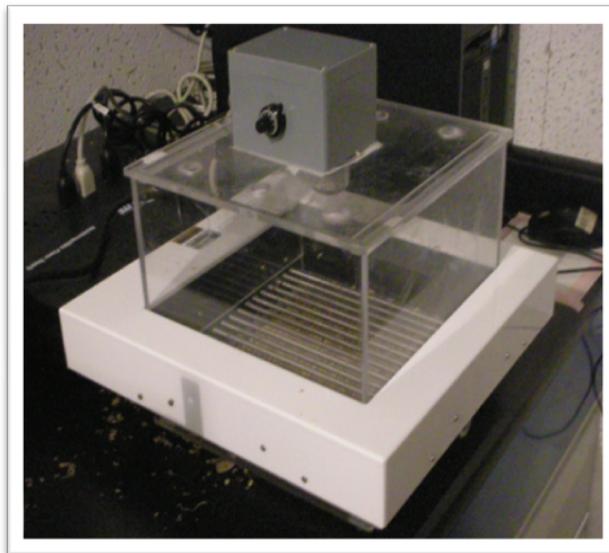


Figura 9. Fotografía de la cámara de condicionamiento de miedo al tono.

El condicionamiento de miedo al tono se realizó en dos sesiones: la sesión de entrenamiento realizada el día 1 (D1) y la sesión de prueba efectuada el día 3 (D3). Todos los experimentos se llevaron a cabo en un horario matutino, entre las 10:00 am y las 2:00 pm.

6.4.1. Sesión de entrenamiento

Durante la sesión de entrenamiento (D1) se colocó a la rata dentro de la cámara de condicionamiento (Figura 9). Los primeros 3 minutos se permitió que explorara su entorno (línea base) y al término del último minuto se presentó una asociación de estímulos. Cada asociación de estímulos se denomina ensayo y está integrado por un tono (10 s) y un choque eléctrico en las patas (2 s). El choque fue administrado 3 segundos después del término del tono. Se administró un total de 5 ensayos, separados por un intervalo 30 segundos (Figura 10).

La rata fue retirada de la cámara 30 segundos después del último choque y se regresó a su caja habitación. Posteriormente se trasladó a un cuarto adyacente donde se realizó el proceso de administración del fármaco. La cámara se limpió con una solución de alcohol al 70 % entre cada sesión de entrenamiento.

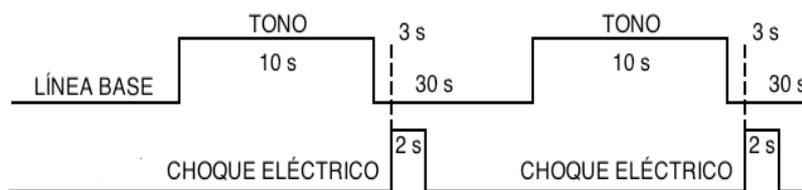


Figura 10. Esquema del protocolo de entrenamiento. Durante la línea base (LB) no se presentó ningún estímulo. Se representa los primeros dos ensayos de la sesión de entrenamiento y se muestra la duración de los estímulos, del intervalo inter-estímulo (3 s) y del intervalo inter-ensayo (30 s).

6.4.2. Fármacos y microinyección

La preparación del fármaco se realizó disolviendo 5 mg de corticosterona (Sigma) en 3.33 ml de etanol al 100%. Esta solución se mantuvo a 4°C y protegida de la luz. A partir de esta solución stock se prepararon diluciones en solución salina para obtener las concentraciones apropiadas (5 ng, 10 ng y 20 ng). Las diluciones tuvieron una concentración final menor o igual a 2% de etanol. Adicionalmente se preparó una solución vehículo a partir de solución salina y etanol.

Se utilizó el antagonista RU 486 (mifepristona, Sigma) para bloquear los receptores tipo II. La preparación del antagonista se realizó de la misma forma que la corticosterona (10 ng). Todas las soluciones se prepararon minutos antes de la administración.

La administración de corticosterona se realizó inmediatamente después del entrenamiento. Se utilizó una bomba de infusión lenta (WPI modelo sp200i) donde se colocaron jeringas Hamilton de 10 μ l conectadas a través de un tubo de polietileno calibre PE-20 a inyectores de 11 y 12 mm de longitud (fabricados con tubo de aguja hipodérmica de acero inoxidable del número 30) para el hipocampo y el estriado, respectivamente. El volumen administrado en el estriado fue de 1 μ l/1 min, bilateralmente y en el hipocampo se administraron 0.5 μ l/1 min, bilateralmente. La administración del RU 486 se realizó 15 minutos antes de entrenamiento (0.5 μ l/1 min, bilateralmente) e inmediatamente después del entrenamiento se realizó la administración la corticosterona (0.5 μ l/1 min bilateralmente). El inyector se retiró un minuto después con el fin de permitir la correcta difusión del fármaco y se colocaron nuevamente los tapones-estilete.

6.4.3. Sesión de prueba

La sesión de prueba se llevó a cabo 48 horas después del entrenamiento (D3). Esta sesión tuvo la misma duración que el entrenamiento, sin embargo sólo se presentó el tono.

Con la finalidad de evitar que la respuesta de condicionamiento se debiera al contexto, se modificó la intensidad luminosa del cuarto de experimentación. Para modificar el contexto de la cámara de condicionamiento se colocó dentro de una caja negra de madera (50 x 50 x 50 cm) con la parte frontal descubierta que contenía una fuente luminosa roja (60 watts) en el vértice superior derecho del fondo. También se colocó un patrón de barras bicolor (blanco-negro) alrededor y se cubrió el piso con de acrílico blanco con textura rugosa (Figura 11). Se utilizó una solución de ácido acético al 5% para limpiar la cámara entre cada sesión.

Tanto en la sesión de entrenamiento como en la sesión de prueba se registró la respuesta de la respuesta de congelamiento (cada 5 segundos).

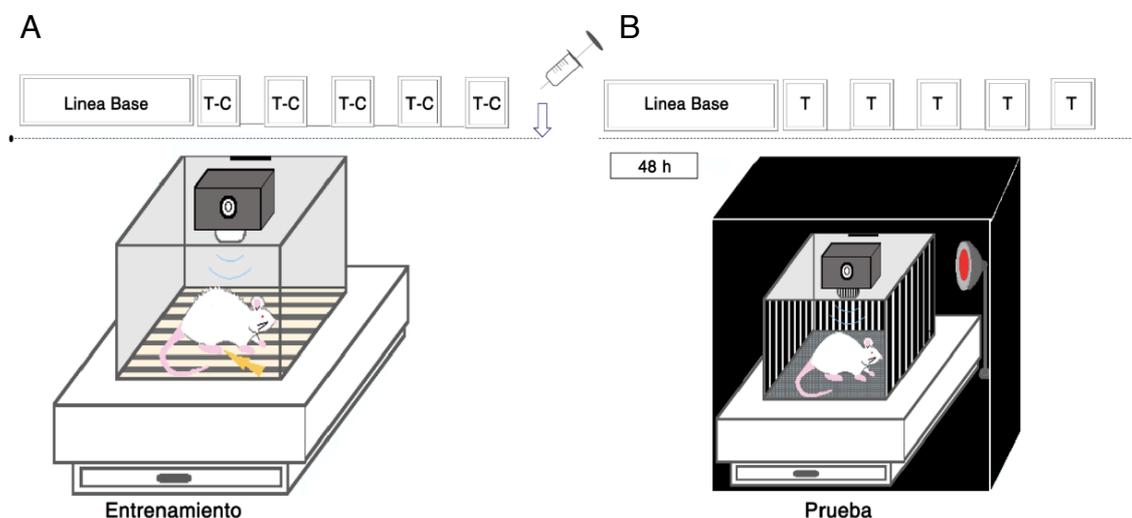


Figura 11. Esquema de la secuencia de ensayos y la cámara donde se realizó el entrenamiento y la prueba de retención. A) Muestra las características de la cámara durante la sesión de entrenamiento. B) Muestra las modificaciones realizadas al contexto de la cámara para realizar la prueba de retención.

6.5. Perfusión

Al finalizar todas las pruebas conductuales, se administró a los sujetos un sobredosis de pentobarbital sódico (Sedalphorte) y se perfundieron vía intracardiaca con solución salina isotónica seguida de formaldehído al 4%. Posteriormente, se

extrajerón los cerebros y se almacenaron en un frasco con formaldehído al 4% hasta el momento en el que se realizaron los cortes.

6.6. Análisis histológico

El análisis histológico permitió verificar la localización de las cánulas y las puntas de los inyectores en los cerebros extraídos. Para ello se realizaron cortes coronales de 50 μm de espesor con un criostato (Leica CM1850) a una temperatura de -20°C . Los cortes se colocaron en portaobjetos previamente gelatinizados y se tiñeron con la técnica de violeta de cresilo.

6.7. Diseño experimental y análisis estadístico

Con el objetivo de evaluar las intensidades de los parámetros adecuadas para obtener un aprendizaje estable pero moderado y que permitieran evaluar el efecto modulador de la corticosterona sobre la consolidación de la memoria de la tarea de CMT, se realizó el siguiente experimento:

6.7.1. Experimento I

Se utilizaron grupos independientes de ratas para evaluar el efecto de la intensidad de los estímulos (tono o choque) sobre la consolidación de la memoria de la tarea de CMT. Para evaluar el efecto del tono se formaron dos grupos de ratas que fueron entrenadas con un tono de 70 o 90 dB y con un choque de 1.0 mA. Adicionalmente se utilizaron dos grupos de ratas a las que se les entrenó presentándole sólo un tono de 70 o 90 dB.

Con la finalidad de evaluar el efecto del choque se estudiaron dos grupos independientes de ratas que fueron entrenados con un tono de 90 dB y un choque de 0.7 o 0.8 mA.

6.7.2 Experimento II

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la activación de los receptores a glucocorticoides del estriado sobre la consolidación de la memoria de la tarea de CMT, Se entrenaron grupos independientes de ratas (90 dB, 0.7 mA) e inmediatamente después del entrenamiento se les administró corticosterona (5, 10 o 20 ng) o solución vehículo en el estriado dorsal. La prueba se realizó 48 horas

después. Se registró la respuesta de inmovilización tanto en la sesión de entrenamiento como en la prueba.

6.7.3. Experimento III

Este experimento tuvo como objetivo evaluar el efecto de la activación de los receptores a glucocorticoides del hipocampo sobre la consolidación de la memoria de la tarea de CMT. Se entrenaron grupos independientes de ratas (90 dB, 0.7 mA) e inmediatamente después del entrenamiento se les administró corticosterona (5, 10 o 20 ng) o solución vehículo en el hipocampo dorsal. La prueba se realizó 48 horas después.

6.7.4. Experimento IV

Este experimento se realizó con la finalidad de determinar la participación de los receptores a glucocorticoides tipo II en la consolidación de la memoria del CMT. Para ello se formaron grupos independientes de ratas a los que se les administró solución vehículo o el antagonista RU486 15 minutos antes del entrenamiento e inmediatamente después del entrenamiento recibieron solución vehículo o 5 ng de corticosterona (Tabla 2). La prueba se realizó 48 horas después. Se registró la respuesta de inmovilización tanto en la sesión de entrenamiento como en la prueba.

Cada sesión tuvo una duración de 6 minutos y en ambas se registró la conducta de congelamiento (freezing) cada 5 segundos. El análisis de los resultados de cada experimento se realizó con una prueba de t pareada para realizar comparaciones entre sesiones. Para realizar comparaciones entre grupos de cada una de las sesiones, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías de medidas repetidas, un ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Bonferroni.

Tabla 1. Grupos utilizados para evaluar el efecto de la administración del antagonista RU 486 en el estriado sobre la consolidación de la memoria de la tarea de condicionamiento de miedo al tono.

Grupos		
	Antes del entrenamiento	Después del entrenamiento
Tratamiento	Vehículo	Vehículo

MATERIAL Y MÉTODO

	RU486	Vehículo
	Vehículo	Corticosterona (5 ng)
	RU486	Corticosterona (5 ng)

7. RESULTADOS

7.1. Verificación histológica

Se realizó el análisis histológico para verificar la localización de las puntas de las cánulas (Figura 12, 13, 14 y 15). En el análisis estadístico se consideraron únicamente los datos de las ratas en las que se observó que las cánulas estuvieran colocadas bilateralmente en las estructuras de interés.

7.1.1. Estriado

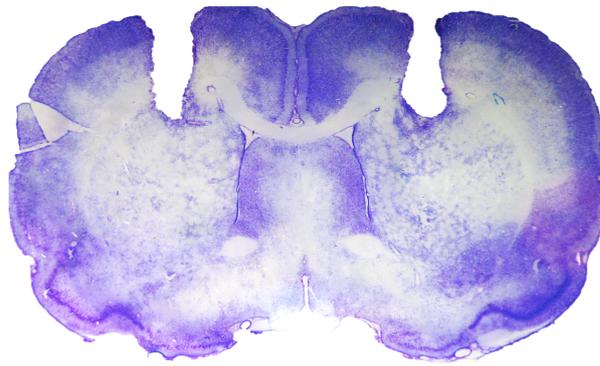
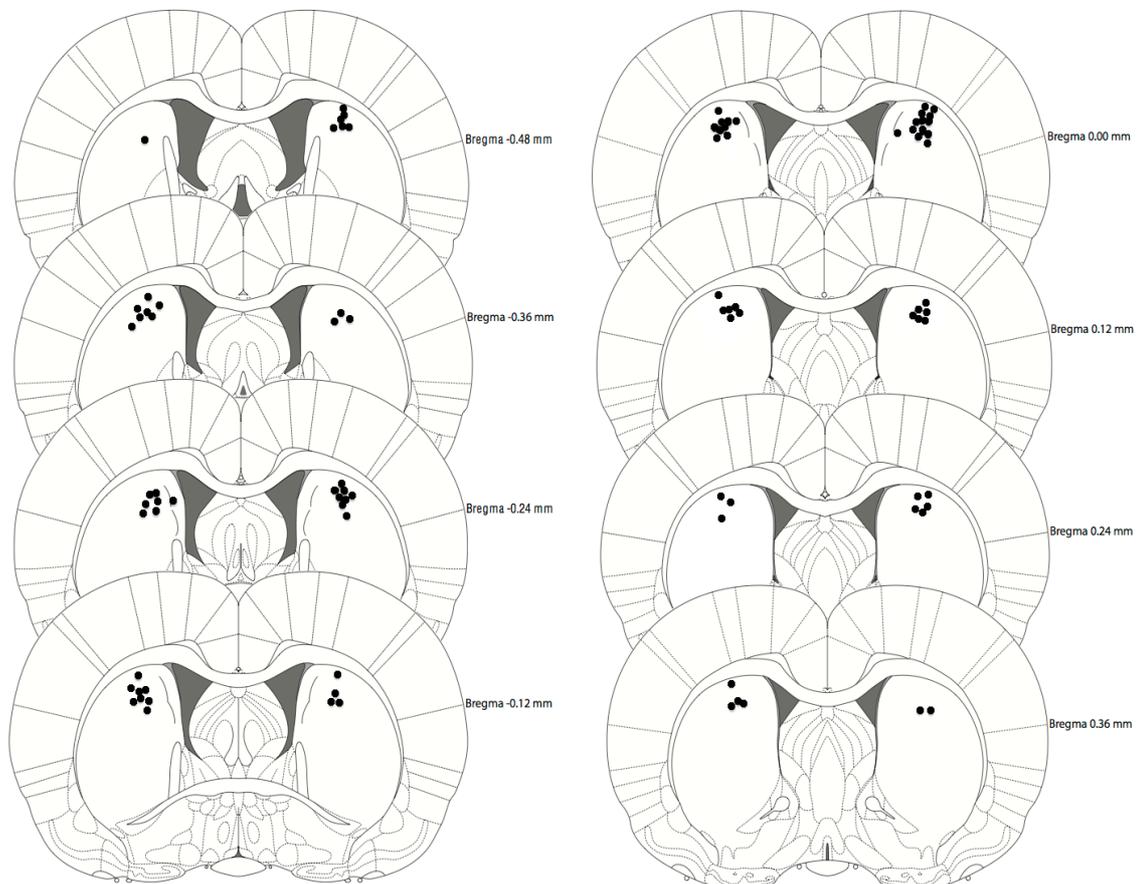


Figura 12. Fotografía de un corte coronal de un cerebro de rata teñido con la técnica de violeta de cresilo. Se observa la localización de las puntas de las cánulas en el estriado dorsal.

A)



RESULTADOS

B)

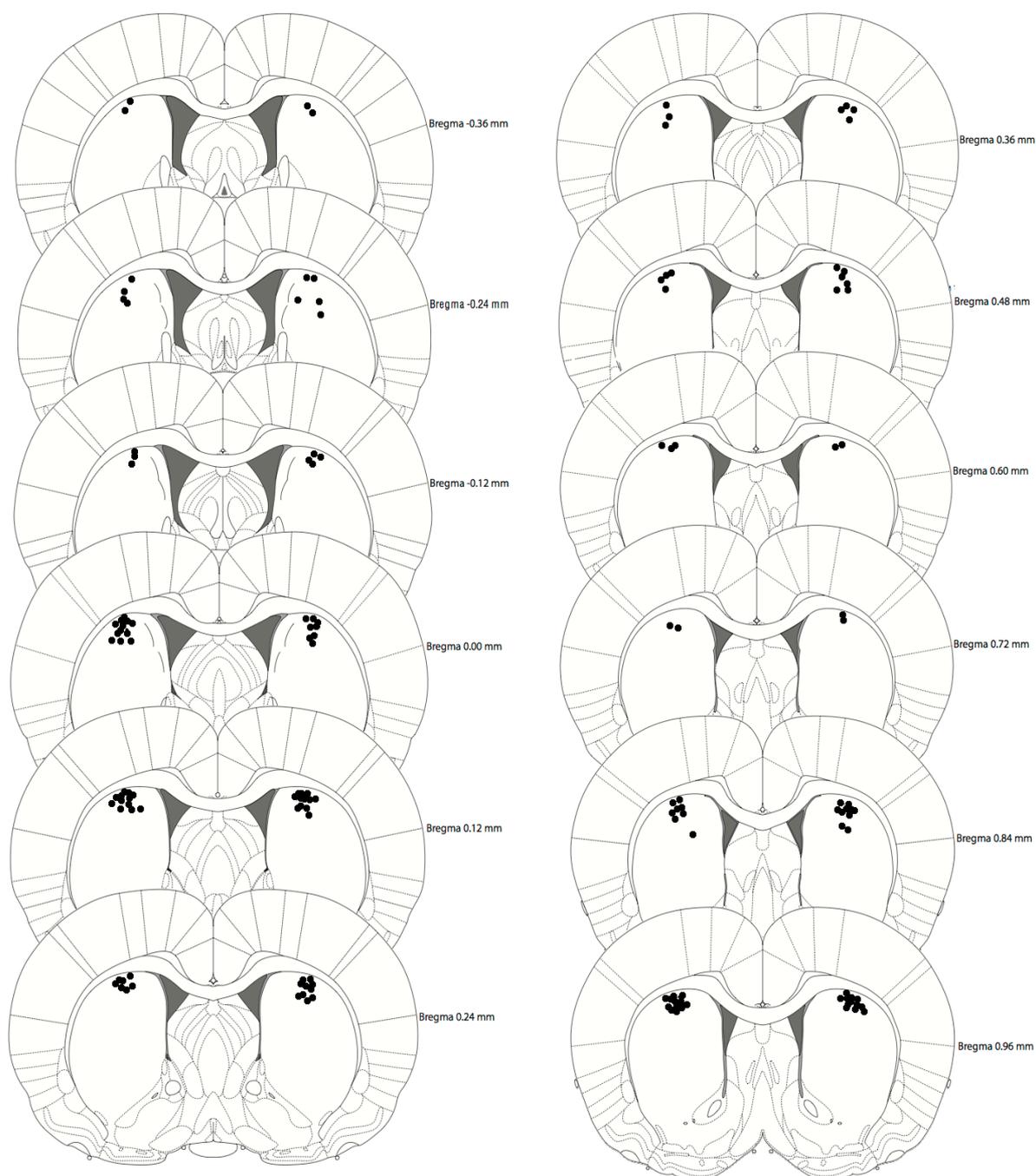


Figura 13. Representación esquemática de cortes coronales del cerebro de rata. Se indica mediante puntos, la localización de las puntas de los inyectores. A) Muestra la localización de las puntas de los inyectores en los cerebros de los sujetos que se utilizaron para evaluar las intensidades de los estímulos sobre la consolidación de la memoria de la tarea de condicionamiento de miedo al tono (experimento I). B) Representa la localización de las puntas de los inyectores en los cerebros de los sujetos en los que se evaluó el efecto de la activación o el bloqueo de los receptores a glucocorticoides mediante la administración corticosterona o del el antagonista RU 486.

7.1.2. Hipocampo



Figura 14. Fotografía de un corte coronal de un cerebro de rata teñido con la técnica de violeta de cresilo. Se observa la localización de las puntas de las cánulas en el hipocampo dorsal.

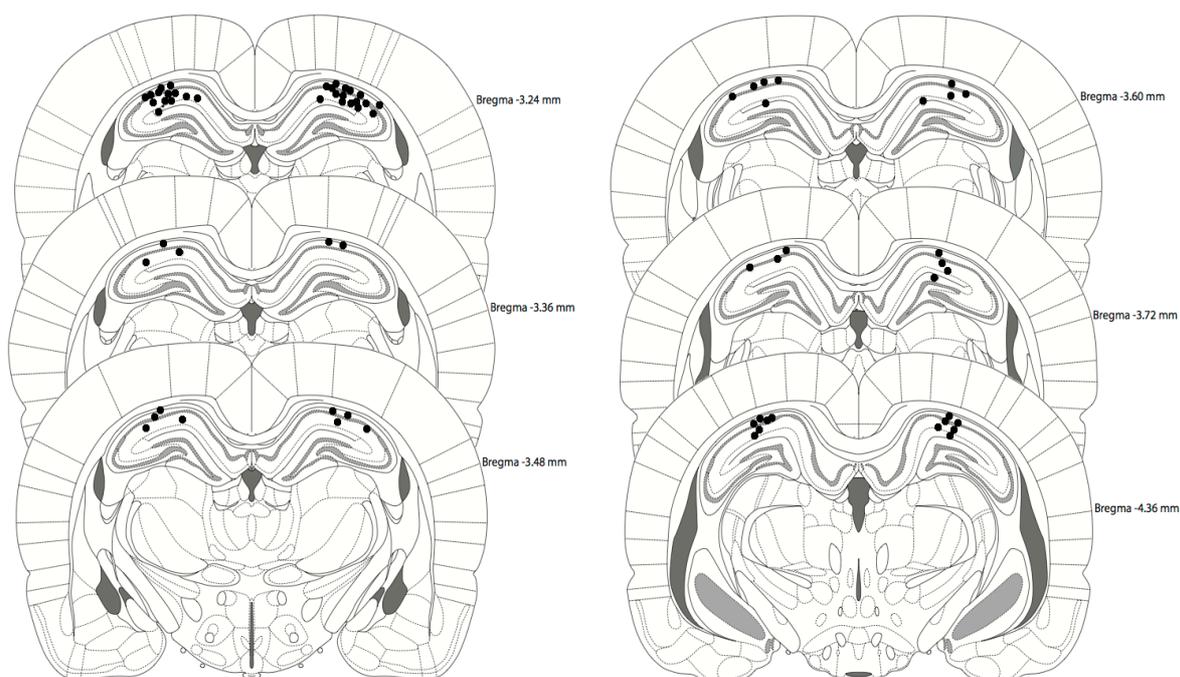


Figura 15. Representación esquemática de cortes coronales del cerebro de rata. Se muestra el sitio de localización bilateral de las puntas de los inyectores en el hipocampo dorsal indicándose mediante puntos.

7.2. Experimento I: Determinación de las condiciones experimentales

Debido a que el objetivo fundamental del trabajo fue evaluar el efecto modulador de los glucocorticoides en la consolidación de la memoria en la tarea de CMT se requería de un aprendizaje estable pero moderado. Por tal motivo, los siguientes

experimentos se realizaron con la finalidad de establecer los parámetros adecuados para lograr dicho objetivo.

7.2.1. Efecto de la intensidad del tono sobre la consolidación de la memoria de la tarea de CMT

Los resultados del grupo 70 dB ($n=8$) mostraron un porcentaje de congelamiento de 15.68 % durante el entrenamiento y de 17.16 % durante la prueba. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las sesiones de este grupo ($t=0.83$ y $p=0.22$). El grupo 90 dB ($n=8$) registró 12.23 % de congelamiento durante el entrenamiento y 13.86 % en la sesión de prueba. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($t=1.36$ y $p<0.12$). Los resultados del grupo 70 dB-1.0 mA ($n=9$) mostraron un promedio de congelamiento de 15.11 % durante la sesión de entrenamiento y de 55.70 % durante la prueba, revelando diferencias estadísticamente significativas entre las sesiones ($t=8.61$ y $p=0.0005$).

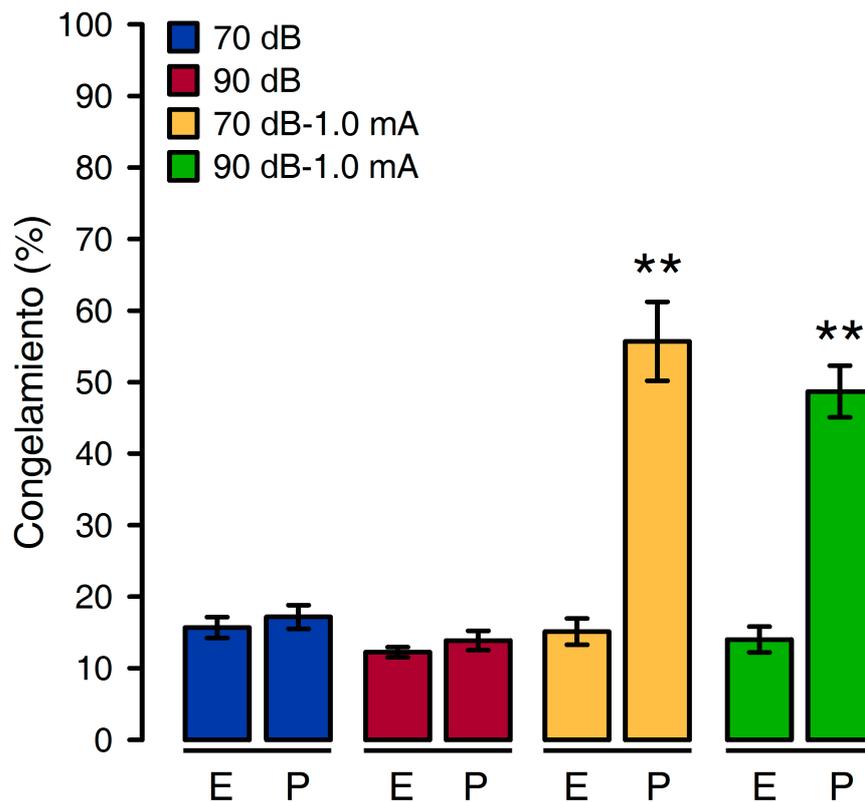


Figura 16. Efecto de la intensidad del tono durante la tarea de miedo al tono. Se muestra el porcentaje de congelamiento + error estándar (EE) del periodo en el que se presentó el tono durante la sesión de entrenamiento (E) y la sesión de prueba (P). Los asteriscos (**) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a la sesión de entrenamiento.

RESULTADOS

El porcentaje de congelamiento del grupo 90 dB-1.0 mA (n=9) durante el entrenamiento fue de 14.00 %, y mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al porcentaje de congelamiento de la sesión de prueba que fue de 48.70 % ($t= 5.92$ y $p= 0.002$). Los resultados de este experimento indican que la respuesta de congelamiento no fue debida al tono sino a la asociación del EC con el EI (tono y choque) (Figura 16).

El porcentaje de congelamiento durante la LB y el periodo en que se presentó cada uno de los tonos en la sesión de entrenamiento fue similar entre los grupos. El ANOVA realizado con estos resultados no mostró diferencias estadísticamente significativas debidas al tratamiento ($F_{3,30}= 0.83$, $p= 0.49$), tampoco se observó un efecto significativo entre el porcentaje de congelamiento durante la presentación de cada uno de los tonos ($F_{5,150}= 1.49$, $p= 0.19$). La interacción tratamiento x tono tampoco reveló diferencias significativas ($F_{15,203}= 0.89$, $p= 0.57$).

En la sesión de prueba se observaron porcentajes de congelamiento similares entre los grupos durante la LB (70 dB= 14.21 %; 90 dB= 13.83 %; 70 dB-1.0 mA= 16.83 % y 90-1.0 mA dB= 12.31 %). Sin embargo, se observó un incremento en el porcentaje de congelamiento de los grupos 70 dB-1.0 mA y 90 dB-1.0 mA durante la presentación de los tonos 1 (33.60 y 26.96 %), 2 (56.17 y 39.80 %), 3 (63.80 y 58.29 %), 4 (65.01 y 62.24 %) y 5 (59.95 y 56.16 %) con respecto a los mismos periodos de los grupos a los que sólo se les entrenó utilizando un tono (1= 10.13, 12.97 %; 2= 18.97, 14.30 %; 3= 16.47, 13.58 %; 4= 24, 16.77 % y 5= 16.25 y 11.69 %).

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los grupos debido al tratamiento ($F_{3,30}= 34.05$, $p < 0.0001$). También se encontraron diferencias significativas debidas al tono ($F_{5,150}= 18.14$, $p < 0.0001$) y a la interacción tratamiento x tono ($F_{15,203}= 4.50$, $p < 0.0001$).

La prueba post hoc reveló diferencias significativas entre el grupo 70 dB y el grupo 70 dB-1.0 mA durante el periodo en el que se presentó el tono 1 ($t= 2.99$ y $p < 0.05$), el tono 2 ($t=4.74$ y $p < 0.001$), el tono 3 ($t= 6.04$ y $p < 0.001$), el tono 4 ($t= 5.23$ y $p < 0.001$) y el tono 5 ($t=5.57$ y $p < 0.001$). También se encontraron diferencias significativas entre este grupo y el grupo 90 dB-1.0 mA durante la presentación del tono 3 ($t= 5.33$ y $p < 0.001$), el tono 4 ($t= 4.88$ y $p < 0.001$) y el tono 5 ($t= 5.09$, $p < 0.001$). El análisis también reveló diferencias significativas entre el porcentaje de

RESULTADOS

congelamiento del grupo 70 dB-1.0 mA y del grupo 90 dB-1.0 mA durante el periodo en el que se presentó el tono 2 ($t= 5.34$, $p < 0.001$ y $t= 3.25$, $p < 0.01$), el tono 3 ($t= 6.41$, $p < 0.001$ y $t= 5.70$, $p < 0.001$), el tono 4 ($t= 6.25$, $p < 0.001$ y $t= 5.80$ y $p < 0.001$) y del tono 5 ($t=6.16$, $p < 0.001$ y $t= 5.68$, $p < 0.001$) con respecto a los mismos periodos del grupo 90 dB. Estos resultados confirman la idea de que el incremento en la respuesta condicionada durante en la sesión de prueba se debe a la asociación de estímulos y no sólo al tono (Figura 17).

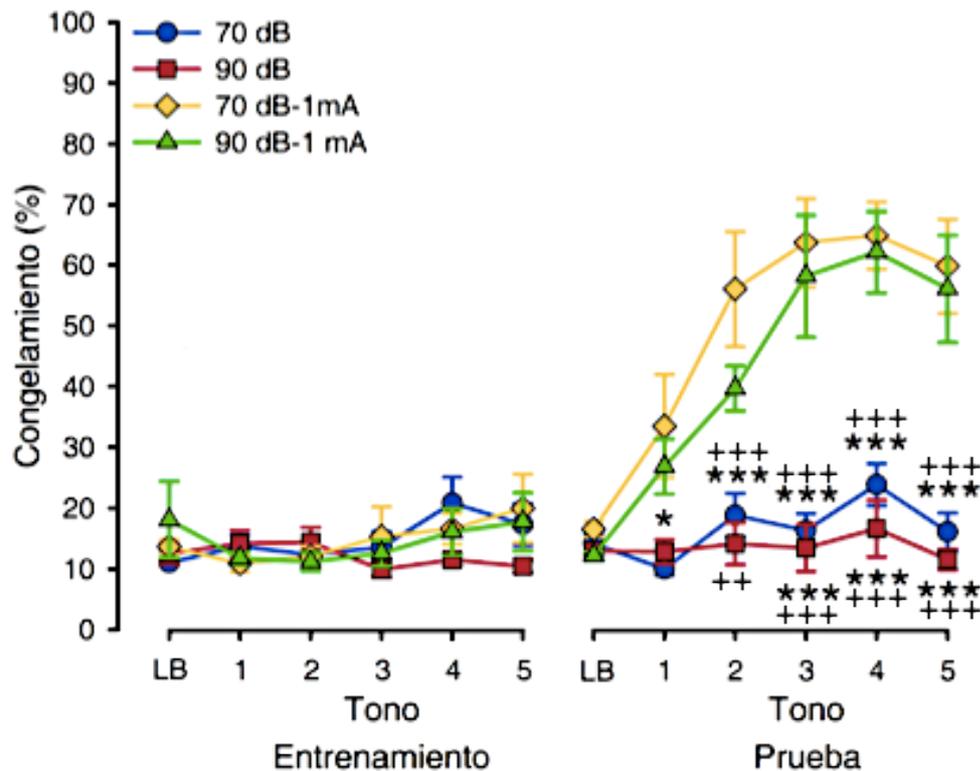


Figura 17. Efecto de la intensidad del tono a lo largo de la sesión de entrenamiento y de prueba en la tarea de condicionamiento de miedo al tono. Se muestra el porcentaje de congelamiento + EE del periodo de la LB y del periodo en el que se presentaron los tonos. Los asteriscos y el signo de suma (***) y (+++) indican diferencias significativas.

El porcentaje de congelamiento del periodo previo a la presentación del tono (LB) durante la sesión de prueba fue similar entre los grupos (70 dB = 14.21 %, 90 dB = 13.83 %, 70 dB-1.0 mA = 16.83 % y 90 dB-1.0 mA = 12.31 %). El ANOVA no mostró diferencias significativas en este periodo ($F= 0.87$, $p= 0.53$). Durante el periodo en el que se presentó el tono se observó un incremento en la respuesta de congelamiento de los grupos a los que se les condicionó utilizando la asociación tono-choque (70

RESULTADOS

dB/1.0 mA= 55.70 % y 90 dB/1.0 mA= 48.70 %) pero no en los grupos a los que sólo se les presentó el tono (70 dB= 17.16 % y 90 dB= 13.86 %).

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los grupos ($F_{3,8} = 44.12$, $p = 0.0001$). La prueba post hoc reveló diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de congelamiento mostrado durante la presentación del tono del grupo 70 dB-1.0 mA ($t = 8.45$ y $p < 0.05$) y del grupo 90 dB-1.0 mA ($t = 6.91$, $p < 0.05$) con respecto al grupo 70 dB. También se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de congelamiento durante la presentación del tono del grupo 70 dB-1.0 mA ($t = 9.17$, $p < 0.05$) y el grupo 90 dB-1.0 mA ($t = 7.64$, $p < 0.05$) con respecto al grupo 90 dB (Figura 18). Estos resultados muestran que la intensidad de tono no produce diferencias en el promedio de la respuesta condicionada, sugiriendo así que las dos intensidades de tono evaluadas no son un factor determinante durante la emisión de la respuesta condicionada.

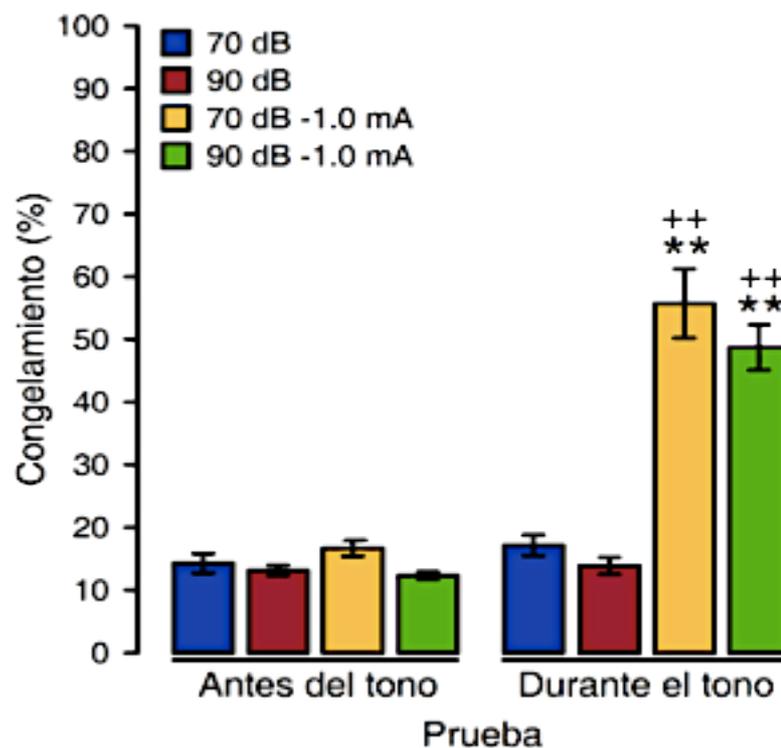


Figura 18. Efecto de la intensidad del tono sobre la consolidación de la memoria durante la tarea de condicionamiento de miedo al tono. Se muestra el porcentaje de congelamiento + EE del periodo de la LB (antes del tono) y del periodo en el que se presentó el tono de la sesión de prueba. Los asteriscos y signos de suma (** y ++ indican diferencias significativas con $p < 0.05$).

7.2.2. Efecto de la intensidad de choque sobre la consolidación de la memoria de la tarea de CMT

Los altos porcentajes de congelamiento observados en los grupos condicionados con una intensidad de choque de 1.0 mA, sugieren que la intensidad de este estímulo es un factor determinante en la regulación de la respuesta de congelamiento. Por tal razón, se evaluó el efecto de la intensidad del choque sobre la respuesta condicionada. Se utilizaron dos intensidades de choque, 0.7 ó 0.8 mA. En ambos casos se asoció con un tono de 90 dB. Para realizar el análisis estadístico se consideraron los datos del grupo 90 dB-1.0 mA del experimento anterior. Los resultados del grupo 90 dB-0.7 mA (n=9) mostraron un porcentaje de congelamiento de 13.21 % durante la sesión de entrenamiento, mientras que en la sesión de prueba se registró un promedio de 37.51 %. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre ambas sesiones ($t= 8.47$, $p= 0.0005$). Por otro lado, el análisis de los resultados del grupo 90 dB-0.8 mA (n=9) mostró diferencias significativas entre el porcentaje de congelamiento de la sesión de entrenamiento (16.82 %) y el de la sesión de prueba (50.71 %) ($t= 6.54$, $p= 0.001$).

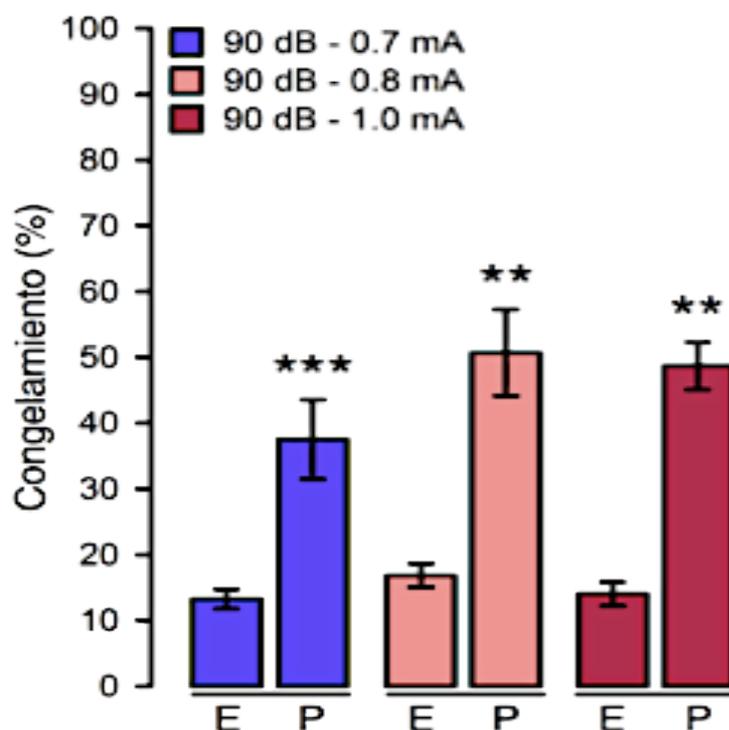


Figura 19. Efecto de la intensidad del choque durante la tarea de condicionamiento de miedo al tono. Se muestra el porcentaje de congelamiento + EE del periodo en el que se presentaron el tono durante la sesión de entrenamiento (E) y durante la sesión de prueba (P). Los asteriscos (** y ***) indican diferencias significativas, $p < 0.001$.

RESULTADOS

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de congelamiento de la sesión de entrenamiento (14.00 %) y la sesión de prueba (48.70 %) del grupo 90 dB-1,0 mA ($t= 5.92$, $p= 0.002$) (Figura 19). Estos resultados indican que las ratas de todos los grupos aprendieron la tarea.

Al realizar la comparación del periodo de la LB y de los periodos en los que se presentó el tono durante la sesión de entrenamiento, se observaron porcentajes de congelamiento similares entre los grupos. El ANOVA no mostró diferencias significativas debidas al tratamiento ($F_{5,48}= 0.57$, $p= 0.56$) ni tampoco se observó un efecto significativo en el porcentaje de congelamiento durante la presentación de cada uno de los tonos ($F_{5,240}= 2.16$, $p= 0.10$). Tampoco se encontraron diferencias significativas debidas a la interacción tratamiento x tono ($F_{5,120}= 1.13$, $p= 0.34$). Esto indica que la intensidad de choque no afecta la adquisición de la respuesta condicionada durante el entrenamiento.

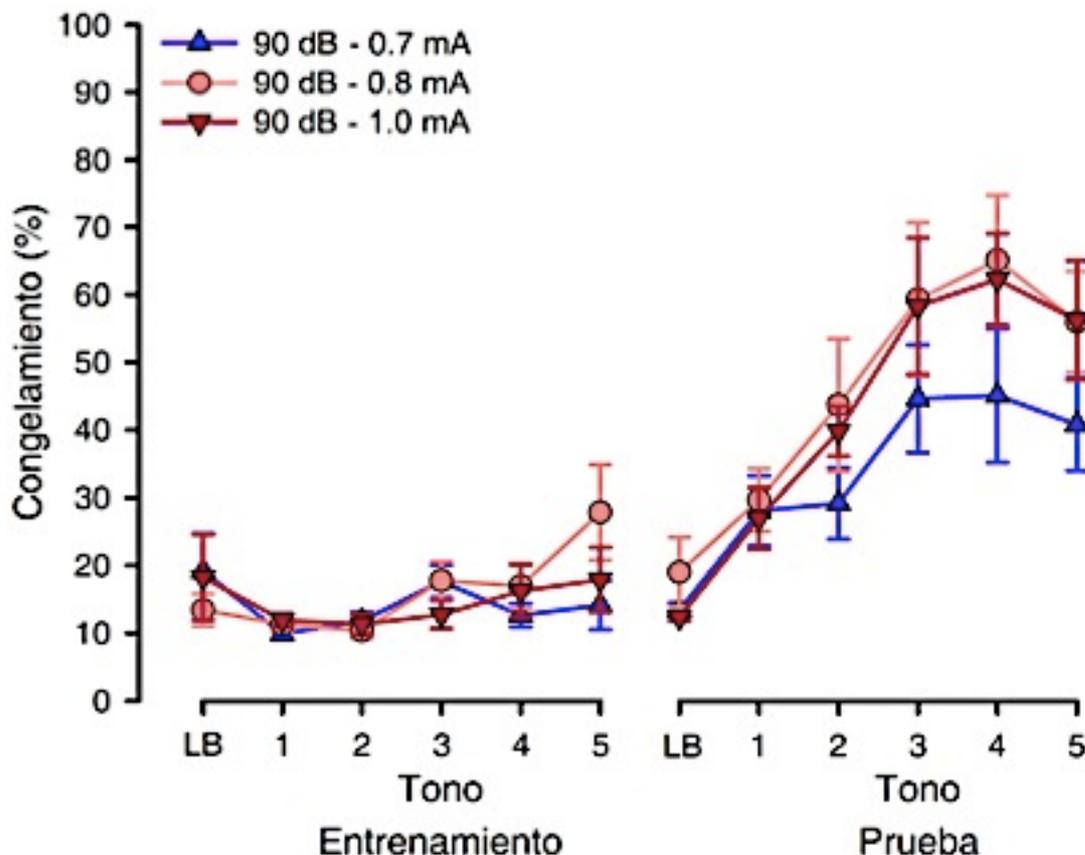


Figura 20. Efecto de la intensidad de tono a lo largo de la tarea de condicionamiento de miedo al tono. Se Muestra el porcentaje de congelamiento + EE de la LB y del periodo en el que se presentó cada uno de los tonos durante la sesión de entrenamiento y de la sesión de prueba.

RESULTADOS

La comparación de los grupos durante la sesión de prueba muestra porcentajes de congelamiento similares durante la LB (90 dB-0.7 mA= 14.47 %, 90 dB/0.8 mA= 18.86 % y 90 dB-1.0 mA= 12.31 %). Se observó un incremento en todos los grupos durante el periodo en el que se presentó el tono 1(90 dB-0.7 mA= 28.02 %, 90 dB-0.8 mA= 29.65 y 90 dB-1.0 mA= 26.96), el tono 2(90 dB-0.7 mA= 29.13.50% 90 dB-0.8 mA= 43.65 % y 90 dB-1.0 mA= 39.80 %), el tono 3 (90 dB-0.7 mA= 44.58 % 90 dB-0.8 mA= 59.28 % y 90 dB-1.0 mA= 58.29 %), el tono 4 (90 dB-0.7 mA= 45.05% 90 dB-0.8 mA= 65.06 % y 90 dB-1.0 mA= 62.24 %) y el tono 5(90 dB-0.7 mA= 40.77 % 90 dB-0.8 mA= 55.92 % y 90 dB-1.0 mA= 56.19 %). El ANOVA no mostró diferencias significativas debidas a la intensidad de choque ($F_{2,23}= 1.71$, $p= 0.20$), sin embargo, si se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tonos ($F_{5,115}= 21.36$, $p < 0.0001$). Aunque tampoco se encontraron diferencias debidas a la interacción tratamiento x tono ($F_{10,155}= 0.53$, $p= 0.86$).

La comparación del periodo previo a la presentación del tono durante la sesión de prueba mostró porcentajes de congelamiento similares entre los tres grupos (90 dB-

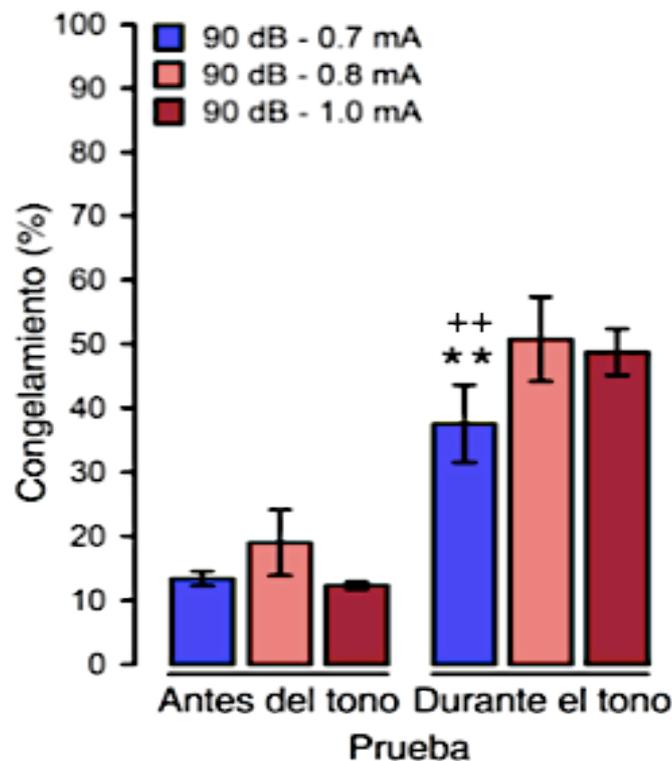


Figura 21. Efecto de la intensidad de choque sobre la consolidación de la memoria de la tarea de condicionamiento de miedo al tono. Muestra el porcentaje de congelamiento + EE del periodo de la línea base y del periodo en el que se presentó el tono durante la sesión de prueba. Los asteriscos y los signos de suma (*) representan diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$.

RESULTADOS

0.7 mA= 14.47 %, 90 dB-0.8 mA= 18.86 % y 90 dB-1.0 mA= 12.31 %). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($F_{2,3} = 1.20$, $p = 0.31$). Durante el periodo en el que se presentó el tono se observó un incremento en el porcentaje de congelamiento de todos los grupos (90 dB-0.7 mA= 37.61 %, 90 dB-0.8 mA= 57.61 % y 90 dB-1.0 mA= 48.70 %) en comparación con los resultados del periodo previo. El análisis estadísticos reveló diferencias significativas entre los grupos ($F_{2-3} = 14.82$, $p = 0.002$) durante este periodo.

La prueba post hoc mostró diferencias significativas en la respuesta de congelamiento del grupo 90 dB-0.7 mA con respecto 90 dB-0.8 mA ($t = 5.05$, $p < 0.05$) y al grupo 90 dB-1.0 mA ($t = 4.28$, $p < 0.05$) durante este periodo (Figura 21). Estos resultados indican que la magnitud de la respuesta condicionada está determinada por la intensidad del choque.

7.3. Experimento II: efecto de la activación de los receptores a glucocorticoides en el estriado dorsal sobre la consolidación de la memoria de la tarea de CMT

Para determinar el efecto de la activación de los receptores a glucocorticoides en el estriado se utilizaron grupos independientes: VEH, CORT 5 ng, CORT 10 ng y CORT 20 ng ($n = 9$) a los que se les entrenó utilizando una asociación de un tono de 90 dB con un choque de 0.7 mA e inmediatamente se les administró corticosterona en el estriado dorsal. Los resultados del grupo VEH mostraron un porcentaje de congelamiento menor durante la sesión de entrenamiento (17.80 %) en contraste con el porcentaje de congelamiento observado durante la sesión de prueba (37.75 %). El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre las sesiones de este grupo ($t = 4.00$, $p = 0.008$). También se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de congelamiento de la sesión de entrenamiento (18.25 %) y de prueba (55.21 %) del grupo CORT 5 ng ($t = 5.25$, $p = 0.003$). Los resultados del porcentajes de congelamiento del grupo CORT 10 ng durante la sesión de entrenamiento (23.48 %) y la sesión de prueba (38.04 %) fueron estadísticamente diferentes ($t = 2.10$, $p = 0.05$). El análisis de la respuesta de congelamiento del grupo CORT 20 ng de la sesión de entrenamiento (16.98 %) y de prueba (29.15 %) también mostró diferencias estadísticamente significativas ($t = 5.97$,

RESULTADOS

$p= 0.002$) (Figura 22). Estos resultados indican que todos los grupos aprendieron la tarea.

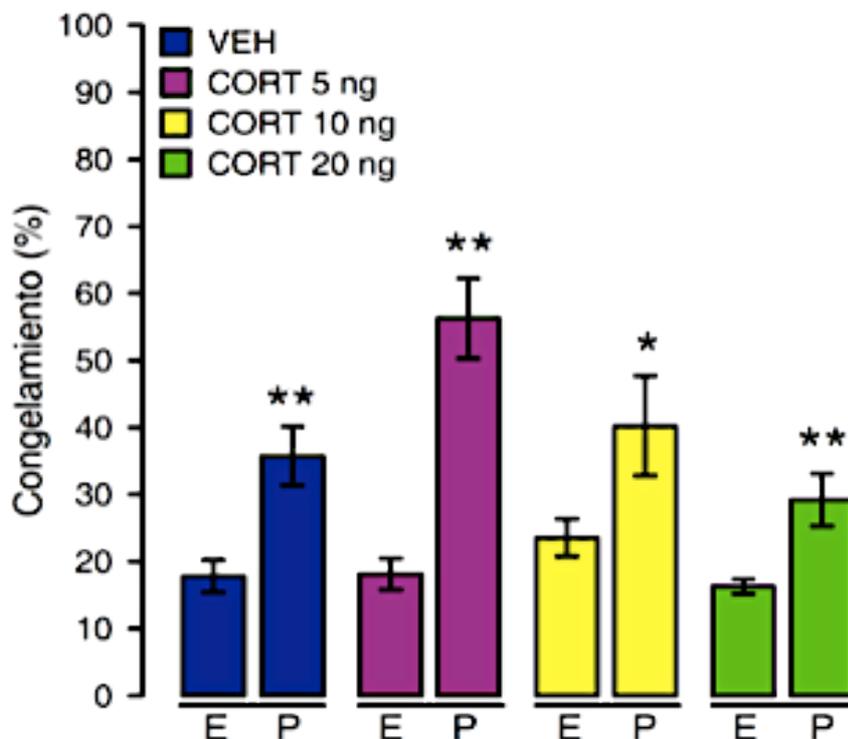


Figura 22. Efecto de la corticosterona administrada en el estriado dorsal durante la tarea de condicionamiento de miedo al tono sobre la consolidación de la memoria. Se muestra el porcentaje de congelamiento + EE del periodo en el que se presentó el tono durante la sesión de entrenamiento (E) y la sesión de prueba (P). Los asteriscos (* y **) representan diferencias significativas, con $p \leq 0.05$ respecto al grupo VEH.

Al comparar el porcentaje de congelamiento durante la LB y durante el periodo en el que se presentó el tono, se observaron resultados similares entre los grupos. El ANOVA realizado no mostró un efecto estadísticamente significativo debido al tratamiento ($F_{3,32} = 0.84$, $p = 0.49$) pero si debido al tiempo ($F_{5,169} = 30.30$, $p = 0.0001$), tampoco se encontró un efecto debido a la interacción tratamiento x tiempo ($F_{15,215} = 1.74$, $p = 0.17$). Sin embargo se observó un efecto estadísticamente significativo en el porcentaje de congelamiento en el periodo en el que se presentó el tono ($F_{5,160} = 16.74$, $p < 0.0001$). La interacción tratamiento x tono también reveló un efecto significativo sobre la respuesta de congelamiento ($F_{15,160} = 2.21$, $p < 0.007$).

En la sesión de prueba el porcentaje de congelamiento durante la LB también fueron similares entre los grupos (VEH= 21.57 %, CORT 5 ng= 20.44 %, CORT 10 ng= 12.88 % y CORT 20 ng= 13.44 %). Sin embargo, se observan resultados variables

RESULTADOS

entre los grupos en el porcentaje de congelamiento durante el periodo en el que se presentó el tono 1 (VEH= 32.76 %, CORT 5 ng= 27.38 %, CORT 10 ng= 35.28 % y CORT 20 ng= 27.23 %, el tono 2 (VEH= 41.01 %, CORT 5 ng= 55.16 %, CORT 10 ng= 45.13 % y CORT 20 ng= 33.58 %, el tono 3 (VEH= 28.33 %, CORT 5 ng= 71.58 %, CORT 10 ng= 12.88 % y CORT 20 ng= 26.09 %), el tono 4 (VEH= 40.54 %, CORT 5 ng= 65.04 %, CORT 10 ng= 29.18 % y CORT 20 ng= 30.51 %) y e tono 5 (VEH= 36.09 %, CORT 5 ng= 56.64 %, CORT 10 ng= 37.08 % y CORT 20 ng= 28.54 %). El análisis estadístico reveló diferencias significativas debidas al tratamiento ($F_{3,32}= 4.55$, $p < 0.009$), a lo largo de la presentación del tono ($F_{5,160}= 13.39$, $p < 0.0001$) y debidas a la interacción tratamiento x tono ($F_{15,215}= 2.66$, $p = 0.001$).

La prueba post hoc reveló diferencias significativas durante el periodo en el que se presentó el tono 3 del grupo CORT 5 ng ($t = 4.46$, $p > 0.001$) con respecto al grupo VEH (Figura 23).

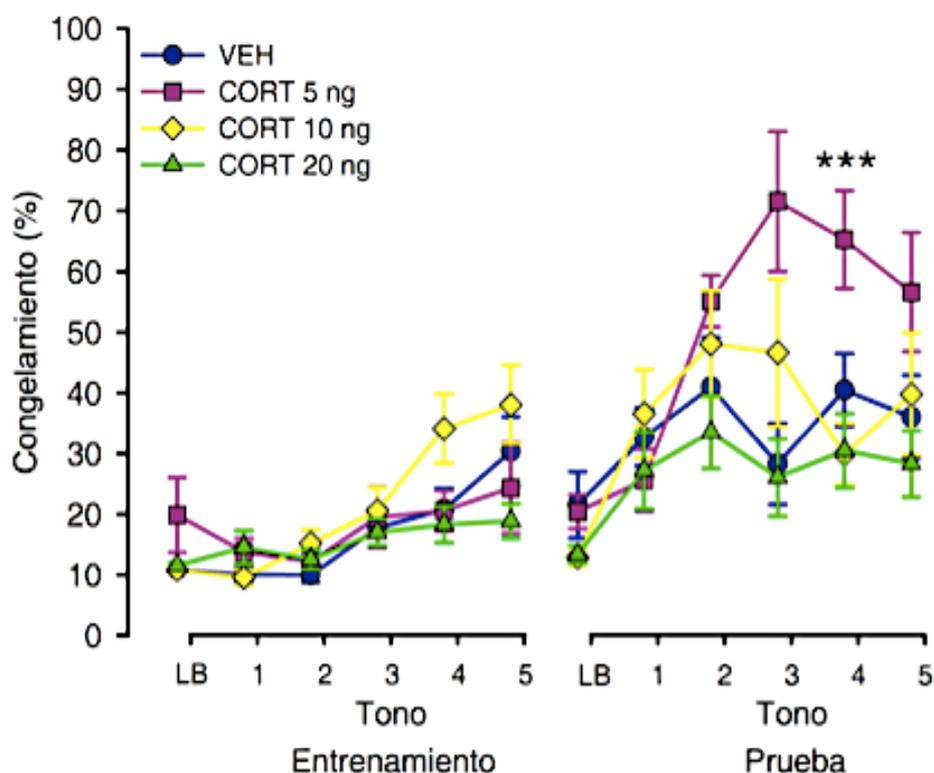


Figura 23. Efecto de la corticosterona administrada en el estriado dorsal a lo largo del tiempo durante la tarea de condicionamiento de miedo al tono. Se muestra el porcentaje de congelamiento + EE por minuto de la sesión de entrenamiento y de prueba. Los asteriscos (** y ***) indican diferencias significativas con $p < 0.05$, $p < 0.01$.

RESULTADOS

El análisis del periodo previo a la presentación del tono durante la sesión de prueba, muestra porcentajes de congelamiento similares entre los grupos (VEH= 21.57 %, CORT 5 ng= 20.44 %, CORT 10 ng= 12.88 %, CORT 20 ng= 13.44 %). El ANOVA no reveló diferencias significativas entre ellos ($F_{3,4} = 2.01$, $p = 0.13$).

El periodo en el que presentó el tono durante la misma sesión mostró un mayor porcentaje de congelamiento en el grupo CORT 5 ng en contraste con el resto de los grupos. El análisis estadístico mostró un efecto significativo debido al tratamiento ($F_{3,32} = 7.16$, $p = 0.005$). La prueba post hoc mostro diferencias estadísticamente significativas entre el grupo VEH y el grupo CORT 5 ng ($t = 3.31$, $p < 0.05$), (Figura 24).

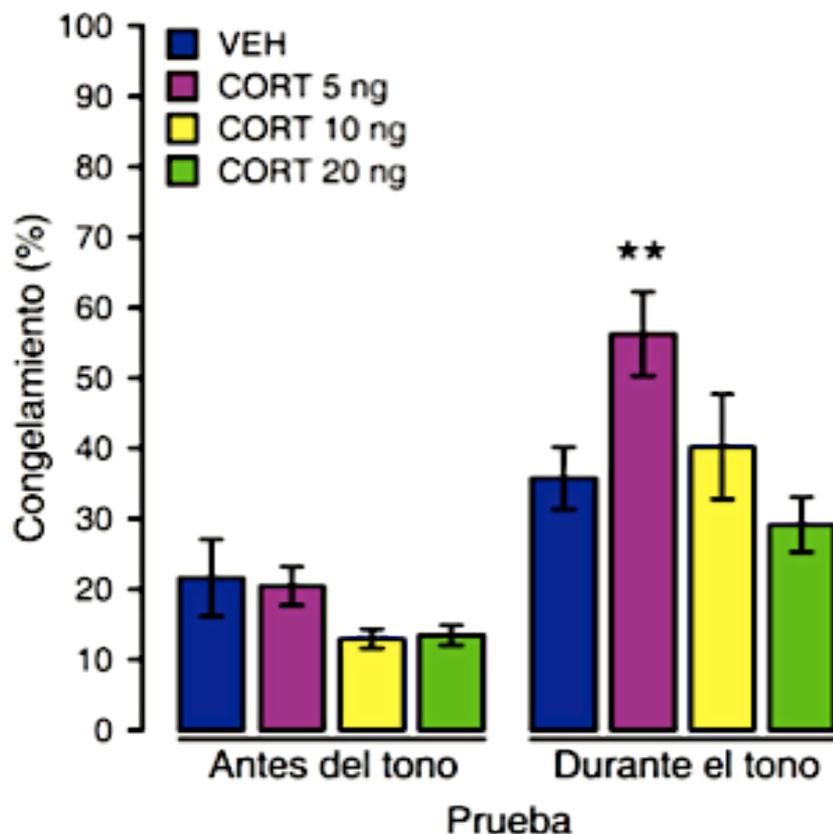


Figura 24. Efecto de la corticosterona administrada en el estriado dorsal sobre la consolidación de la memoria de la tarea de condicionamiento de miedo al tono. Se muestra porcentaje de congelamiento + EE del período de la línea base y del periodo en I que estuvo presente el tono durante la sesión de prueba. Los asterisco (**) indican diferencias significativas, $p < 0.05$.

7.4. Experimento III: Efecto de la activación de los receptores a glucocorticoides en el hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria de CMT

Para evaluar el efecto de la activación de los receptores a glucocorticoides en el hipocampo, se utilizaron grupos independientes a los que se les administró

RESULTADOS

corticosterona inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de CMT. El porcentaje de congelamiento del grupo VEH durante la sesión de entrenamiento fue de 17.52 %, mientras que durante la sesión de prueba fue de 44.93 %. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($t= 6.10$ y $p= 0.01$) entre las sesiones. En el grupo CORT 5 ng también se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de congelamiento del entrenamiento (21.34 %) y el de la sesión de prueba (50.72 %) ($t= 6.11$ y $p= 0.01$). En el grupo CORT 10 ng se observó un porcentaje de congelamiento de 18.01 % durante el entrenamiento y de 41.09 % durante la prueba. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre las sesiones ($t= 6.02$ y $p= 0.001$). Por su parte, el porcentaje de congelamiento del grupo CORT 20 ng durante el entrenamiento fue de 18.03 %, mientras que durante la prueba fue de 46.58 %. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre las sesiones ($t= 12.59$ y $p= 0.0001$) (Figura 25).

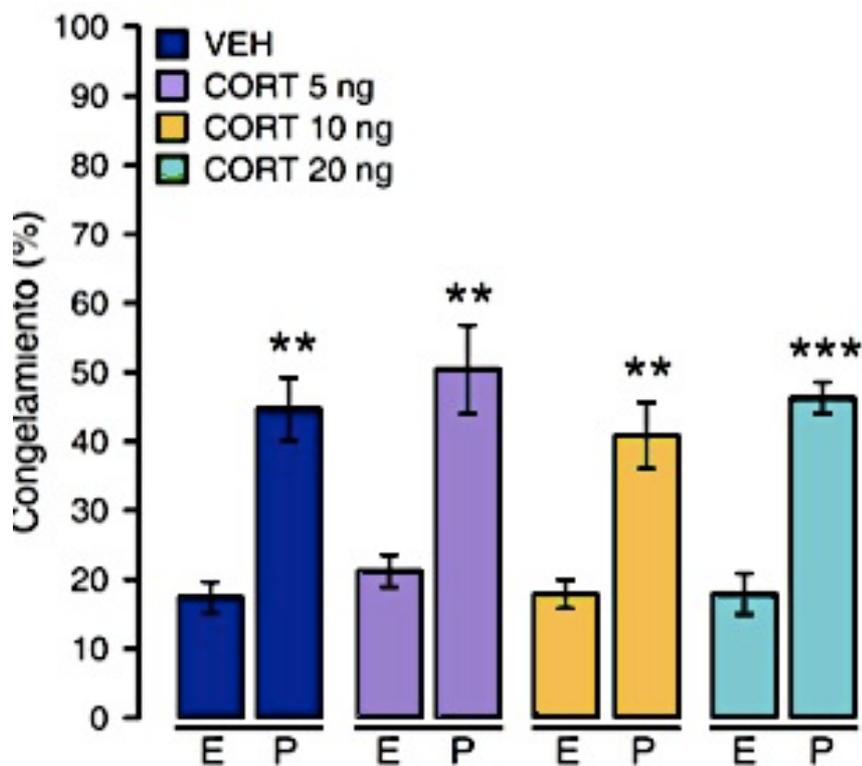


Figura 25. Efecto la corticosterona administrada en el hipocampo durante la tarea de condicionamiento de miedo al tono. Se muestra el porcentaje de congelamiento + EE del periodo en el que se presentaron el tono en la sesión de entrenamiento (E) y en la sesión de prueba (P). Los asteriscos (** y ***) indican diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.001$ y 0.0001 .

RESULTADOS

Los resultados mostraron un incremento significativo en el porcentaje de congelamiento durante la sesión de prueba con respecto a la sesión de entrenamiento, lo que indica que todos los grupos aprendieron la tarea.

Al comparar los porcentajes de congelamiento a lo largo de la sesión de entrenamiento, se observan resultados similares entre los grupos durante la LB y durante el periodo en el que se presentó el tono. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre los grupos debidas al tratamiento ($F_{3,31} = 0.56$, $p = 0.63$) pero si se observaron diferencias significativas entre el periodo en el que se presentó el tono ($F_{5,155} = 9.71$, $p < 0.0001$). Tampoco se encontraron diferencias debidas a la interacción tratamiento x tono ($F_{5,215} = 0.84$, $p = 0.62$).

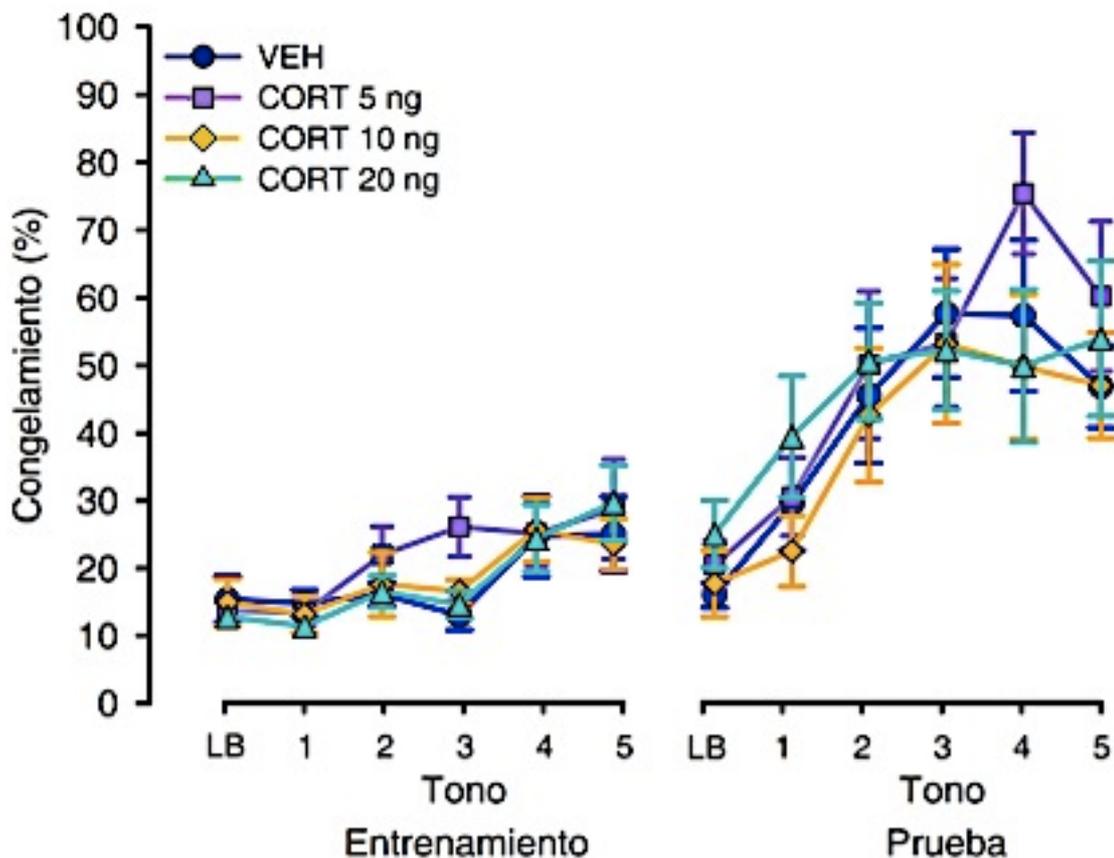


Figura 26. Efecto de la corticosterona en el hipocampo dorsal a lo largo del tiempo durante la tarea de condicionamiento de miedo al tono. Se muestra el porcentaje de congelamiento + EE por minuto de la sesión de entrenamiento y de prueba.

El análisis estadístico tampoco reveló diferencias significativas entre los grupos durante la sesión de prueba debidas al tratamiento ($F_{3,31} = 0.56$, $p = 0.64$), sin embargo si se encontraron diferencias en el porcentaje de congelamiento producido

RESULTADOS

entre cada tono (sesión de prueba tampoco debidas al tratamiento ($F_{3,155} = 18.79$, $p < 0.0001$). La interacción entre ellos no ocasionó un efecto significativo ($F_{15,155} = 0.48$, $p < 0.70$) (Figura 26).

Al comparar el porcentaje de congelamiento del periodo previo a la presentación del tono, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos ($F = 0.92$, $P = 0.44$). Esto indica que el tratamiento no afectó la respuesta motora de los sujetos. El análisis del periodo en el que se presentó el tono durante la prueba tampoco mostro diferencias significativas entre los grupos ($F = 2.65$, $p = 0.09$) (Figura 27).

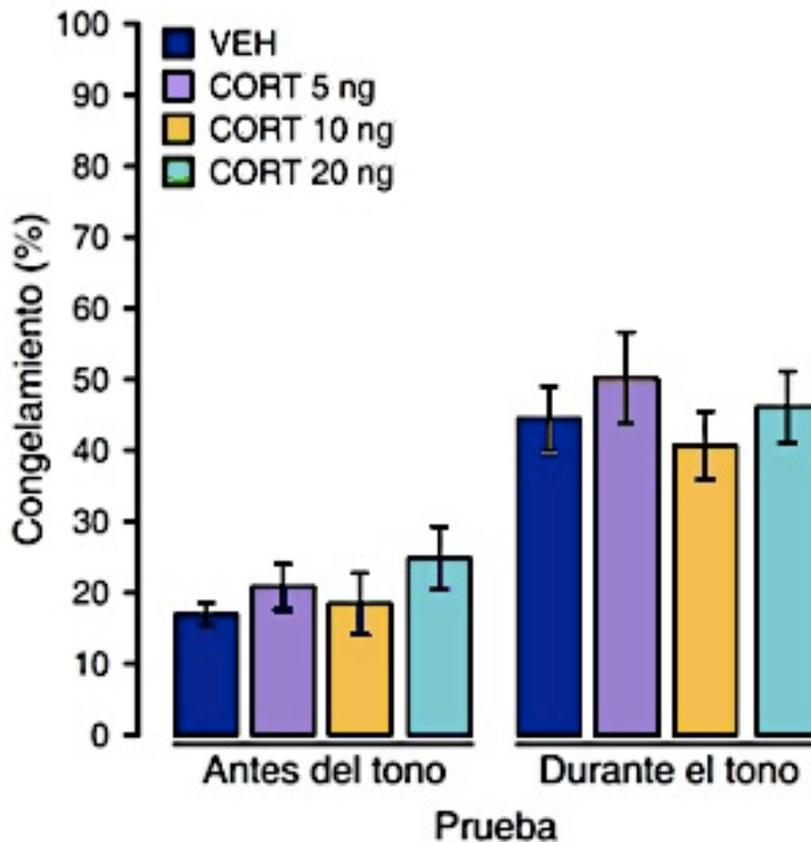


Figura 27. Efecto de la administración de corticosterona en el hipocampo sobre la consolidación de la memoria de la tarea de condicionamiento de miedo al tono. Muestra el porcentaje de congelamiento (%) + EE durante el periodo de la línea base y durante la presentación del tono de la sesión de prueba.

7.5. Experimento IV: Efecto de la administración del antagonista RU 486 en el estriado dorsal sobre la consolidación de la memoria de la tarea de CMT

El RU 486 es un antagonista específico de los receptores tipo II a glucocorticoides. Por tal razón se utilizó para evaluar la participación de estos receptores en la consolidación de la memoria de la tarea de CMT.

Los resultados de la respuesta de congelamiento durante la presentación del tono mostró en el grupo VEH-VEH un porcentaje de congelamiento de 19.52 % durante el entrenamiento y de 40.05 % durante la prueba. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre las sesiones de este grupo ($t= 6.21$ y $p= 0.001$). El análisis estadístico del porcentaje de congelamiento del grupo RU 486-VEH mostró diferencias significativas entre el porcentaje de congelamiento de la sesión de entrenamiento (21.03 %) y el de la sesión prueba (38.09 %) ($t= 5.47$ y $p= 0.002$). El grupo VEH-CORT 5 ng mostró un porcentaje de congelamiento de 14.89 % durante el entrenamiento y de 58.20 % durante la prueba. El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre las sesiones ($t= 9.24$ y $p= 0.0004$).

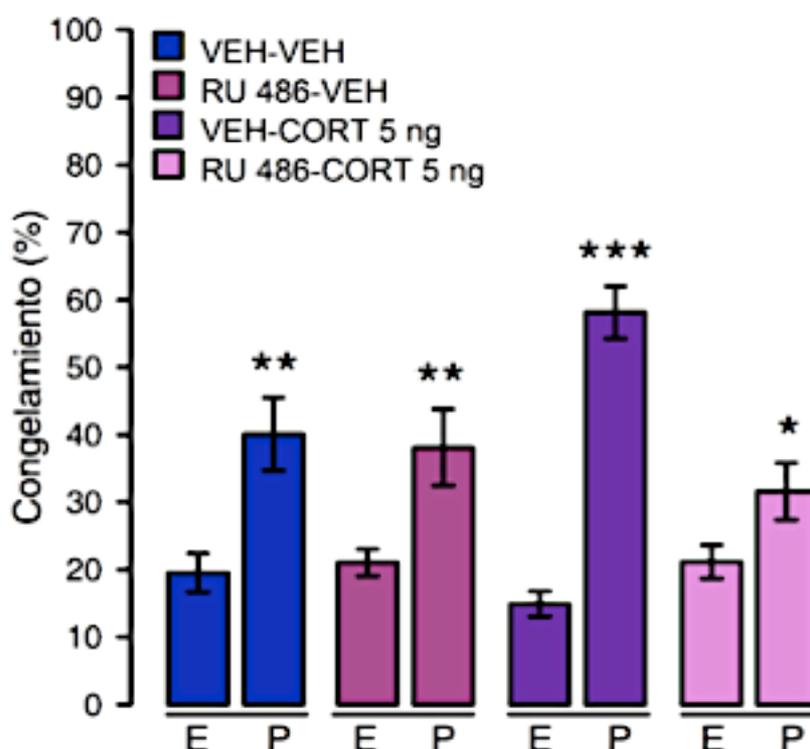


Figura 28. Efecto del antagonista RU 486 sobre la facilitación de la memoria de la tarea de condicionamiento de miedo al tono causada por la corticosterona. Se muestra el porcentaje de congelamiento + EE durante el periodo en el que se presentó el tono durante la sesión de entrenamiento (E) y la sesión de prueba (P). Los asteriscos (*, ** y ***) indican diferencias significativas con $p < 0.05$ con entre sesiones.

RESULTADOS

El análisis estadístico del grupo RU 486-CORT 5 ng también mostró diferencias significativas entre el porcentaje de congelamiento de la sesión de entrenamiento (21.14 %) y el de la prueba (31.56 %) ($t= 3.22$ y $p= 0.01$) (Figura 28).

Al comparar la respuesta de congelamiento a lo largo de la sesión de entrenamiento, se observaron porcentajes de congelamiento similares entre los grupos durante la línea base y durante el periodo en el que se presentó cada uno de los tonos. El ANOVA no mostró diferencias significativas entre los grupos debido al tratamiento ($F_{3,4}=1.32$, $p= 0.28$) pero si se observó un efecto debido al tiempo ($F_{5,165}= 13.75$, $p < 0.0001$). Además, no se encontró un efecto debido a la interacción tratamiento x tono ($F_{15,221}= 1.26$, $p < 0.21$). Estos resultados indican que la administración pre-entrenamiento del antagonista RU 486 no afectó la respuesta de congelamiento durante la sesión de entrenamiento.

El análisis de la respuesta de congelamiento a lo largo de la sesión de prueba mostró porcentajes similares entre los grupos durante la LB (VEH-VEH= 17.91 %, RU 486-VEH= 12.76 %, VEH=CORT 5 ng= 17.39 % y RU 486-CORT 5ng= 19.99 %) ($F_{3,4}= 0.24$, $p= 0.85$). Sin embargo, se observaron resultados variables entre los grupos cuando se comparó el porcentaje de congelamiento durante el periodo en el que se presentó el tono 1 (VEH-VEH= 27.95 %, RU 486-VEH= 28.17 %, VEH=CORT 5 ng= 38.91 % y RU 486-CORT 5ng= 23.44 %), el tono 2 (VEH-VEH= 40.39 %, RU 486-VEH= 38.91 %, VEH=CORT 5 ng= 54.39 % y RU 486-CORT 5ng= 24.4 %), el tono 3 (VEH-VEH= 41.97 %, RU 486-VEH= 33.29 %, VEH=CORT 5 ng= 68.54 % y RU 486-CORT 5ng= 40.24 %), el tono 4 (VEH-VEH= 48.46 %, RU 486-VEH= 45.90 %, VEH=CORT 5 ng= 63.45 % y RU 486-CORT 5ng= 39.82 %) y el tono 5 (VEH-VEH= 41.01 %, RU 486-VEH= 44.17 %, VEH=CORT 5 ng= 65.70 % y RU 486-CORT 5ng= 29.88 %).

El ANOVA mostró diferencias significativas debidas al tratamiento ($F_{3,33}= 5.15$, $p= 0.004$), al periodo en el que se presentó el tono ($F_{5,165}= 20.15$, $p < 0.0001$) y pero no debidas a la interacción tratamiento x tono ($F_{15,165}= 1.53$, $p= 0.09$).

El análisis post hoc mostró diferencias significativa durante el periodo en en que se presentó en tono 3 del grupo VEH-CORT 5 ng con respecto al grupo VEH-VEH ($t= 2.84$, $p < 0.05$)

RESULTADOS

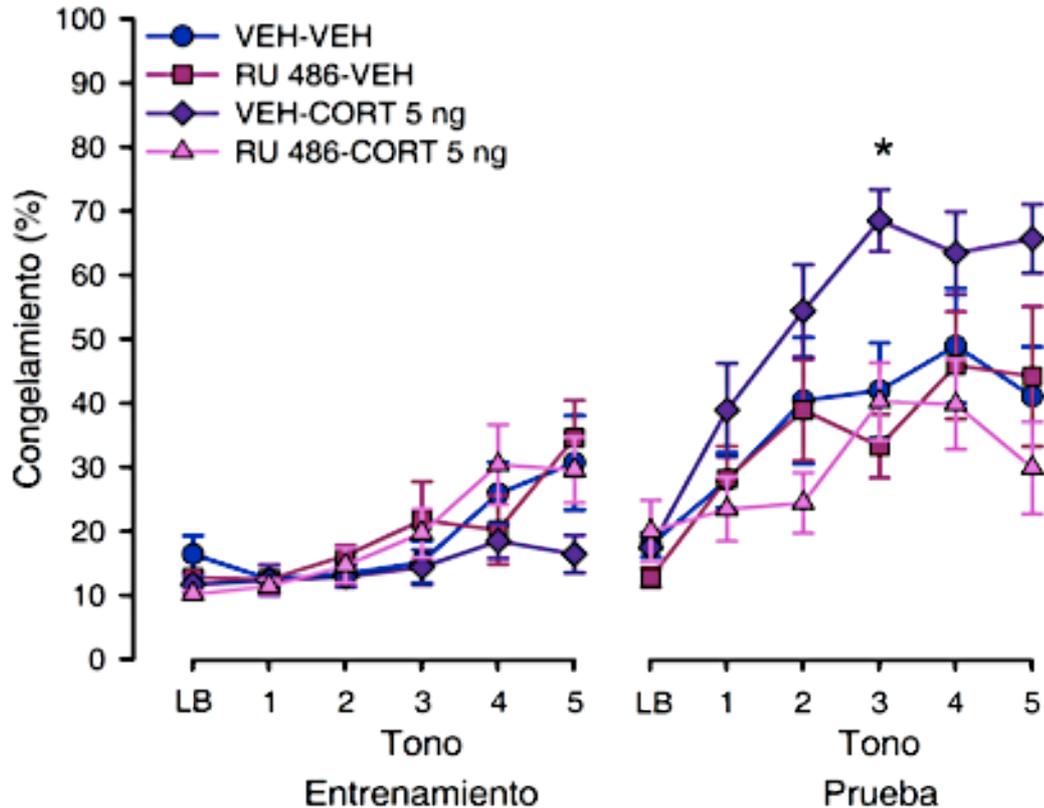


Figura 29. Efecto del antagonista RU 486 sobre la facilitación de la memoria de la tarea de condicionamiento de miedo al tono causada por la corticosterona. Se muestra el porcentaje de congelamiento + EE a lo largo de la sesión de entrenamiento y de la sesión de prueba de cada uno de los grupos. El asterisco (*) indica diferencias significativas con $p < 0.05$ con respecto al grupo VEH-VEH.

Al realizar el análisis de los datos de la sesión de prueba durante el periodo previo a la presentación del tono, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($F_{3,33} = 1.00$, $p = 0.40$). Esto indica que las condiciones del entrenamiento no afectaron la respuesta motora durante la sesión de prueba. Los resultados de la sesión de prueba correspondientes al periodo donde estuvo presente el tono mostraron que el grupo VEH-CORT 5 ng presentó un incremento en el porcentaje de congelamiento (58.20%) en contraste con el resto de los grupos (VEH-VEH= 40.05 %, RU 486-VEH= 38.09 % y RU 486-CORT 5 ng= 31.56%) cuyos resultados fueron similares. El análisis estadístico mostró un efecto significativo causado por el tratamiento ($F_{3,33} = 9.04$, $p = 0.0001$) en este periodo.

La prueba post hoc demostró diferencias significativas en el grupo VEH-CORT 5 ng con respecto al grupo VEH-VEH ($t = 5.54$, $p < 0.05$) Esto sugiere que el efecto facilitador de la memoria causado por la concentración de 5 ng de corticosterona se

RESULTADOS

mantiene aun cuando se administró solución vehículo antes del entrenamiento. Con respecto al grupo RU 486-CORT 5 ng, se sugiere que la administración previa del antagonista bloqueó este efecto (Figura 30).

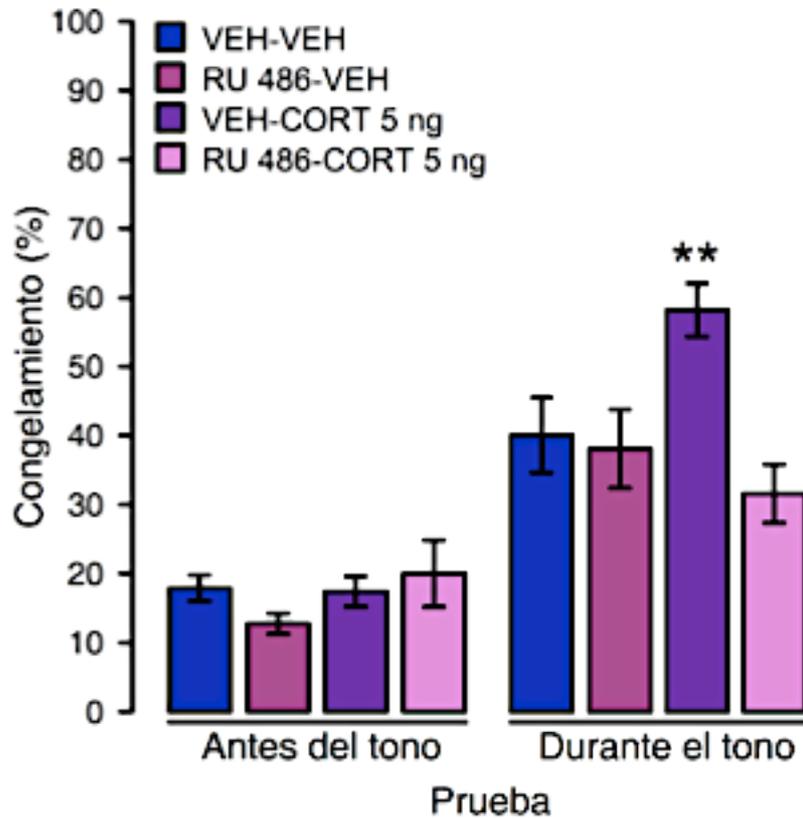


Figura 30. Efecto del antagonista RU 486 sobre la consolidación de la memoria de la tarea de condicionamiento de miedo al tono. Se muestra el porcentaje de congelamiento (%) + EE del periodo de la línea base y del periodo donde se presentó el tono. Los asteriscos (**) indica diferencias significativas, $p < 0.001$ con respecto al grupo VEH-VEH.

8. DISCUSIÓN

El condicionamiento de miedo al tono es un protocolo ampliamente utilizado para estudiar los procesos de aprendizaje y de memoria. La formación de la memoria de miedo condicionado está determinada por la relación que se establece entre los estímulos, así como también por las características de los mismos. En este trabajo se utilizó un protocolo de condicionamiento usó un intervalo de tiempo de 3 s entre el tono y el choque. Se sabe que esta modalidad de condicionamiento produce un aprendizaje lábil en contraste con el aprendizaje que produce la modalidad en la que los estímulos se presentan de manera conjunta.

Por otro lado, se sabe que la intensidad de los estímulos que se asocia contribuye a la formación de una memoria más o menos estable. Nuestros resultados mostraron que la intensidad del tono no afecta la adquisición ni la expresión de la respuesta condicionada. Sin embargo, la intensidad de choque si produjo un cambio en la magnitud de la expresión la respuesta de congelamiento, y aunque no fue evidente la disminución de la respuesta al administrar un choque de 0.8 mA en contraste con los resultados 1.0 mA, si se observó una disminución significativa en la respuesta cuando se utilizó la intensidad de choque de 0.7 mA. Aunque estos resultados sugiere que la formación estable de la memoria de miedo condicionado esta relacionada con la intensidad del choque, es indispensable la asociación entre estímulos ya que no se observó aprendizaje cuando sólo se presenta un el tono. Rosen (2004) demostró que el EC es esencial para la formación de asociación de los estímulos y durante la emisión de la respuesta aprendida. Kim, Rivers, Bevins, y Ayres (1996) por su parte, concluyeron que es la naturaleza del estímulo condicionado quien realmente determina la magnitud de la expresión de la respuesta condicionada. Sin embargo, Marchand y colaboradores (2007) no observaron diferencias en la respuesta de congelamiento cuando se utilizó un tono o un contexto.

La estabilidad de la memoria, muestra además una correlación positiva con la intensidad del estímulo incondicionado. Memorias producidas por un choque de baja intensidad (0.3 mA) son susceptibles a interrupciones, mientras que aquellas que son

DISCUSIÓN

establecidas por un choque de alta intensidad (1.0 mA) son resistentes (Kishioka et al., 2013).

La consolidación de la memoria del CMT es una tarea independiente de hipocampo, y aunque existen algunas discrepancias sobre su posible participación en la formación de la memoria, diversos hallazgos apunta a que su intervención es mediada por la magnitud del intervalo inter-estímulo. Se ha observado que lesiones en el hipocampo dorsal afectan la formación de esta memoria cuando se utilizan intervalos inter-estímulo de 20 o 30 segundos (Quinn et al, 2002; Chowdhury et al., 2005). Esto permite sugerir que el uso de diferentes protocolos generara estos resultados. Estudios en humanos donde se registraron los potenciales relacionados a eventos revelaron que durante una tarea de CMT, el hipocampo muestra poca actividad.

Por otra otro lado, el estriado es una estructura que se ha relacionado con la formación de la memoria de CMT. Aunque principalmente se ha estudiado su participación en el aprendizaje asociativo de recompensa, se ha demostrado que lesiones en esta región interfieren con la expresión de la memoria de CMT.

Durante el condicionamiento de miedo se activa el eje HHA culminando en la liberación de glucocorticoides (Pietersen et al., 2005) y se ha observa una correlación entre la intensidad del choque y la liberación de glucocorticoides. Kaouane et al., 2012, observaron un incremento en la concentración plasmática de corticosterona cuando se utiliza un choque de 0.8 mA pero no cuando se usa un choque de 0.4 mA. Con base a estos antecedente se utilizó la asociación tono-choque de 90 dB-0.7 mA para evaluar el efecto de la administración de corticosterona en el estriado y en el hipocampo sobre la consolidación de la memoria de CMT, se requirió de conocer los parámetros que permitieran la adquisición de la tarea de CMT, ya que nuestros resultados mostraron que la tarea se aprendió pero la magnitud de la respuesta fue menor en contraste con aquella producida por el choque de 1.0 mA.

La concentración de glucocorticoides en el cerebro coincide con la concentración plasmática durante las variaciones circadianas o durante situaciones de estrés y no sobrepasa valores mayores de 10^{-6} M. Existen antecedentes en donde se reporta

DISCUSIÓN

que la administración sistémica o intracerebral de corticosterona ejerce un efecto sobre la consolidación de la memoria. Estos efectos ocurren cuando las concentraciones de corticosterona sobrepasan los niveles basales. Nuestros resultados mostraron que la administración de corticosterona modula la consolidación de la memoria de CMT. Es ampliamente conocido el efecto dosis-dependiente de los glucocorticoides sobre la consolidación de la memoria. Ejercen un patrón de actividad en forma de U-invertida que puede facilitar o inhibir la consolidación de la información. Hui et al. (2004) observaron un efecto facilitador en la consolidación de la memoria cuando se administraron vía sistémica inmediatamente después de la adquisición de la información 3 mg/kg de corticosterona pero cuando hubo efecto cuando se administró 1 mg/Kg.

Los resultados de nuestro estudio mostraron un efecto facilitador en la consolidación de memoria de CMT cuando se administraron 5 ng de corticosterona en el estriado. Estos datos apoyan lo propuesto por nuestro grupo (Quirarte et al., 2009) en donde se encontró que al administrar la misma dosis de corticosterona en el estriado, se facilitó la consolidación de la memoria de la tarea del laberinto acuático de Morris en la versión de procedimiento. La administración de 10 y 20 ng de corticosterona no causaron efectos significativos sobre la memoria, sin embargo se observa una tendencia a disminuir la expresión de la respuesta condicionada.

Por su parte, la administración de corticosterona en el hipocampo dorsal no causó ningún efecto en la expresión de la respuesta condicionada independientemente de la dosis administrada, aunque esta estructura posee una mayor densidad de receptores a glucocorticoides en contraste con el estriado. Esto coincide con los resultados de estudios previos que indican que el hipocampo no participa en la formación de la memoria de la tarea de CMT cuando los intervalos inter-estímulo son menores a 10 s.

Aunque la corticosterona no causó ningún efecto sobre la memoria cuando se administró en el hipocampo, en general se observaron mayores porcentajes de congelamiento en todos los grupos, en comparación con los resultados obtenidos cuando se administró en el estriado. En el estudio de Anastagoras (1999) se observó que la respuesta de congelamiento de un grupo de ratas a las que se les lesionó el hipocampo, fue menor en la tarea de miedo al tono en contraste con los valores

DISCUSIÓN

observados en la tarea de condicionamiento de miedo al contexto. Sin embargo, debido a que se sugiere que las lesiones del hipocampo contribuyen a la hiperactividad o inhibición del congelamiento, se evaluó la respuesta de congelamiento en un mismo grupo de ratas intactas y se observó mayor respuesta de congelamiento en la tarea de condicionamiento de miedo al contexto que en la del tono.

Por otra parte, datos de nuestro laboratorio mostraron un efecto dosis-dependiente sobre la consolidación de la memoria cuando se administra en el hipocampo dorsal en la tarea de condicionamiento de miedo al contexto.

Se ha propuesto que el hipocampo está implicado en la representación de un contexto utilizando una estrategia integral más que la asociación de dos estímulos mediante una estrategia elemental. La estrategia integral consiste en la relación de todos los elementos estáticos con elementos de menor contingencia y posteriormente su asociación. El procesamiento de un tono o un choque es simple debido a su naturaleza unimodal, mientras que el procesamiento de un contexto es multimodal, por lo que su procesamiento requiere de un sistema de mayor complejidad (Anastagoras, Gale, & Fanselow, 2001). Beylin y colaboradores (2001) sugieren que la participación del hipocampo en la formación de la memoria está regula por continuidad entre los estímulos, pero también por la complejidad de la tarea.

La administración de glucocorticoides en alguna región del cerebro afecta la tasa de disparo neuronal. Existe una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de glucocorticoides disponibles y la potenciación a largo plazo. Los niveles moderados de corticosterona se han asociado con la inducción efectiva de la potenciación de largo plazo, mientras que los niveles altos están asociados a la depresión a largo plazo.

Cambios que ocurren en la conectividad sináptica y que subyacen a procesos como el aprendizaje y la memoria, son regulados positivamente por los glucocorticoides incrementando la eficiencia sináptica durante una tarea y por lo tanto facilitan el almacenamiento de información (Krugers et al., 2011).

DISCUSIÓN

Por otra parte, también se sabe que los efectos de los glucocorticoides pueden deberse a cambios transcripcionales debido a la activación de sus receptores citoplasmáticos o a cambios independientes de la transcripción, los cuales se han relacionado con la activación de los receptores a glucocorticoides localizados en la membrana.

En estructuras como el hipocampo, la administración crónica de glucocorticoides produce cambios en la excitabilidad de las células piramidales de CA1 y recientemente se ha mostrado que la administración aguda de glucocorticoides en rebanadas de hipocampo incrementa la potenciación de largo plazo en las entradas de las colaterales de Shaffer. Este efecto en el hipocampo brinda una explicación del posible mecanismo de acción de los glucocorticoides en algunos tipos de memoria. Estos hallazgos nos permiten interpretar los efectos facilitadores de la memoria de condicionamiento de miedo al tono observados en el estriado dorsal cuando se administraron 5 ng de corticosterona, sugiriendo que probablemente esta dosis incrementa la potenciación de largo plazo de las células de esta estructura.

La acción de los glucocorticoides sobre la memoria está mediada por la activación de sus receptores y aunque ambos están presentes en las estructuras cerebrales involucradas en el la memoria, existen evidencias de que los receptores tipo II son los que regulan este proceso.

La participación de estos receptores en la formación de la memoria ha sido evaluada en tareas conductuales tales como evitación inhibitoria (Medina et al. 2007; Sanchez-Resendis et al. 2012), la tarea de laberinto acuático de Morris (Quirarte et al., 2009) y en el condicionamiento de miedo al contexto (Cordero y Sandi, 1998) entre otras. Chen, Bambah-Mukku, Pollonini, y Alberini (2012) mostraron que la administración de RU 486 en el estriado bloquea la formación de la memoria de largo plazo de una tarea de evitación inhibitoria pero no afecta la memoria de corto plazo. Estos hallazgos indican que los receptores tipo II intervienen en la consolidación de la memoria y no en la adquisición de la información. Esto permite sugerir que el bloqueo de la facilitación de la memoria causada por la administración del antagonista RU 486 en el estriado encontrados en nuestros resultados, indica que los receptores tipo II participan en la consolidación de la memoria de la tarea de CMT. Sin embargo, la participación de estos receptores también puede ser regulada

DISCUSIÓN

por la intensidad de choque utilizada durante el entrenamiento. Cordero y Sandi (1998) encontraron un deterioro en la memoria de la tarea de condicionamiento de miedo al contexto causado por el antagonista RU 486 cuando la intensidad de choque durante el entrenamiento fue de 0.4 mA pero no cuando se utilizó la intensidad de 1.0 mA. Por lo que se propone que durante el aprendizaje drástico se requiere de cambios fisiológicos diversos que hacen que la memoria de este aprendizaje sea resistente a interferencias.

Y finalmente, aunque nuestros resultados mostraron un bloqueo de la facilitación de la memoria causada por la corticosterona, no se observó un deterioro total de la consolidación de la memoria. Estudios con lesiones en el estriado dorsal tampoco muestran un deterioro total de la memoria de CMT (Ferreira et al, 2003). Estos hallazgos apoyan la idea de que en el proceso de formación de la memoria intervienen diferentes sistemas en donde destaca una estructura central que interactúa con estructuras secundarias. Por tal razón, las manipulaciones experimentales del estriado no deterioraron por completo la formación de la memoria de la tarea de CMT.

Conductualmente se demostró que la corticosterona regula la consolidación de una memoria de CMT cuando se administra inmediatamente después del entrenamiento en el estriado dorsal pero no cuando se administra en el hipocampo dorsal y se corroboró además la idea del efecto dosis-dependiente de los glucocorticoides evaluada en diferentes paradigmas de memoria. Sin embargo, es importante buscar una integración con diferentes métodos y técnicas de investigación que permitan además dar una interpretación celular y molecular a nuestros hallazgos.

CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

- La administración de corticosterona tiene un efecto selectivo sobre la consolidación de la memoria del CMT dependiendo de la estructura administrada.
- Se demostró que la activación de los receptores a glucocorticoides del estriado dorsal regula la consolidación de la memoria de la tarea de CMT pero no la activación de los receptores a glucocorticoides del hipocampo dorsal.
- Además se corroboró el efecto dosis-dependiente de los glucocorticoides en el estriado sobre la consolidación de la memoria.

10. REFERENCIAS

- Abel, T., & Lattal, K. M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(2), 180-187.
- Aguado, L. (2003). Neuroscience of Pavlovian conditioning: a brief review. *The Spanish Journal of Psychology*, 6(2), 155-167.
- Alberini, C. M. (2005). Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends in Neurosciences*, 28(1), 51-56.
- Alberini, C. M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological Reviews*, 89(1), 121-145.
- Anagnostaras, S. G., Gale, G. D., & Fanselow, M. S. (2001). Hippocampus and contextual fear conditioning: Recent controversies and advances. *Hippocampus*, 11(1), 8-17.
- Anagnostaras, S. G., Maren, S., & Fanselow, M. S. (1999). Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *The Journal of Neuroscience*, 19(3), 1106-1114.
- Bangasser, D. A., Waxle, D. E., Santollo, J., & Shors, T. J. (2006). Trace conditioning and the hippocampus: the importance of contiguity. *The Journal of Neuroscience*, 26(34), 8702-8706.
- Bast, T., Zhang, W. N., & Feldon, J. (2003). Dorsal hippocampus and classical fear conditioning to tone and context in rats: effects of local NMDA-receptor blockade and stimulation. *Hippocampus*, 13(6), 657-675.
- Bolam, J. P., Hanley, J. J., Booth, P. A., & Bevan, M. D. (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of Anatomy*, 196 (Pt 4), 527-542.
- Beylin, A. V., Gandhi, C.C., Wood, G. E., Talk, A.C., Matzel, L.D., & Shors, T. J. (2001). The role of the hippocampus in trace conditioning: temporal discontinuity or task difficulty? *Neurobiology of Learning and Memory*, 76,447-461.
- Caeser, M., & Aertsen, A. (1991). Morphological organization of rat hippocampal slice cultures. *The Journal of Comparative Neurology*, 307(1), 87-106.
- Cahill, L., & McGaugh, J. L. (1998). Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends in Neurosciences*, 21(7), 294-299.
- Collins, J. W. (2007). The neuroscience of learning. *Journal of Neuroscience Nursing*, 39(5), 305-310.
- Cordero, M. I., & Sandi, C. (1998). A role for brain glucocorticoid receptors in contextual fear conditioning: Dependence upon training intensity. *Brain Research*, 786(1-2), 11-17.
- Chen, D. Y., Bambah-Mukku, D., Pollonini, G., & Alberini, C. M. (2012). Glucocorticoid receptors recruit the CaMKIIalpha-BDNF-CREB pathways to mediate memory consolidation. *Nature Neuroscience*, 15(12), 1707-1714.
- Chowdhury, N., Quinn, J. J., & Fanselow, M. S. (2005). Dorsal hippocampus involvement in trace fear conditioning with long but not short, trace intervals in mice. *Behavioral Neuroscience*, 119(5), 1396-1402.
- Desban, M., Kemel, M. L., Glowinski, J., & Gauchy, C. (1993). Spatial organization of patch and matrix compartments in the rat striatum. *Neuroscience*, 57(3), 661-671.

- Devan, B. D. (1997). *Functional organization of the dorsal striatum: comparison to the hippocampal system* (Tesis doctoral). McGill University Montreal, Montreal.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology*, *55*, 51-86.
- El Falougy, H., Kubikova, E., & Benuska, J. (2008). The microscopical structure of the hippocampus in the rat. *Bratislavske Lekarske Listy*, *109*(3), 106-110.
- Fansolow, M. S. (1980). Conditional and unconditional components of shock freezing. *Pavlovian Journal of Biological Science*, *15*, 177-182.
- Fanselow, M. S. & Gale, G. (2003). The amygdala, fear, and memory. *Annual New York Academy of Science*, *985*, 125-134.
- Featherstone, R. E., & McDonald, R. J. (2004). Dorsal striatum and stimulus-response learning: Lesions of the dorsolateral, but not dorsomedial, striatum impair acquisition of a stimulus-response-based instrumental discrimination task, while sparing conditioned place preference learning. *Neuroscience*, *124*(1), 23-31.
- Ferreira, T. L., Moreira, K. M., Ikeda, D. C., Bueno, O. F. A., Gabriela, M., & Oliveira, A. (2003). Effects of dorsal striatum lesions in tone fear conditioning and contextual fear conditioning. *Brain Research*, *987*(1), 17-24.
- Ferreira, T. L., Shammah-Lagnado, S. J., Bueno, O. F., Moreira, K. M., Fornari, R. V., & Oliveira, M. G. (2008). The indirect amygdala-dorsal striatum pathway mediates conditioned freezing: insights on emotional memory networks. *Neuroscience*, *153*(1), 84-94.
- Frankland, P. W., Cestari, V., Filipkowski, R. K., McDonald, R. J., & Silva, A. J. (1998). The dorsal hippocampus is essential for context discrimination but not for contextual conditioning. *Behavioral Neuroscience*, *112*(4), 863-874.
- Gerfen, C. R., & Bolam, J. P. (2010). The neuroanatomical organization of the basal ganglia. En H. Steiner & K. Y. Tseng (Eds.), *Handbook of the basal ganglia structure and function* (pp. 3-28). USA: Academic Press.
- Gupta, B. B. P., & Lalchandama, K. (2002). Molecular mechanisms of glucocorticoid action. *Current Science*, *83*(9), 1103-1111.
- Herbert, J., Goodyer, I. M., Grossman, A. B., Hastings, M. H., de Kloet, E. R., Lightman, S. L., Seckl, J. R. (2006). Do corticosteroids damage the brain? *Journal of Neuroendocrinology*, *18*(6), 393-411.
- Hui, G. K., Figueroa, I. R., Poytress, B. S., Roozendaal, B., McGaugh, J. L., & Weinberger, N. M. (2004). Memory enhancement of classical fear conditioning by post-training injections of corticosterone in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *81*(1), 67-74.
- ILAR. (1996). *Guide for the care and use of laboratory animals* Washington, DC: National Academy Press.
- Joels, M., & Krugers, H. J. (2007). LTP after stress: up or down? *Neural Plasticity*, *2007*, 93202.
- Kaouane, N., Porte, Y., Vallee, M., Brayda-Bruno, L., Mons, N., Calandreau, L., Desmedt, A. (2012). Glucocorticoids can induce PTSD-like memory impairments in mice. *Science*, *335*(6075), 1510-1513.
- Kawaguchi, Y. (1993). Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *The Journal of Neuroscience*, *13*(11), 4908-4923.

- Kim, J. J., & Fanselow, M. S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*, *256*(5057), 675-677.
- Kim, J. J., & Jung, M. W. (2006). Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *30*(2), 188-202.
- Kim, S. D., Rivers, S., Bevins, R. A., & Ayres, J. J. (1996). Conditioned stimulus determinants of conditioned response form in Pavlovian fear conditioning. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes*, *22*(1), 87-104.
- Kishioka, A., Fukushima, F., Ito, T., Kataoka, H., Mori, H., Ikeda, T., Mishina, M. (2009). A novel form of memory for auditory fear conditioning at a low-intensity unconditioned stimulus. *PLoS One*, *4*(1), e4157.
- Kishioka, A., Uemura, T., Fukushima, F., & Mishina, M. (2013). Consolidation of auditory fear memories formed by weak unconditioned stimuli requires NMDA receptor activation and de novo protein synthesis in the striatum. *Molecular Brain*, *6*, 17.
- Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2008). Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, *60*(4), 543-554.
- Krugers, H. J., Zhou, M., Joels, M., & Kindt, M. (2011). Regulation of excitatory synapses and fearful memories by stress hormones. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *5*, 62.
- Liljeholm, M., & O'Doherty, J. P. (2012). Contributions of the striatum to learning, motivation, and performance: an associative account. *Trends in Cognitive Sciences*, *16*(9), 467-475.
- Lisman, J. E. (1999). Relating hippocampal circuitry to function: recall of memory sequences by reciprocal dentate-CA3 interactions. *Neuron*, *22*(2), 233-242.
- Lynch, M. A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews*, *84*(1), 87-136.
- Makara, G., & Haller, J. (2001). Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system Evidence, mechanisms and implications. *Progress in Neurobiology*, *65*, 367-390.
- Marchand, A. R., Barbelivien, A., Seillier, A., Herbeaux, K., Sarrieau, A., & Majchrzak, M. (2007). Contribution of corticosterone to cued versus contextual fear in rats. *Behavioural Brain Research*, *183*(1), 101-110.
- Maren, S., & Fanselow, M. S. (1997). Electrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal hippocampus, or entorhinal cortex produce anterograde deficits in contextual fear conditioning in rats. *Neurobiology of learning and memory*, *67*(2), 142-149.
- McDonald, R. J., Devan, B. D., & Hong, N. S. (2004). Multiple memory systems: the power of interactions. *Neurobiology of Learning and Memory*, *82*(3), 333-346.
- Medina, A. C., Charles, J. R., Espinoza-González, V., Sánchez-Resendis, O., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B., & Quirarte, G. L. (2007). Glucocorticoid administration into the dorsal striatum facilitates memory consolidation of inhibitory avoidance training but not of the context or footshock components. *Learning & Memory* *14*(10), 673-677.
- Misane, I., Tovote, P., Meyer, M., Spiess, J., Ogren, S. O., & Stiedl, O. (2005). Time-dependent involvement of the dorsal hippocampus in trace fear conditioning in mice. *Hippocampus*, *15*, 418-426.

REFERENCIAS

- Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K., & Kawata, M. (1996). Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience Research*, *26*(3), 235-269.
- Ninomiya, J. G. (1991). *Fisiología humana: Neurofisiología*. México: Manual Moderno.
- Oitzl, M. S., Reichardt, H. M., Joëls, M., & de Kloet, E. R. (2001). Point mutation in the mouse glucocorticoid receptor preventing DNA binding impairs spatial memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(22), 12790-12795.
- Orsini, C. A., & Maren, S. (2012). Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *36*(7), 1773-1802.
- Packard, M. G., & Knowlton, B. J. (2002). Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, *25*, 563-593.
- Paré, D. (2003). Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Progress in Neurobiology*, *70*(5), 409-420.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (4th ed.) San Diego: Academic Press.
- Pennartz, C. M., Ito, R., Verschure, P. F., Battaglia, F. P., & Robbins, T. W. (2011). The hippocampal-striatal axis in learning, prediction and goal-directed behavior. *Trends in Neurosciences*, *34*(10), 548-559.
- Piazza, P. V., & Le Moal, M. (1997). Glucocorticoids as a biological substrate of reward: physiological and pathophysiological implications. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *25*(3), 359-372.
- Pietersen, C. Y., Bosker, F. J., Postema, F., & den Boer, J. A. (2006). Fear conditioning and shock intensity: the choice between minimizing the stress induced and reducing the number of animals used. *Laboratory Animals*, *40*(2), 180-185.
- Plenz, D., & Wickens, J. R. (2010). The striatal skeleton: medium spiny projection neurons and their lateral connections. En H. Steiner & K. Y. Tseng (Eds.), *Handbook of the basal ganglia structure and function* (pp. 99-112). USA: Academic Press.
- Quirarte, G. L., de la Teja, I. S., Casillas, M., Serafín, N., Prado-Alcalá, R. A., & Roozendaal, B. (2009). Corticosterone infused into the dorsal striatum selectively enhances memory consolidation of cued water-maze training. *Learning & Memory* *16*(10), 586-589.
- Reiner, A., & Anderson, K. D. (1990). The patterns of neurotransmitter and neuropeptide co-occurrence among striatal projection neurons: Conclusions based on recent findings. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *15*(3), 251-265.
- Roozendaal, B. (2000). 1999 Curt P Richter award Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*, *25*(3), 213-238.
- Rosen, J. B. (2004). The neurobiology of conditioned and unconditioned fear: a neurobehavioral system analysis of the amygdala. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews*, *3*(1), 23-41.

- Sanders, M. J., Wiltgen, B. J. & Fanselow, M. S. (2003). The place of the hippocampus in fear conditioning. *European Journal of Pharmacology*, 463, 217-223.
- Sanchez-Resendis, O., Medina, A. C., Serafin, N., Prado-Alcala, R. A., Roozendaal, B., & Quirarte, G. L. (2012). Glucocorticoid-cholinergic interactions in the dorsal striatum in memory consolidation of inhibitory avoidance training. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 33.
- Sandi, C. (2011). Glucocorticoids act on glutamatergic pathways to affect memory processes. *Trends in Neurosciences*, 34(4), 165-176.
- Schafe, G. E., Nader, K., Blair, H. T., & LeDoux, J. E. (2001). Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: A cellular and molecular perspective. *Trends in Neurosciences*, 24(9), 540-546.
- Schenberg, E. E., & Oliveira, M. G. (2008). Effects of pre or posttraining dorsal hippocampus D-AP5 injection on fear conditioning to tone, background, and foreground context. *Hippocampus*, 18(11), 1089-1093.
- Seckl, J. R. (1997). 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? *Frontiers in Neuroendocrinology*, 18(1), 49-99.
- Silva, A. J. (2003). Molecular and cellular cognitive studies of the role of synaptic plasticity in memory. *Journal of Neurobiology*, 54(1), 224-237.
- Staimer, T. (2002). The biology of fear and anxiety-related behaviors. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 4(3), 231-249.
- Takahashi, Y., Schoenbaum, G., & Niv, Y. (2008). Silencing the critics: understanding the effects of cocaine sensitization on dorsolateral and ventral striatum in the context of an actor/critic model. *Frontiers in Neuroscience*, 2(1), 86-99.
- Tasker, J. G., Di, S., & Malcher-Lopes, R. (2006). Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology*, 147(12), 5549-5556.
- Taves, M. D., Ma, C., Heimovics, S. A., Saldanha, C. J., & Soma, K. K. (2011). Measurement of steroid concentrations in brain tissue: methodological considerations. *Frontiers in Endocrinology*, 2, 39.
- Taylor, V. A., Ellenbogen, M. A., Washburn, D., & Jooper, R. (2011). The effects of glucocorticoids on the inhibition of emotional information: A dose-response study. *Biological Psychology*, 86(1), 17-25.
- Tronel, S., & Sara, S. J. (2003). Blockade of NMDA receptors in prefrontal cortex induces an enduring amnesia for odor-reward associative learning. *The Journal of Neuroscience*, 23(13), 5472-5476.
- Tsien, J. Z., Huerta, P. T., & Tonegawa, S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*, 87(7), 1327-1338.
- Walker, D. L., & Davis, M. (2002). The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 71(3), 379-392.
- White, N. M., & McDonald, R. J. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 77(2), 125-184.
- Yin H.H., Knowlton B.J., Balleine B.W. (2004). Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. *European Journal of Neuroscience*, 19, 181-189.

REFERENCIAS

- Zorawski, M., & Killcross, S. (2002). Posttraining glucocorticoid receptor agonist enhances memory in appetitive and aversive Pavlovian discrete-cue conditioning paradigms. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(2), 458-464.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ETAPAS DE LA MEMORIA DE ACUERDO A SU CLASIFICACIÓN TEMPORAL.)	11
FIGURA 2. ETAPAS DEL CONDICIONAMIENTO DE MIEDO..	12
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL ESTRIADO.	15
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL HIPOCAMPO.	18
FIGURA 5. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL EJE HIPOTALÁMICO-HIPOFISIARIO ADRENAL.	22
FIGURA 6. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES A GLUCOCORTICOIDES TIPO II EN EL ESTRIADO Y EN EL HIPOCAMPO.	25
FIGURA 7. ESQUEMA DEL PROCESO DE ACTIVACIÓN DE RECEPTORES A GLUCOCORTICOIDES TIPO II	26
FIGURA 8. LÍNEA DEL TIEMPO QUE MUESTRA EL PROCESO Y DESARROLLO DE LOS EXPERIMENTOS DURANTE EL CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL TONO.	32
FIGURA 9. FOTOGRAFÍA DE LA CÁMARA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL TONO.	33
FIGURA 10. ESQUEMA DEL PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO.	34
FIGURA 11. ESQUEMA DE LA SECUENCIA DE ENSAYOS Y LA CÁMARA DONDE SE REALIZÓ EL ENTRENAMIENTO Y LA PRUEBA.	35
FIGURA 12. FOTOGRAFÍA DE UN CORTE CORONAL DE CEREBRO DE RATA TEÑIDO MEDIANTE LA TÉCNICA DE VIOLETA DE CRESILO DONDE SE OBSERVA LA LOCALIZACIÓN DE CANULAS BILATERLES EN EL ESTRIADO DORSAL	40
FIGURA 13. ESQUEMAS DE CORTES CORONALES DONDE SE MUESTRA LA LOCALIZACION DE LAS PUNTAS DE LOS INYECTORES EN EL ESTRIADO DORSAL.	41
FIGURA 14. FOTOGRAFÍAS DE UN CORTE CORONAL DE CEREBRO DE RATA TEÑIDO MEDIANTE LA TÉCNICA DE VIOLETA DE CRESILO DONDE SE OBSERVA LA LOCALIZACIÓN DE CÁNULAS BILAERALES EN EL HIPOCAMPO DORSAL.	41
FIGURA 15. ESQUEMAS DE CORTES CORONALES DONDE SE MUESTRA LA LOLCALIZACIÓN DE LAS PUNTAS DE LAS CANULAS EN EL HIPOCAMPO DORSAL	42
FIGURA 16. EFECTO DE LA INTENSIDAD DEL TONO SOBRE LA RESPUESTA DE CONGELAMINETO DURANTE LA SESIÓN DE ENTRENAMIENTO Y DE PRUEBA EN LA TAREA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL TONO.	44

FIGURA 17. EFECTO DE LA INTENSIDAD DEL TONO SOBRE LA RESPUESTA DE CONGELAMIENTO A LO LARGO DEL TIEMPO DURANTE LA SESION DE ENTRENAMIENTO Y DE PRUEBA EN LA TAREA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL TONO	45
FIGURA 18. EFECTO DE LA INTENSIDAD DEL TONO SOBRE LA RESPUESTA DE CONGELAMIENTO DURANTE EL PERIODO DE LINEA BASE Y DURANTE LA PRESENTACIÓN DEL TONO EN LA SESION DE PRUEBA EN LA TAREA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL TONO	46
FIGURA 19. EFECTO DE LA INTENSIDAD DEL CHOQUE SOBRE LA RESPUESTA DE CONGELAMIENTO DURANTE LA SESION DE ENTRENAMIETO Y PRUEBA EN LA TAREA DE CONDCIONAMIENO DE MIEDO AL TONO.....	47
FIGURA 20. EFECTO DE LA INTENSIDAD DEL CHOQUE SOBRE LA RESPUESTA DE CONGELAMIENTO A LO LARGO DEL TIEMPO DURANTE LA SESIÓN DE ENTRENAMIENTO Y DE PRUEBA EN LA TAREA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL TONO.....	48
FIGURA 21. EFECTO DE LA INTENSIDAD DEL CHOQUE SOBRE LA RESPUESTA DE CONGELAMIENTO DURNATE EL PERIODO DE LINEA BASE Y DURANTE LA PRESENTACION DEL TONO DE LA SESIÓN DE PRUEBA EN LA TAREA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL TONO	50
FIGURA 22. EFECTO DE LA CORTICOSTERONA EN EL ESTRIADO DORSAL SOBRE LA RESPUESTA DE CONGELAMIENTO DURANTE EL ENTRENAMIENTO Y LA PRUEBA EN LA TAREA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL TONO..	53
FIGURA 23. EFECTO DE LA CORTICOSTERONA EN EL ESTRAIDO DORSAL SOBRE LA RESPUESTA DE CONGELAMIENTO A LO LARGO DEL TIEMPO DURNATE LA SESIÓN DE ENTREMAIENTO Y DE PRUEBA EN LA TAREA DE CONDICIONAMIENTOS DE MIEDO AL TONO.....	52
FIGURA 24. EFECTO LA DE CORTICOSTERONA EN EL ESTRIADO DORSAL SOBRE LA RESPUESTA DE CONGELAMIENTO DURNATE EL PERIODO DE LINA BASE Y DURANTE EL PERIODO EN EL QUE SE PRESENTÓ EL TONO DE LA SESIÓN PRUEBA EN LA TAREA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL TONO	55
FIGURA 25. EFECTO DE LA CORTICOSTERONA EN EL HIPOCAMPO DORSAL SOBRE LA RESPUESTA DE CONGELAMIENTO DURANTE LA SESION DE ENTRENAMIENTO Y DE PRUEBA EN LA TAREA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL TONO	54
FIGURA 26. EFECTO DE LA CORTICOSTERONA EN EL HIPOCAMPO DORSAL SOBRE LA RESPUESA DE CONGELAMIENTO DURANTE LA SESION DE ENTRENAMIENTO Y DE PRUEBA A LO LARGO DEL TIEMPO EN LA TAREA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL TONO	57
FIGURA 27. EFECTO DE LA CORTICOSTERONA EN EL HIPOCAMPO DORSAL SOBRE LA RESPUESTA DE CONGELAMIENTO DURANTE EL PERIOD DE LINEA BASE Y DURANTE EL PERIODO EN EL QUE SE PRESENTÓ EL TONO DE LA SESIÓN DE PRUEBA EN LA TAREA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDOAL TONO	56

FIGURA 28. EFECTO DEL ANTAGONISTA RU 486 SOBRE LA RESPUESTA DE CONGELAMIENTO DURANTE LA SESION DE ENTRENAMIENTO Y PRUEBA EN LA TAREA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL TONO.....58

FIGURA 29. EFECTO DEL ANTAGONISTA DE RU 486 SOBRE LA RESPUESTA DE CONGELAMIENTO A LO LARGO DEL TIEMPO DURANTE LA SESION DE ENTRENAMIENTO Y PRUEBA EN LA TAREA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL TONO62

FIGURA 30. EFECTO DEL ANTAGONISTA RU 486 SOBRE LA RESPUESTA DE CONGELAMIENTO DURANTE EL PERIODO DE LINEA BASE Y DURANTE EN PERIODO EN EL QUE SE PRESENTÓ EN TONO DURANTE LA SEISON DE PRUEBA EN LA TAREA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL TONO.63

ÍNDICE DE CUADROS

TABLA 1. GRUPOS UTILIZADOS PARA EVALUAR EL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ANTAGONISTA RU 486 EN EL ESTRIADO SOBRE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE LA TAREA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL TONO.....	37
--	----

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
CBP	Proteína de unión a glucocorticoides
CMC	Condicionamiento de miedo al contexto
CMT	Condicionamiento de miedo al tono
CREB	Factor de transcripción
CRF	Factor liberador de corticotropina
dB	Decibeles
DV	Dorsoventral
EC	Estímulo condicionado
ED	Estriado dorsal
EI	Estímulo incondicionado
GR	Receptor a glucocorticoide
HD	Hipocampo dorsal
HHA	Hipotalámico-Hipofisiario-Adrenal
HSP	Proteína de choque térmico
KDa	Kilodaltones
LTP	Long Term Potentiation
mA	Miliamperios
MCP	Memoria de corto plazo
ML	Mediolateral
MLP	Memoria de largo plazo
MR	Receptor a mineralocorticoide
MS	Medianas espinosas
NMDA	Receptor ionotrópico de glutamato
RC	Respuesta condicionada
RI	Respuesta Indiciona Sustancia