



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**“Cuantificación del receptor a glucocorticoides en el hipocampo
de ratas entrenadas en una tarea de evitación inhibitoria
mediada por diferentes niveles de choque eléctrico**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A

América Montserrat Cruz Quiroz

Directora: Dra. Gina Lorena Quirarte

Dictaminadores:

Dra. María Eugenia Garín Aguilar

Dr. Florencio Miranda Herrera



Los Reyes Iztacala, Edo de México, 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.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gina Quirarte por abrirme las puertas de su laboratorio, por creer en mi trabajo y brindarme las herramientas para la elaboración del proyecto y su incondicional apoyo.

Al Dr. Mauricio Díaz y a los miembros de su laboratorio, en especial a Julieta Rivera por su tiempo, enseñanza, confianza y brindarnos el espacio para que el proyecto se llevara a cabo.

A la Dra. María Eugenia Garín por su infinita paciencia y enseñanzas que me han llevado a un crecimiento académico y personal invaluable.

Al Dr. Florencio Miranda por su apoyo, disponibilidad y sus observaciones que hicieron de este un mejor trabajo.

A los miembros del laboratorio de aprendizaje y memoria, en especial al Dr. Roberto Prado, Norma Serafín, Ángel Méndez y Cristina Medina, por sus aportaciones y colaboración durante mi estancia en el laboratorio. A todos mis compañeros estudiantes del laboratorio de los que aprendí y estuvieron ahí compartiendo ideas, inquietudes y por hacer mi estancia muy agradable.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT); y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) gracias a los cuales se llevó a cabo este proyecto.

A Gemma Aguilar por su compañía, apoyo incondicional y todo el conocimiento que me brindó a lo largo del proyecto, por compartir conmigo la inquietud y emoción en este y otros proyectos y sobre todo por su linda y invaluable amistad.

A mis amigos que han estado conmigo Cinzia González, Elvira González, Fabiola Ocampo, Angie Romo, Lisset Rodríguez, Nadia Sánchez, Marina Soto, Willibalda Ontiveros, Alejandro González, Karla Claro, Raquel y Ramón, con los que he compartido y aprendido tanto, gracias por formar parte de mi vida.

A mi familia que amo tanto y que siempre estuvo ahí, en días buenos y malos. A mi madre Gabriela Quiroz quien siempre ha sido mi maestra, amiga y me ha brindado su apoyo incondicional. A mi padre Enrique Cruz por su amor y sus consejos.

A mis padres Irma Villegas y Alfredo Quiroz a quienes respeto y admiro por su apoyo y cariño infinito que me han brindado desde que nací.

A mis abuelos Ernestina Ramírez y Ponciano Cruz de los que he aprendido tanto y siempre me reciben con los abrazos abiertos llenos de amor

A mi hermana Iranit Cruz por ser tan linda y por siempre tratar de hacerme sonreír y no dejarme sola en este y muchos otros momentos de la vida. A su esposo Giovanni Linares por apoyarnos tanto.

A Pablo Chávez a quien amo tanto y siempre estuvo ahí compartiendo los días buenos y malos; escuchando mis inquietudes, alegrías y disgustos, por su compañía, apoyo y amor incondicional; por participar en este y muchos proyectos más.

Gracias a todos

ÍNDICE

PÁGINAS

Resumen	4
Introducción	5
Antecedentes	7
1. Aprendizaje	7
1.1 Condicionamiento clásico	9
1.2 Condicionamiento operante	9
1.3 Reforzadores y castigos	10
2. Memoria	11
2.1 Consolidación	13
3. Hipocampo	17
4. Estrés y memoria	19
4.1 Eje Hipotálamo-Pituitario- Adrenal (HPA)	22
4.2 Los glucocorticoides	24
4.3 Receptor a Glucocorticoides (GR)	26
Pregunta de investigación	31
Objetivos	31
Hipótesis	32
Materiales y métodos	33
Resultados	42
Discusión	53
Conclusiones	56
Bibliografía	57

RESUMEN

Diversos hallazgos han demostrado que el hipocampo es una estructura cerebral que participa de forma importante en los procesos de aprendizaje y memoria. Se sabe también que bajo situaciones de estrés, se activan diferentes mecanismos en el organismo, entre ellos la liberación de las hormonas glucocorticoides que ejercen su función a través de la unión con receptores que se encuentran distribuidos en diversos tejidos y estructuras, entre ellas, el hipocampo. El presente trabajo tuvo como objetivo cuantificar el receptor a glucocorticoides (GR) en el hipocampo dorsal de ratas que fueron entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria y a las cuales se les midió la extinción de la tarea. Con esta finalidad se entrenaron ratas en la tarea de evitación inhibitoria, que fueron divididas en 4 grupos: entrenadas sin choque eléctrico (0.0 mA) y entrenadas con un choque eléctrico de 0.5 mA, 1.0 mA o 2.0 mA. Una vez terminando el entrenamiento, a las 48 horas la mitad de las ratas de cada grupo fueron usadas para medir la latencia retención y la extinción de la tarea aprendida, medida cada 24 horas durante nueve días; este experimento nos permitió evaluar la fuerza del aprendizaje y su resistencia a la extinción. La otra mitad fueron sacrificadas a distintos tiempos después del entrenamiento (30 minutos, 2 horas y 4 horas para cada uno de los grupos) para medir la expresión del GR en el hipocampo mediante la técnica de Western Blot, esto nos permitió tener en consideración una ventana temporal de la expresión del GR bajo la influencia de diferentes intensidades de choque eléctrico. Los resultados nos permitieron determinar que el estímulo aversivo más fuerte tiene una resistencia mayor a la extinción, en comparación con los otros grupos y que la expresión del GR en el hipocampo dorsal aumenta con respecto a los diferentes estímulos empleados y se mantiene en la ventana temporal.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la ciencia es algo que sin duda ha llenado a la humanidad de grandes beneficios, siendo su principal objetivo el conocimiento. Dentro de la psicología el conocimiento aplicado, como en otras ciencias, puede ser utilizado para prevenir, tratar o solucionar diversas situaciones en las que se ve implicado un organismo, humano o no humano, de manera conjunta o individual, el cual se enfrenta día a día ante diversas situaciones propias así como de su entorno.

Un individuo necesita del conocimiento para poder enfrentarse al medio que lo rodea, varias investigaciones se han enfocado en establecer cómo es que esto sucede y qué procesos se desarrollan para poder hacer frente a las exigencias de este medio. En este sentido uno de los procesos principales que juega un papel de gran relevancia y es de interés para la ciencia, es el aprendizaje, que es entendido como aquel cambio relativamente permanente en la conducta que se debe a la experiencia (McGaugh, 1973).

Ligado al proceso de aprendizaje, está el proceso de la memoria, que puede definirse como el almacenamiento de la información producto de la experiencia. Estos dos procesos son de vital importancia para la supervivencia, ya que nos permiten servirnos de la experiencia previa para hacer frente a situaciones posteriores.

En el día a día, los individuos se ven involucrados en diversas situaciones, muchas de las cuales son potencialmente generadoras de estrés, provocando la activación de diversos mecanismos de respuesta ante dichas situaciones.

Por estrés puede entenderse a la respuesta generalizada no específica del cuerpo a cualquier factor que amenaza con desequilibrar las habilidades compensatorias del cuerpo para mantener la homeostasis (Sherwood, 2001). Ante una situación de estrés, de amenaza o de peligro para el individuo, el organismo reacciona poniendo en marcha mecanismos tanto del sistema nervioso central,

como de ciertos sistemas periféricos (Sandi, Venero y Cordero, 2001). La activación del eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal (HPA) es uno de los mecanismos que se ponen en marcha, teniendo como resultado la secreción de las hormonas adrenales conocidas como glucocorticoides. El mecanismo principal por el que actúan los glucocorticoides, tiene lugar mediante la unión a sus receptores específicos, siendo así que los glucocorticoides al unirse a sus receptores intracelulares en las distintas estructuras cerebrales, pueden modular distintos procesos en el sistema nervioso central como por el ejemplo la formación de la memoria (Sandi et al. 2001). Se sabe que el hipocampo es el principal sitio de unión de los corticosteroides en el cerebro de mamíferos. Por lo tanto, el proceso del aprendizaje, la memoria y la respuesta al estrés están ligados entre sí.

Existen diversas tareas de aprendizaje mediante las cuales se pueden medir diversos aspectos, para el caso del proceso de extinción, así como de la medición del receptor a glucocorticoides, en el presente trabajo se utilizará la tarea de evitación inhibitoria que, como mencionan Garin-Aguilar et al. (2012) es posible usar este modelo como una herramienta metodológica útil para disociar la participación simultánea de múltiples sistemas de memoria en los procesos de aprendizaje y memoria.

Es así que, con el fin de aportar conocimiento dentro de esta línea de investigación y teniendo en cuenta la relevancia del aprendizaje, el almacenamiento de la información, el estrés y las respuestas que desencadenan cada uno de estos procesos dentro del organismo, el objetivo del presente trabajo fue *Cuantificar el receptor a glucocorticoides en el hipocampo y su efecto en la extinción de un aprendizaje aversivo.*

ANTECEDENTES

A lo largo de la historia, el hombre ha buscado entenderse así mismo, ha cuestionado continuamente su existencia, del cómo, por qué y para qué de las cosas; pasando desde el estudio de la relación mente-cuerpo, el alma, los pensamientos, la relación individuo-entorno hasta los procesos neurobiológicos de la conducta.

Dentro de los procesos neurobiológicos más estudiados se encuentran el aprendizaje y la memoria ya que la capacidad de aprender y recordar es esencial para nuestra supervivencia (McGaugh, 2013). El poder recordar lo que ha sucedido nos permite predecir lo que es probable que suceda y alterar nuestro comportamiento en consecuencia. Es así como numerosas investigaciones y experimentos se han encaminado para obtener mayor información acerca del funcionamiento de estos procesos y sus efectos. Squire (1987) indica que los estudios sobre aprendizaje hacen énfasis en la adquisición de conocimiento y desarrollo de nuevas conductas y los de memoria subrayan el papel de la retención o recuerdo de las conductas y otros eventos; la memoria se refiere a la persistencia del aprendizaje en un estado que puede ser revelado un tiempo después; por su parte Sperling (2004) señala que la memoria es la prueba de haber aprendido, es el conocimiento de una experiencia pasada.

1. Aprendizaje

La relevancia del aprendizaje dentro de nuestras vidas diarias es indiscutible, ha constituido la base principal de la supervivencia de las muchas especies, incluyendo la nuestra (Mendoza, 2002), en su sentido más amplio hace posible la socialización humana (McGaugh, 1973). Las diversas definiciones de aprendizaje coinciden en que este proceso es un cambio relativamente permanente en la conducta de un sujeto, que resulta de la experiencia. Al limitar el

aprendizaje a cambios relativamente permanentes, se excluyen modificaciones de la conducta debidas a factores de motivación, a la adaptación sensorial o a la fatiga. Al señalar que la práctica, el entrenamiento y la experiencia son las condiciones esenciales del aprendizaje, se excluyen cambios de la conducta que son resultado de la maduración, la senectud, o de variables fisiológicas (Bower y Hilgard, 2011). Mendoza (2002) comenta que esta capacidad de establecer cambios en nuestra conducta es posible gracias a la plasticidad cerebral.

El aprendizaje se ha dividido en no asociativo y asociativo. El primer tipo de aprendizaje implica experiencia con un solo estímulo o con dos estímulos que no tienen necesariamente una relación temporal (Mendoza, 2002), donde se encuentra la habituación, la sensibilización y la impronta.

La habituación es considerada como la disminución o decremento de una respuesta innata a un estímulo a medida que éste se repite) ya que el organismo aprende las propiedades de un estímulo novedoso inofensivo o no reforzante y por tanto, suprime su respuesta ante él (Rosenzweig & Leiman, 2003; Mendoza, 2002). La sensibilización ocurre cuando un estímulo fuerte del mismo tipo, o incluso de otra modalidad sensorial, provocará a menudo que la respuesta a presentaciones sucesivas del estímulo habituado incremente su amplitud (Rosenzweig & Leiman, 2003). Mientras que la impronta es un tipo de aprendizaje que se observa con facilidad en animales que nacen con un estadio relativamente avanzado de desarrollo, sobre todo motor, donde los animales jóvenes comienzan a seguir el primer objeto relativamente grande y en movimiento que ven; es la forma en que el individuo se integra al grupo de su misma especie en condiciones normales (Mendoza, 2002).

Por otro lado, el aprendizaje asociativo implica la asociación entre eventos: un estímulo y una respuesta, una respuesta y su consecuencia, o entre dos o más estímulos (Mendoza, 2002); dentro de este tipo de aprendizaje encontramos el condicionamiento clásico y el condicionamiento operante.

1.1 Condicionamiento Clásico

Abordado inicialmente por el fisiólogo ruso Ivan Petrovich Pavlov, el condicionamiento clásico se basa en la fuerza de la asociación entre un estímulo neutro (estímulo condicionado (EC)), incapaz por sí mismo de producir una respuesta, con un estímulo incondicionado (EI) que sí la evoca; al cabo de varios ensayos o apareamientos, el estímulo neutro, como consecuencia de su asociación con el estímulo incondicionado, será capaz de producir una respuesta condicionada (RC) muy semejante a la respuesta incondicionada (RI) (González-Cabanach, 1995). Bermúdez-Rattoni, Quirarte y Prado-Alcalá (2001) mencionan que para obtener un reflejo condicionado se comienza con la adquisición por asociaciones repetidas, es decir, la repetición de la presentación del EI después de la presentación del EC. Una característica importante es que el EC siempre debe preceder al EI. Pavlov encontró que se requería de un intervalo de tiempo entre los dos estímulos y halló que cuando el EI ya no se presenta durante varios ensayos, es decir, que el estímulo condicionado se presenta solo, la respuesta empieza a decaer gradualmente e inclusive puede llegar a desaparecer; a esto se le llama extinción de la respuesta. Después de que hay una completa extinción y se vuelve a presentar sólo el EC, se puede dar de nuevo la respuesta, fenómeno al que se le llama recuperación espontánea. También es sabido que el aprendizaje se facilita mediante el aumento del intervalo entre ensayos repetidos (McGaugh, 1966).

1.2 Condicionamiento instrumental u operante

La base del aprendizaje instrumental fue desarrollada por Edward Thorndike que identificó la forma de aprendizaje dada por ensayo y error, a la que posteriormente se le llamo aprendizaje por selección y conexión; en esta situación los sujetos que aprenden se enfrentan a un problema y deben alcanzar una meta y lo hacen cuando seleccionan una respuesta entre un número de posibilidades, ejecutan esa respuesta y en consecuencia arriban a un resultado (Bower e Hilgard 2011).

Tiempo después B. F. Skinner desarrolló el condicionamiento operante, que radica en la distinción entre la conducta respondiente y la conducta operante, este condicionamiento implica una relación de contingencias en donde un estímulo es seguido por una respuesta, y a esta última le sigue una consecuencia, la cual tendrá un efecto directo sobre la probabilidad de presentación futura de la respuesta (Mendoza, 2002).

1.3 Reforzadores y castigos

Un reforzador es cualquier estímulo que incrementa la probabilidad de ocurrencia de una respuesta; los reforzadores positivos son aquellos cuya presentación contingente a la respuesta aumenta la probabilidad de aparición de esa respuesta; mientras que los reforzadores negativos son aquellos cuya retirada contingente a la conducta incrementa la probabilidad de que esta conducta vuelva a repetirse.

El castigo es cualquier estímulo que decrementa la probabilidad de ocurrencia de una respuesta; el castigo positivo es aquel estímulo aversivo cuya retirada contingente a la conducta disminuye su probabilidad de aparición, mientras que el castigo negativo consiste en la retirada de un refuerzo positivo que posee el sujeto, retirada que se efectúa como consecuencia de la conducta que se desea suprimir, disminuyendo así la probabilidad de aparición de esa conducta.

Dentro del aprendizaje operante podemos entender a la extinción como aquella fase del aprendizaje donde se presenta un decremento de la conducta debido a la suspensión del reforzador (Bermúdez y Prado-Alcalá 2001), en aquellas ocasiones donde se utiliza algún estímulo aversivo podría entenderse que es el proceso teórico que representa el descenso de miedo condicionado. Kesner y Martínez (2007).

Se sabe también que en la experiencia aprendida, la intensidad del estímulo tiene un efecto sobre la fuerza de la respuesta condicionada y que las diferencias en la fortaleza del aprendizaje deben poder manifestarse durante una prueba de resistencia a la extinción (Garin-Aguilar et al. 2012). Las fases o etapas del aprendizaje quedan representadas en la Figura 1.



Figura. 1. Representa las etapas del almacenamiento de información.

2. Memoria

La memoria es reconocida como el almacenamiento de información proveniente del aprendizaje, es una asombrosa habilidad, producto de la evolución del cerebro humano (Téllez, 2005), cada persona ha tenido diversas experiencias a lo largo de su vida, algunas agradables y otras no, sin embargo, cada una de esas experiencias provee de información, la cual es almacenada dentro de nosotros, gracias a esto, nos es posible tener una percepción propia acerca de las cosas, sirve como referencia para nuestra toma de decisiones, saber qué nos gusta y qué no, reconocer a las personas con quienes hemos convivido, identificar los lugares en los que hemos estado y cuáles nos faltan por conocer, es decir, tenemos una referencia de dónde venimos y hacia donde queremos dirigirnos. Esta habilidad ha influido en la acumulación de mayor experiencia y en el desarrollo de aprendizajes más complejos.; Kandel (2007) por su parte resalta que

la memoria no sólo es esencial para la continuidad de la identidad sino para la transmisión de la cultura, la evolución y la continuidad de las sociedades a lo largo de las centurias (Kandel, 2007). La capacidad de abstraer información del medio ambiente, almacenarla y recrearla para generar nuevas formas de resolver problemas es una de las cualidades más importantes de nuestro cerebro (Rueda-Orozco et al., 2006).

Es necesario recalcar que la memoria y el aprendizaje están estrechamente relacionados, la memoria implica la adquisición previa de información (aprendizaje) y el aprendizaje requiere la retención de esa información (Téllez, 2005), no podemos observar la evocación o recuperación de la información si antes ésta no fue aprendida (Mendoza, 2002).

La memoria no es una construcción unitaria, por el contrario, los recuerdos que uno tiene son tan diversos como la experiencia que los producen (Kesner y Martinez, 2007). Las investigaciones sobre las bases fisiológicas de la memoria han desembocado en diversos intentos por encontrar la evidencia de algún cambio permanente en las funciones neuronales como producto de la experiencia (McGaugh, 1966).

En cuanto a la temporalidad o duración del almacenamiento de la información, se ha clasificado a la memoria como memoria a corto plazo y memoria a largo plazo. Los procesos a corto plazo proporcionan una base temporal de recuerdo de experiencias, y la consolidación de las huellas a largo plazo implica procesos que ocurren en intervalos relativamente largos de tiempo.

En lo que se refiere a las características propias de la información almacenada, encontramos las memorias visual, auditiva, kinestésica, espacial, emocional y semántica (Téllez, 2005). También se menciona la concurrencia de la memoria explícita y la implícita (Kandel, 2007).

2.1 Consolidación

Se han realizado diversas investigaciones sobre las bases fisiológicas de la memoria intentando encontrar la evidencia de algún cambio permanente en las funciones neuronales como producto de la experiencia (McGaugh, 1966).

Para que la información pueda quedar almacenada debe pasar por un proceso de consolidación, el cual puede entenderse como la estabilización progresiva de la memoria de largo plazo después de la adquisición. El término de consolidación se utiliza comúnmente para referirse a dos tipos de procesos, la consolidación sináptica que se lleva a cabo dentro de los primeros minutos a horas después de aprender y se produce en todos los sistemas de memoria estudiados hasta el momento; y la consolidación de los sistemas de memoria que implica a las estructuras cerebrales, y conlleva mucho más tiempo. En este proceso de consolidación, el hipocampo funge una función de filtro de información ya que ésta llega al hipocampo donde hay una reorganización de la información para después ser almacenada en otras áreas (Dudai, 2004). La consolidación de la memoria requiere de tiempo y bajo al menos algunas circunstancias, los procesos de consolidación parecen ser susceptibles a una variedad de influencias que pueden facilitarla o perjudicarla (McGaugh, 1966); lo que ha proporcionado una oportunidad para la investigación de este proceso y poder establecer las condiciones que ocurren después del aprendizaje para regular la fuerza de la memoria (McGaugh, 2013). Por lo tanto, la consolidación de la memoria es el proceso que media entre la experiencia de un suceso y el almacenamiento de la misma (Téllez, 2005). A través de diversas tareas experimentales que permiten estudiar a la memoria, se ha encontrado que cada ensayo de entrenamiento repetido puede potenciar los procesos de corta duración que subyacen a la adquisición y a su vez mejora simultáneamente la consolidación a largo plazo. En la Figura 2 se muestra el modelo estándar de la consolidación de la memoria.

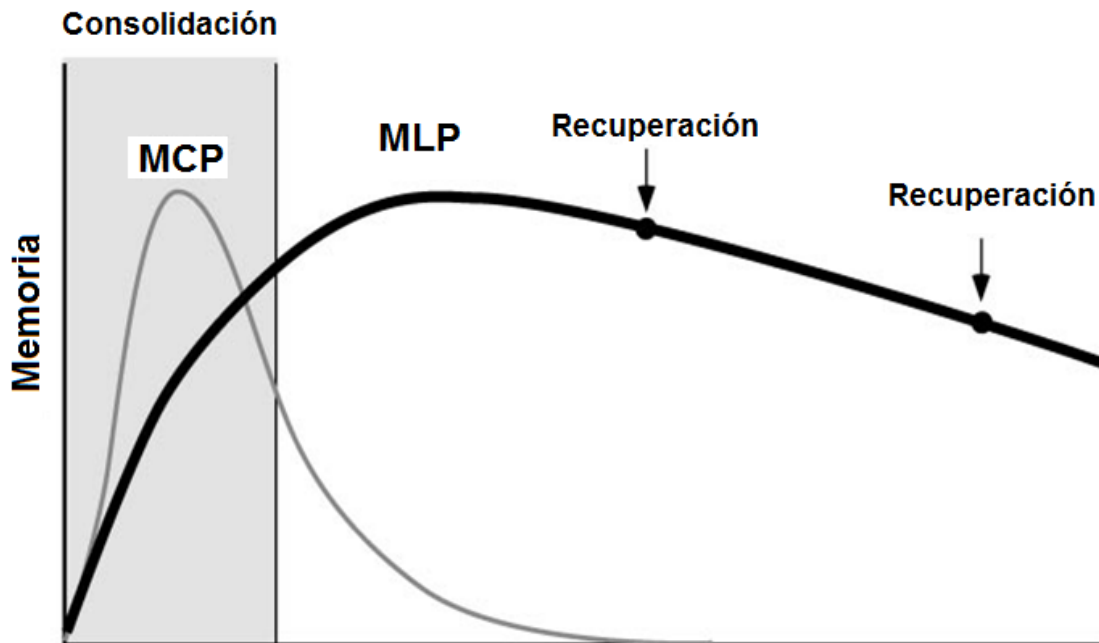


Figura 2. Modelo estándar de la consolidación de la memoria. MCP: memoria de corto plazo, MLP: memoria de largo plazo. Tomado de Dudai (2004).

Los resultados experimentales han aportado pruebas sólidas de que los estimulantes del sistema nervioso central pueden facilitar el aprendizaje mejorando la consolidación de la memoria. Amplia evidencia sobre la consolidación de la memoria ha venido de estudios de amnesia inducida experimentalmente (McGaugh, 1966). Se sabe que las hormonas adrenales del estrés, la epinefrina y la corticosterona liberada por la excitación emocional regulan la consolidación de la memoria a largo plazo (McGaugh, 2013). Apoyando a esta idea, Sandi (1998) encontró evidencia de que los glucocorticoides durante el post-entrenamiento, a través de la actuación específica de los receptores a glucocorticoides en el cerebro, modulan la formación de la memoria.

La memoria en sí, implica la activación y modulación de diversas estructuras cerebrales, las cuales trabajan como un sistema y cada una de estas estructuras está involucrada con la memoria según el tipo de información que deba ser almacenada. Es debido a esto que la clasificación de la memoria, así

como su relación con las estructuras cerebrales, ha sido objetivo de diversas líneas de investigación. Sweatt y McKnight (2010), mencionan que la mayoría de las regiones neuroanatómicas humanas que están asociadas con los sistemas de memoria específicos han sido identificadas usando enfoques clínicos.

Lo cierto es que la memoria no funciona de manera aislada o solamente sobre una estructura en particular; no se almacena sólo un tipo de información, sino más bien puede hablarse de sistemas y diferentes tipos de información que provienen de diversos estímulos del medio. McGaugh (2013) comenta que a los diversos momentos de la vida no se les da el mismo peso en la memoria, nosotros no recordamos igualmente toda nuestra experiencia, aunado a esto Sweatt y McKnight (2010) mencionan que la conceptualización moderna de la memoria en los seres humanos es el hecho de que la memoria se lleva a cabo por múltiples sistemas de memoria. Ahora pensamos en la memoria humana como un complejo de varios componentes, proceso de múltiples entradas y salidas. Es sabido que hay diferentes estructuras que participan en el proceso de la memoria, ejemplo de esto es el hipocampo, al cual se le ha relacionado con la memoria de tipo espacial (Broadbent, Squire y Clark, 2004). Ver Figura 3.

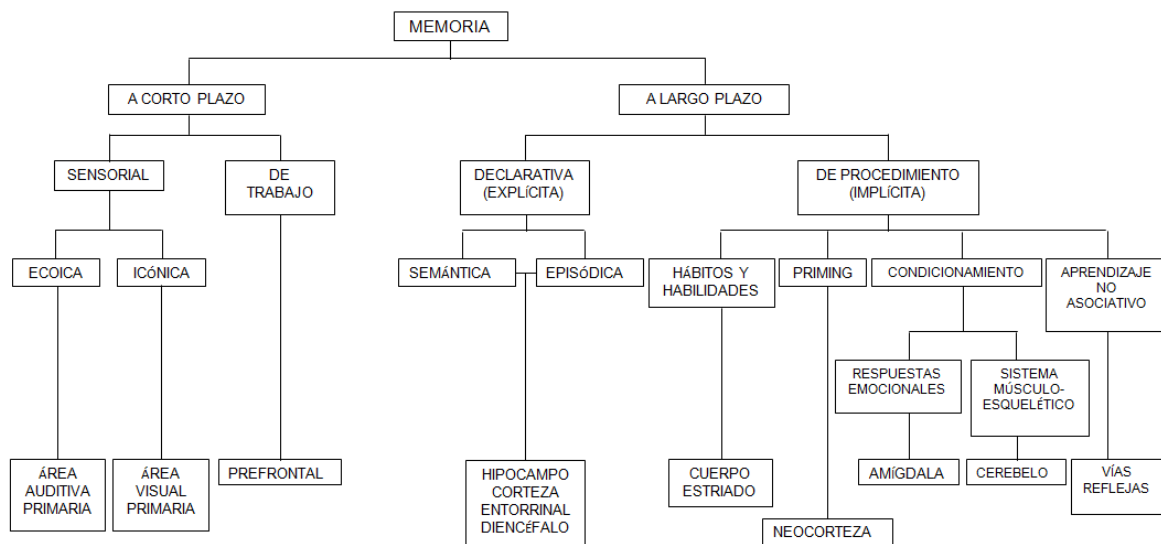


Figura 3. Tipos y subtipos de memoria con las respectivas estructuras cerebrales implicadas. Tomado de Téllez (2005).

Prado-Alcalá et al. (2006) mencionan que con el desarrollo de la biología celular y molecular, se han descrito algunos de los mecanismos íntimos neuronales que son desencadenados a partir de experiencias de aprendizaje, que a través del proceso de consolidación, tienen como consecuencia la formación de la memoria de largo plazo. La formación de esta memoria depende de la activación de genes específicos que contienen la codificación necesaria para la síntesis de proteínas. De esta manera, la información derivada de una experiencia de aprendizaje podría quedar almacenada en virtud de cambios en la estructura y metabolismo neuronales (crecimiento dendrítico, génesis de espinas dendríticas, incremento en la producción y liberación de neurotransmisores, síntesis de receptores de membrana sensibles a neurotransmisores específicos, etc.). A mediados de los años noventa se había demostrado que cierto factor de transcripción, el CREB desempeñaba una función clave en la conversión de la memoria a corto plazo en memoria a largo plazo (Fields, 2005). También se ha estudiado el papel que juegan distintos tipos de hormonas y neurotransmisores en el proceso de aprendizaje y memoria; en el encéfalo la mayoría de las neuronas se comunican entre sí liberando mensajeros químicos denominados neurotransmisores que provocan respuestas eléctricas postsinápticas al unirse a distintos componentes de un grupo diverso de proteínas denominadas receptores de neurotransmisores (Purves et al., 2008). Gracias a estos transmisores nerviosos las neuronas se pueden comunicar y los sistemas del cerebro pueden realizar sus funciones cognoscitivas. Cualquier modificación relevante en la función de los neurotransmisores puede producir alteraciones psicológicas. Los neurotransmisores más conocidos son la dopamina, la acetilcolina, el glutamato, el GABA, la serotonina y la noradrenalina (Téllez, 2005). Las hormonas, por su parte, son sustancias químicas secretadas por las glándulas endocrinas, se necesitan en cantidades muy pequeñas y sirven como reguladores en ciertos procesos muy específicos (Ardila, 2007). Las células en el cerebro, contienen los tipos de receptores para las hormonas que median estos cambios en la expresión génica (McEwen, Sakai, y Spencer, 1993). Se sabe que hay hormonas que participan activamente en el proceso de la memoria, las principales son las hormonas del

estrés: el cortisol y la adrenalina, secretadas por las glándulas suprarrenales (Téllez, 2005). Las hormonas influyen en los procesos metabólicos actuando sobre ellos activando funciones ya existentes; tienden a excitar o a inhibir sistemas de enzimas (Ardila, 2007).

Se sabe que ante una situación de estrés, en el organismo se activan numerosos receptores de diferentes tipos de neurotransmisores y de esta forma se activan circuitos del sistema nervioso para responder ante esta situación, estos mecanismos están relacionados con el almacenamiento de la información. Es así que el proceso de aprendizaje, memoria y respuesta al estrés están ligados entre sí.

Existen diversas tareas de aprendizaje mediante las cuales se pueden probar o medir diversos aspectos, para el caso del proceso de extinción, así como de la medición del receptor a glucocorticoides, en el presente trabajo se utilizará la tarea de evitación inhibitoria que, como mencionan Garín-Aguilar et al. (2012) es posible usar este modelo como una herramienta metodológica útil para disociar la participación simultánea de múltiples sistemas de memoria en los procesos de aprendizaje y memoria que permitirá desentrañar las relaciones de competencia o de cooperación entre los sistemas participantes.

3. Hipocampo

El hipocampo recibe su nombre debido a su forma curvada similar a la del caballo de mar, Kolb y Whishaw (2009) señalan que esta estructura se extiende siguiendo una curva desde el neocórtex lateral del lóbulo temporal medial hasta la línea media del encéfalo y se encuentra dentro del lóbulo temporal, está conectado a las estructuras corticales temporales por la vía perforante y a los cuerpos mamilares del tronco encefálico, al núcleo accumbens y al tálamo. A su vez el hipocampo está conectado al resto del encéfalo a través de la vía perforante (porque perfora el hipocampo) y lo conecta con el tálamo y la corteza frontal, los ganglios basales y el hipotálamo.

La información sensorial de las diversas áreas sensoriales corticales se canaliza hacia el hipocampo a través de la corteza perirrinal y entorrinal, que son las áreas corticales en la proximidad anatómica inmediata del hipocampo en el lóbulo temporal (Sweatt y McKnight, 2010).

El hipocampo está formado por dos circunvalaciones, el asta de Ammon o cuerno de Ammon (CA) y la circunvolución dentada o giro dentado; cada una contiene un tipo de célula distinto; en el asta de Ammón se encuentran células piramidales, en cambio en la circunvolución dentada encontramos células granulares; las células piramidales del asta de Ammón están divididas en cuatro grupos: CA1, CA2, CA3, y CA4. Las conexiones entre la circunvolución dentada y el asta de Ammón son amplias, de modo que casi todas las células granulares se conectan a todas las células piramidales; esta interconectividad sugiere que después de una lesión parcial, las partes que quedan pueden conservar intactas algunas de las funciones de las estructuras; Dentro del hipocampo, las vías aferentes desde la corteza vienen por la circunvolución dentada y desde allí se proyectan hacia el asta de Ammón. Por lo tanto, las células granulares son las células “sensitivas” del hipocampo y las células piramidales son las células motoras. Las células CA1 se proyectan hacia otra parte del lóbulo temporal denominada subículo, y las células del subículo se proyectan de vuelta hacia la corteza del lóbulo temporal y hacia el tálamo y el tronco encefálico (Kolb y Whishaw, 2009).

Se sabe de la participación del hipocampo en la memoria de humanos debido a lesiones ocurridas en esta estructura como producto de accidentes. También es sabido que el hipocampo permite que se lleve a cabo la memoria declarativa, episódica y espacial (Sweatt y McKnight, 2010).

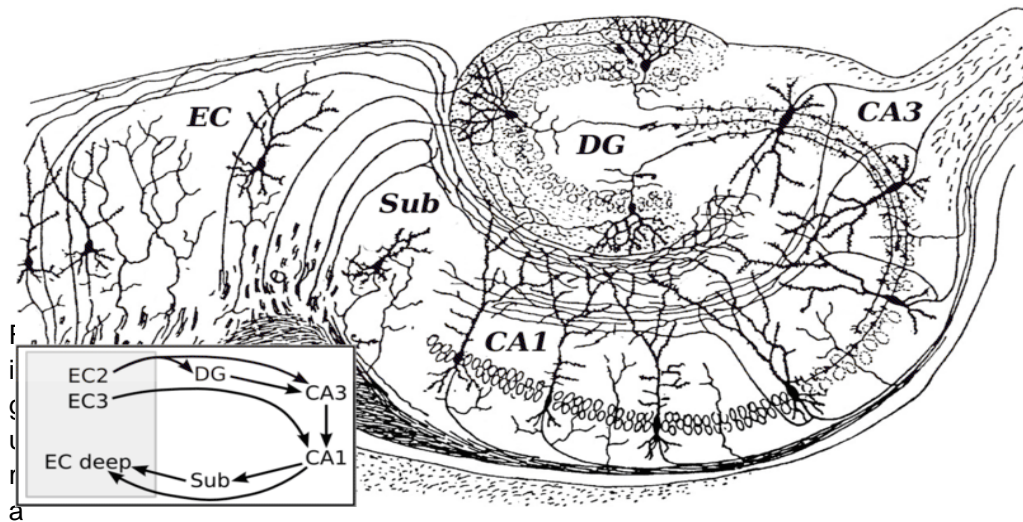


Figura 4. Dibujo de las subregiones y conexiones neuronales del hipocampo. Modificado de Ramon y Cajal (1899).

El hipocampo tiene una relevancia imprescindible en sus funciones, ya que es parte de un sistema multimodal de integración sensorial en el sistema nervioso central (Sweatt y McKnight, 2010).

En su relación con el estrés, el aprendizaje y la memoria Kesner y Martínez, (2007) comentan que debido a su participación y la inducción de la potenciación a largo plazo, que son características de las primeras etapas del proceso de aprendizaje y memoria, la exposición de estrés puede ser clasificado como un factor de atención y reforzante auxiliar en el proceso de la memoria.

4. Estrés y memoria

Joseph-Bravo y De Gortari (2007) indican que el estrés, incluye cualquier estímulo externo que cause un cambio en el equilibrio del organismo y que puede definirse como la respuesta de un sistema autorregulable a una alarma general. El estrés a nivel comportamental, inevitablemente conlleva una multitud de correlatos fisiológicos, hormonales y moleculares en el organismo (Sandi et al. 2001). Las situaciones de estrés agudo producen elevación en la actividad hormonal

(fundamentalmente de hormonas corticosteroideas y de adrenalina). El agente que induce esta respuesta es llamado estresor, mientras que el estrés se refiere al estado inducido por el estresor (Sherwood 2001).

En este trabajo, entenderemos al estrés como el estado creado en un organismo enfrentado a agentes reales o simbólicamente nocivos para su integridad, estado que desencadenaría una serie de respuestas no específicas, desarrolladas en el curso de la filogenia y conservadas gracias a su valor adaptativo a estos agentes (Vigas, 1980). El estrés representa una interacción entre los diversos elementos del medio ambiente, incluyendo el "entorno externo" del organismo, otros organismos vivos y los resultados de una serie de experiencias que desafían la homeostasis y activan la secreción de hormonas (McEwen et al. 1993). Cada malestar en el cuerpo, ya sea real o imaginario, provoca una respuesta de estrés, que sirve para restaurar la homeostasis y facilitar la adaptación (de Kloet, Vreugdenhil, Oitzl y Joëls, 1998).

Ante una situación de estrés, el organismo reacciona activando diversos sistemas a través de los cuales busca regresar a todo el cuerpo a la homeostasis, y lograr la restauración del equilibrio fisiológico que es el objetivo final de la respuesta del cuerpo al estrés. Para que haya estrés en el organismo es necesario tener un estímulo que lo cause, sea interno o externo. La reacción de cada organismo ante una situación de estrés depende de diversos factores y es en función de la naturaleza, intensidad, duración y frecuencia del estímulo estresante que se producen cambios a corto o largo plazo, en toda una serie de sistemas (Sandi et al., 2001), así como de las regiones activadas del sistema nervioso central (en particular el sistema límbico: amígdala, corteza frontal, hipocampo e hipotálamo) y los neurotransmisores involucrados (Joseph-Bravo y De Gortari, 2007).

Resaltando la importancia de la función de las hormonas y sus receptores, cabe señalar que la especificidad de los efectos hormonales está determinada por la selectividad de los receptores en las membranas celulares y por los genes específicos involucrados en las células (Rosenzweig y Leiman, 2003). También es

bien sabido que el modo como reacciona cada persona ante una situación particular, se encuentra estrechamente ligado al modo como las múltiples experiencias de la vida han ido labrando su cerebro y en definitiva, su estilo cognitivo (Sandi et al., 2001), por lo que varía de organismo en organismo.

Siguiendo en la línea del estrés, Joseph-Bravo y De Gortari (2007) señalan que existen diferentes tipos de estresores, como los estresores físicos que son estímulos que alteran el estado fisiológico afectando mecanismos homeostáticos que activan las vías nerviosas que llegan a núcleos localizados en la parte superior de la médula espinal y en el tallo cerebral, los cuáles envían aferentes directamente al núcleo paraventricular del hipotálamo e incitan una respuesta rápida y necesaria para la supervivencia, pero no requieren mayor interpretación por estructuras superiores del cerebro. Por otro lado los estresores psicológicos son estímulos que amenazan el estado actual del individuo o provocan un estado de anticipación aun cuando no representen una amenaza inmediata a las condiciones fisiológicas; necesitan ser procesados por la corteza antes de iniciar la respuesta al estrés para tener un significado fisiológico, y dependen en gran medida de experiencias previas. Esta información es organizada en las estructuras límbicas induciendo las respuestas neuroendocrinas y conductuales al estrés. Por lo tanto, dependiendo del tipo de estrés, físico o psicológico, se activan las neuronas del tallo cerebral o las de áreas del sistema límbico.

Durante la respuesta del organismo al estrés, es inminente hablar de la activación del eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal (HPA), Sandi et al. (2001) marcan que la activación del eje HPA tiene como consecuencia final la secreción de glucocorticoides. Si los glucocorticoides alcanzan niveles elevados por tiempos prolongados pueden resultar perjudiciales para el organismo, pudiendo producir, entre otras alteraciones: daño neuronal, ansiedad depresión, hipertensión, infertilidad, entre otros; así pues, es importante para el organismo que la activación del eje HPA sea regulada con particular precisión.

Lo que se denomina estrés a nivel comportamental, inevitablemente conlleva una multitud de correlatos fisiológicos, hormonales y moleculares en el

organismo. Las situaciones de estrés agudo producen elevaciones en la actividad hormonal (Sandi et al., 2001). Joseph-Bravo y De Gortari (2007) señalan que los glucocorticoides proveen la energía necesaria a los músculos para efectuar la respuesta e influyen en la transmisión sináptica. Así mismo se ha comprobado que ante la sobre activación prolongada, se desencadenan diversas patologías en el organismo.

4.1 Eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA)

Una de las respuestas principales del organismo ante una situación de estrés, es la activación del eje Hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA). El hipotálamo es el encargado de coordinar y modular la rápida respuesta del sistema simpático junto con la activación del eje HPA (Sandi et al., 2001). También regula la secreción de glucocorticoides a través de la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), así como la vasopresina y la oxitocina, que actúan sinérgicamente en la hipófisis para causar la liberación de ACTH (McEwen et al., 1993).

Sandi et al. (2001) describen el proceso del eje HPA e indican que inicialmente, en respuesta a distintos agentes estresantes, se producen señales de activación procedentes de distintas estructuras cerebrales, que convergen en un grupo de neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo, estas neuronas sintetizan la hormona liberadora de corticotropina (CRH); esta es liberada en la eminencia media, en donde hay una serie de capilares que forman un sistema de vasos portales, estos vasos ponen en comunicación al hipotálamo con la hipófisis anterior o adenohipófisis. Al llegar a la adenohipófisis, la CRH estimula a las células corticotrópicas, que sintetizan y liberan a la circulación sanguínea la hormona corticotropina (ACTH), la cual una vez secretada a la circulación sanguínea activa la captación de glucosa en el músculo esquelético y al llegar a las glándulas adrenales, estimula la producción y liberación de los glucocorticoides a la sangre, en donde la máxima concentración de estas hormonas suele observarse a los 30 minutos de haber comenzado la situación estresante, aunque autores como Kloet et al. (1998) mencionan que la secreción

de corticoides suprarrenales suele alcanzar niveles máximos a los 15 minutos después de la activación de HPA.

En resumen, la activación del HPA tiene como resultado final la secreción de glucocorticoides. Este hecho constituye un paso fundamental en la respuesta adaptativa del organismo frente a una situación de estrés. Actuando principalmente en el hipotálamo y en la hipófisis, los glucocorticoides son capaces de regular su propia liberación, inhibiendo tanto la secreción como la síntesis de CRH y ACTH (Sandi et al., 2001). Ver Figura 5.

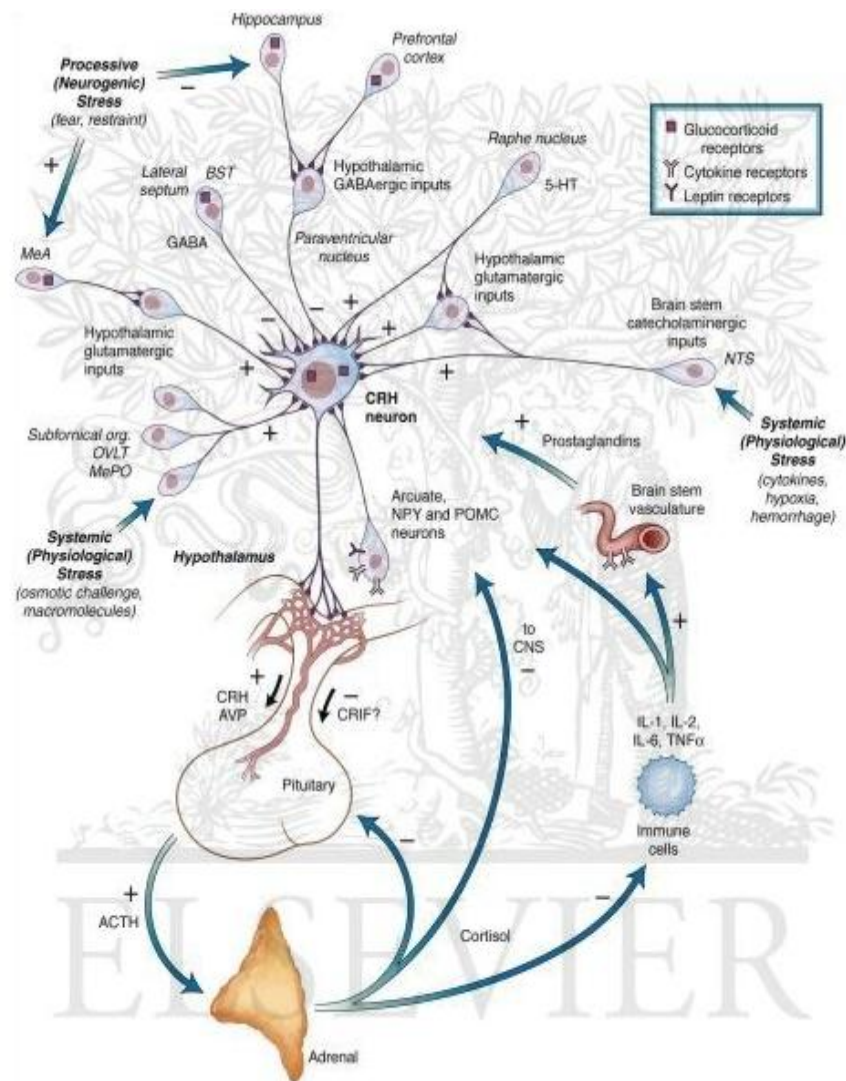


Figura. 5. Muestra la regulación del eje HPA. Tomado de Kronenberg et al. (2003).

4.2 Los Glucocorticoides

Los glucocorticoides son un grupo de hormonas esteroideas adrenocorticales, tienen efectos metabólicos que incluyen la estimulación de la gluconeogénesis, aumentan el catabolismo de las proteínas, la movilización de ácidos grasos, y una potente inhibición de la respuesta inflamatoria (Kesner y Martinez, 2007), son pequeñas y lipófilas, con escasa solubilidad en los medios acuosos, son secretadas inmediatamente después de ser sintetizadas por lo que no pueden ser almacenadas; se transportan a través de la sangre (Koolman y Röhm, 2004); al ser liberados a la circulación se unen a determinadas proteínas plasmáticas que ayudan a su transporte (Sandi et al., 2001); su naturaleza lipofílica les permite entrar a la célula y actuar sobre receptores intracelulares, sobre todo a nivel de la transcripción, por lo que necesitan unirse a su receptor para poder ejercer su mecanismo de acción, uniéndose en el citoplasma de la célula, formando el complejo receptor-hormona, una vez unido a su receptor, el glucocorticoide es llevado al núcleo celular, la acción hormonal produce, en un lapso de minutos a horas, concentraciones cambiantes de RNAm para las proteínas clave de los procesos celulares, es decir, de la respuesta celular (Koolman y Röhm, 2004). La sensibilidad hacia los glucocorticoides varía considerablemente entre los individuos, incluso en el mismo individuo, la capacidad de respuesta a los glucocorticoides se diferencia entre los tejidos (Lu y Cidlowski, 2006). Como reflejo de esta amplia gama de funciones, la elaboración de glucocorticoides sintéticos compone una gran clase de fármacos indispensables en el tratamiento de la inflamación, trastornos autoinmunes, cáncer, rechazo de trasplantes de órganos y edema cerebral.

Las glándulas adrenales liberan diferentes hormonas en el organismo, estas hormonas difieren en función unas de otras y son producidas en distintas partes estructurales de las glándulas adrenales como se muestra en la Figura 6. El cortisol (en humanos, corticosterona en roedores), es el glucocorticoide más importante que se produce en la corteza suprarrenal, ya que regula el metabolismo de las proteínas y de los hidratos de carbono estimulando la

degradación de las proteínas y la conversión de los aminoácidos en glucosa, es así que permite se incremente el nivel sanguíneo de azúcar (Koolman y Röhm, 2004).

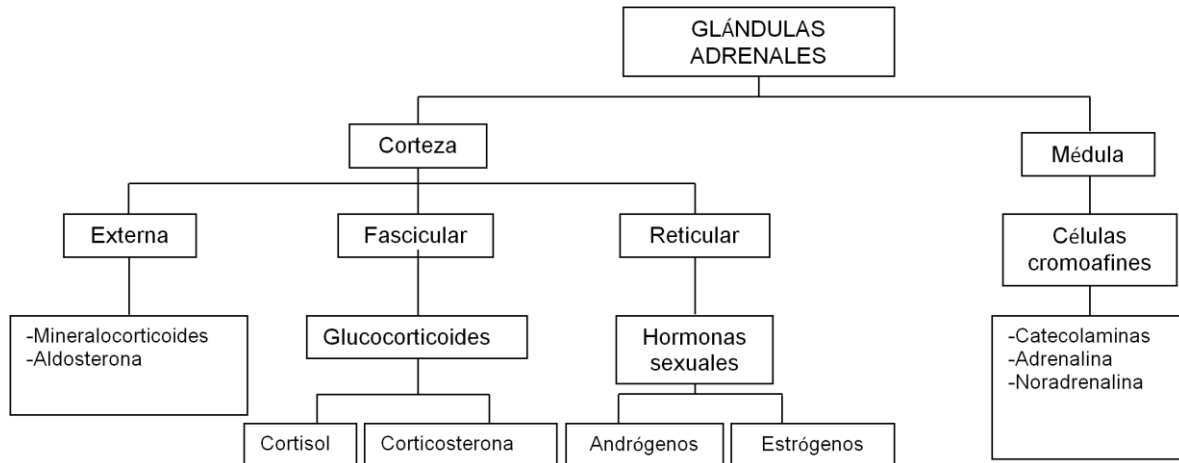


Figura. 6. Estructura de las glándulas adrenales y su producción de hormonas.
Modificado de Téllez (2005)

La acción de los glucocorticoides depende del tejido y la especificidad de la célula blanco. Las células diana de los glucocorticoides se distribuyen ampliamente por todo el organismo de los mamíferos; a pesar de que los efectos hormonales difieren ampliamente entre diferentes células diana, tales células tienen el mismo sistema en el que el receptor funciona como mediador intracelular entre la señal hormonal y la respuesta celular (Gehring, 1993). Tres elementos clave pueden afectar la regulación de la transcripción por los glucocorticoides: la disponibilidad ligando, el propio receptor y el reclutamiento de cofactores y otras proteínas (Lu y Cidlowski, 2006).

4.3 Receptor a glucocorticoides (GR)

Las acciones de la corticosterona en el cerebro están mediadas por su unión a receptores específicos, el receptor de glucocorticoides (GR) y los receptores de mineralocorticoides (MR) (de Kloet et al., 1998). El MR se encarga del mantenimiento de la actividad HPA basal y el GR facilita la recuperación de la activación inducida por el estrés (de Kloet et al., 1998). Ambos tipos de receptores

se producen en el hipocampo en concentraciones altas, pero están presentes también en otras áreas del cerebro y en otros tejidos del cuerpo (McEwen et al., 1993). En definitiva es la unión de esteroides al receptor el primer paso en los eventos bioquímicos de la acción de glucocorticoides (Gehring, 1993) y es el hipocampo la estructura cerebral con más GR (McEwen et al., 1968 y Reul y De Kloet, 1985).

El GR tiene una estructura modular que está formada por dominios de diferente longitud y función; los cuales son el dominio regulador, el dominio para la unión al DNA y el dominio para la unión con la hormona (Koolman y Röhm, 2004). Ante la ausencia de hormona, el GR se encuentra en el citoplasma como monómero en complejo con proteínas chaperonas, principalmente con la proteína de choque térmico hsp90 (Koolman y Röhm, 2004). Al unirse el GR a la hormona se da un cambio profundo en la estructura del receptor que da como producto la activación del receptor (Gehring, 1993), el complejo hormona-receptor es conducido al núcleo, pasando a través de la membrana nuclear donde puede unirse directamente al ADN para regular la expresión del gen diana a través de secuencias específicas del ADN que reconocen al GR activado y se denominan elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs). Existen dos tipos de GREs: GREs positivos que determinan la inducción de la transcripción y GREs negativos que la reprimen. El GR interactúa con factores de transcripción tales como activadores de proteína, transductores de señal y activadores de la transcripción, dándole al complejo hormona-receptor la capacidad de interactuar ahora con el genoma (Koolman y Röhm, 2004).

El GR activado también recluta selectivamente cofactores de manera coordinada, muchos de los coactivadores relacionados con el GR contienen histona acetiltransferasa intrínseca y la actividad metiltransferasa, que altera la estructura de la cromatina y facilita el acceso de los componentes de la maquinaria de transcripción al ADN (Lu y Cidlowski, 2006).

El dominio de unión a la hormona determina la especificidad de unión al esteroide, es el dominio de unión a ADN el responsable de la expresión de genes

específicos de glucocorticoides; el dominio de unión a la hormona cubre una parte importante de la secuencia del receptor principal ya que diferentes subregiones dentro del dominio de unión de las hormonas contribuyen, directa o indirectamente, a la integridad, el plegamiento correcto y la funcionalidad de este dominio receptor (Gehring, 1993).

En conclusión, la unión de los glucocorticoides induce cambios conformacionales en el receptor, la disociación de proteínas chaperonas, la dimerización del receptor, la importación nuclear y de unión al ADN (Lu y Cidlowski, 2006).

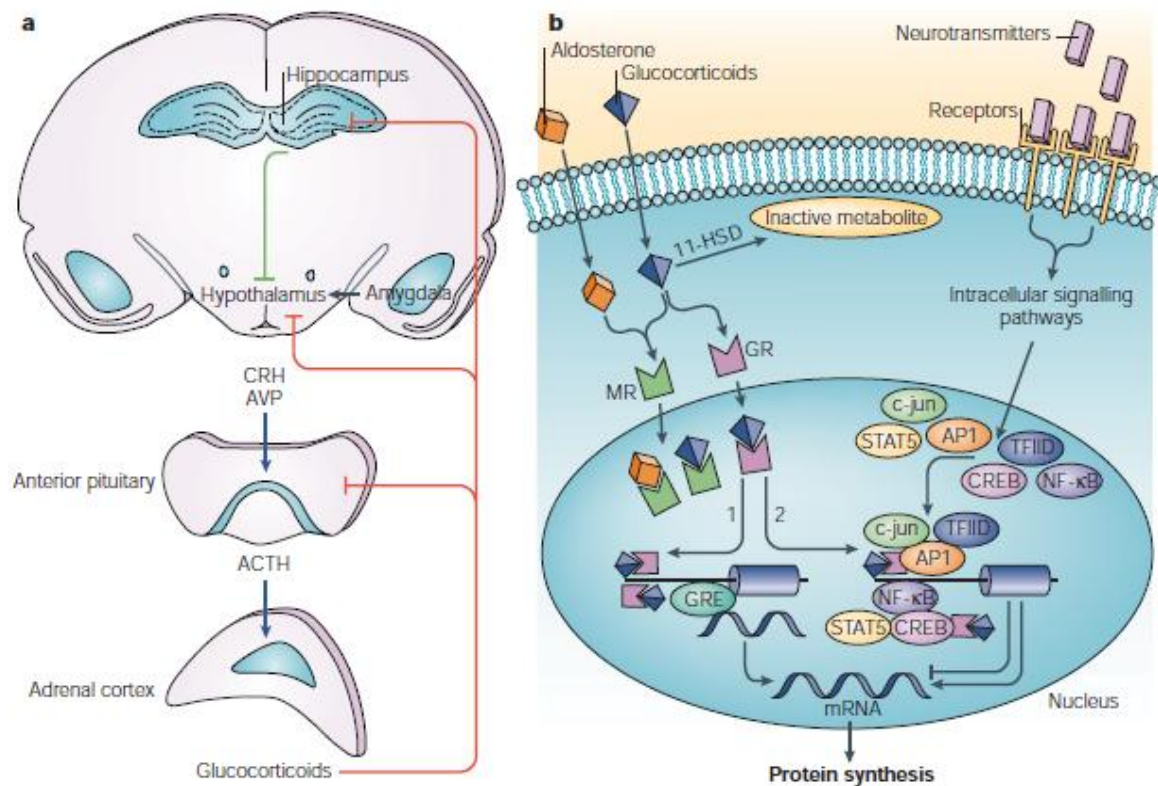


Figura 7. a) Muestra el eje HPA, su interacción con el hipocampo; b) procedimiento de unión de los glucocorticoides con el GR. Tomado de Sandi (2004).

La activación aguda del GR en el hipocampo afecta la excitabilidad neuronal y el metabolismo de la energía en cuestión de horas, mientras que la

activación crónica resulta en la atrofia de las dendritas de las neuronas piramidales. Ver figura 7.

Existe evidencia que indica que las múltiples isoformas de los GR se generan a partir de un único gen del mismo GR, estas isoformas tienen todos los patrones de distribución en tejidos únicos y perfiles reguladores de transcripción, cada uno es objeto de diversas modificaciones posteriores a la traducción que afectan a la función del receptor; por lo tanto, el aumento de la evidencia sugiere que las composiciones de isoformas de GR dentro de las células podrían determinar la respuesta específica de la célula a los glucocorticoides (Lu y Cidlowski, 2006). Ver figura 8.

Teniendo en cuenta la relevancia del aprendizaje aversivo, el estrés, los tipos de estresores, el almacenamiento de información, la extinción de la misma y las respuestas que desencadenan cada uno de estos procesos dentro del organismo, es preciso seguir realizando estudios novedosos que aborden estos factores, es importante aportar conocimiento dentro de esta línea de investigación. A la fecha no existe un trabajo reportado en el que se cuantifique la expresión del receptor a glucocorticoides en el hipocampo y su posible relación con el proceso de extinción de un aprendizaje aversivo que podría ser explicado como el olvido de un aprendizaje o la adquisición de una nueva experiencia. Es así que en este trabajo surge la necesidad de saber qué relación existe entre la expresión de GR a diversos tiempos y su relación con la intensidad de choque eléctrico empleado en la tarea de evitación inhibitoria.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe una relación entre el nivel de choque eléctrico administrado, a ratas entrenadas en una tarea de evitación inhibitoria, la extinción y la cantidad de GR expresado en el hipocampo?

OBJETIVOS

General

Estudiar el efecto de la intensidad del choque eléctrico utilizado durante el entrenamiento de ratas en la tarea de evitación inhibitoria sobre la concentración del receptor a glucocorticoides en el hipocampo y su efecto en la extinción de la tarea.

Específicos

- Determinar la concentración de GR en el hipocampo después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria mediada por distintos niveles de choque eléctrico, mediante la técnica de Western Blot.
- Medir la retención y extinción del aprendizaje de la tarea de evitación inhibitoria mediada por distintos niveles de choque eléctrico, mediante la observación conductual.

HIPÓTESIS

H1: Habrá una relación directa entre la intensidad del choque eléctrico empleado durante el entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria y la expresión del GR en el hipocampo de ratas.

H2: Habrá una relación directa entre la intensidad del choque eléctrico empleado en la tarea de evitación inhibitoria y/o la retención y la extinción de la tarea.

H3: Habrá una relación directa entre la expresión del GR en el hipocampo y la extinción en la tarea de evitación inhibitoria.

MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo experimental de la presente tesis fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM para el uso de animales experimentales acorde a las normas estipuladas en la “Guide for care and use of Laboratory animals” del NIH (ILAR, 1996).

Se llevó a cabo un experimento en una tarea de evitación inhibitoria, para determinar la extinción de la tarea a lo largo del tiempo y la cuantificación de la expresión del receptor a glucocorticoides en el hipocampo.

Sujetos

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso entre 250 y 300 g obtenidas de la colonia del bioterio de Instituto de Neurobiología, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las ratas se situaron en el bioterio del Laboratorio de Aprendizaje y Memoria; se mantuvieron en cajas de acrílico individuales con cama de aserrín, agua y comida *ad libitum*, con ciclo de luz-oscuridad de 12/12 h (luz encendida a las 7:00 h) y una temperatura constante de 21 ± 1 °C.

Grupos y tratamientos

Los sujetos fueron asignados al azar a cada uno de los cuatro grupos experimentales, los cuales fueron designados de acuerdo al choque eléctrico utilizado (0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mA). La mitad de las ratas de cada grupo fueron usadas para medir la retención y la extinción de la respuesta aprendida y la otra mitad fueron sacrificadas a distintos tiempos después del entrenamiento para medir la expresión del GR.

Las sesiones de entrenamiento, prueba, extinción y el sacrificio de los animales se llevaron a cabo entre las 8:00 y las 14:00 h para que todos los sujetos fueran comparables entre sí con respecto al momento del ciclo circadiano en el que se encontraban, controlando así esa variable.

Manipulación

Se realizaron 3 sesiones de manipulación en tres días consecutivos, las cuales consistieron en la familiarización sujeto-experimentador, donde el experimentador sentado, colocó una toalla sobre sus piernas y encima de ésta puso a la rata dándole masajes suaves sobre el dorso, durante 5 min.

Aparato de evitación inhibitoria

La cámara de condicionamiento consta de dos compartimientos del mismo tamaño (30 x 30 cm cada uno) separados por una puerta deslizable y construida de acrílico rojo transparente, ubicada en un cuarto oscuro sonoamortiguado. Un compartimiento llamado “de seguridad” está más iluminado que el otro (por luz incandescente de 10 W) y tiene una rejilla metálica en el piso con espacios de 16 mm. El otro compartimiento “de castigo” es oscuro y las paredes laterales son en forma de V, de acero inoxidable, las cuales llegan al piso del compartimiento (justo a la mitad del compartimiento) y tienen una distancia entre ellas de 15 mm. Estas paredes laterales pueden ser electrificadas por un estimulador de corriente constante (GRASS S48, U.S.A.). La duración de la aplicación de los estímulos, las latencias de entrada y de retención fueron medidas automáticamente con la ayuda de un cronómetro digital Scheider Electric S486. Ver Figura 8.



Figura. 8. Caja de evitación inhibitoria conectada al estimulador y el contador automático.

Sesión de entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria

Durante la sesión de entrenamiento, se colocó a la rata en el compartimiento iluminado, después de 10s se abrió la compuerta que separa ambos lados de la caja, se midió el tiempo en que la rata cruzó la puerta y pasó al compartimiento oscuro (latencia de entrada), en ese momento se cerró la compuerta y se aplicó un choque eléctrico durante 5s al final de los cuales la puerta se abrió y se contabilizó el tiempo que le tomó a la rata salir (latencia de escape).

Sesión de prueba

A las 48 horas después del entrenamiento, se realizó la prueba de retención, colocando a las ratas en la caja de evitación inhibitoria. En esta sesión se siguió el mismo procedimiento que durante el entrenamiento pero esta vez sin administrarse el choque eléctrico; si el animal no cruzó al segundo compartimiento dentro de 600 s se asignó un registro de latencia de retención de 600 y la sesión se dio por terminada y se regresó a la rata a su caja individual.

Extinción

A las 48 horas después de la sesión de entrenamiento, la mitad de las ratas de cada grupo fueron usadas para medir la latencia retención y la extinción de la tarea aprendida se registró cada 24 horas durante nueve días consecutivos, llevando a cabo el mismo procedimiento que el día de prueba, el cual fue tomado como la primera retención.

Cuantificación del Receptor a Glucocorticoides (GR)

La otra mitad de las ratas de cada grupo fue utilizada para la cuantificación del GR en el hipocampo. Esta determinación se realizó en sujetos que sólo fueron entrenados en la tarea de evitación inhibitoria con 0.0, 0.5, 1.0 ó 2.0 mA. Animales de cada grupo fueron sacrificados a los 30 minutos, 2h y 4h después del entrenamiento. Un grupo control adicional de sujetos que sólo se manipularon, se

incluyó para la medición del GR. El diagrama general del protocolo experimental se presenta en la figura 9.

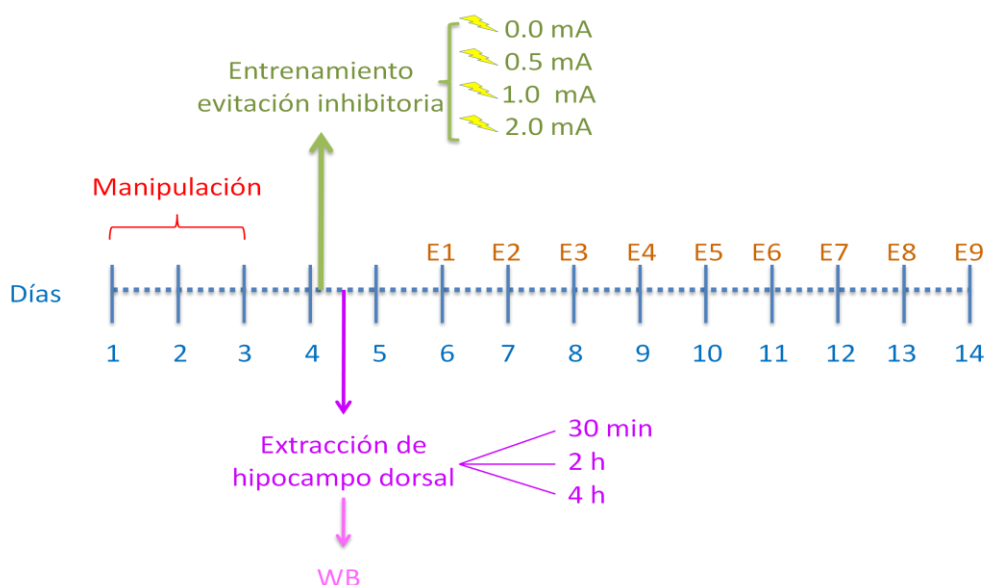


Figura 9. Diagrama general del protocolo experimental.

Western Blot

Inmediatamente después del sacrificio, el cerebro de los animales fue extraído y depositado en una matriz de disección para cerebro de rata. Con ayuda de navajas se diseccionó el área del hipocampo ubicado a partir de cortes coronales con base a Paxinos (2004). El tejido ya extraído se mantuvo en hielo y fue homogenizado con buffer de lisado RIPA 1x (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers MA, EUA) preparado con el inhibidor de proteasas COMPLETE. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm a 4°C durante 20 min. Se realizó una curva estándar de BSA usando el método de Bradford para poder determinar la concentración de proteína y tomar un volumen correspondiente a una concentración de 50µL de proteína total por muestra. A cada muestra se le añadió el reactivo Laemmli en un volumen equivalente al de la muestra.

Después se llevó a cabo la electroforesis utilizando gel de poliacrilamida al 10% (MiniPROTEAN TGX Precast Geles de 10 pozos BIO-RAD); como marcador de peso molecular se emplearon los estándares de 10-250 kD, Precision Plus Protein Kaleidoscope (BIO-RAD; CA, EUA) colocándolos en el primero y último pozo del gel. Como control positivo se utilizó un homogenado de hígado, mismo que se colocó en el segundo pozo del gel; los pozos del 3 al 9 fueron cargados con los homogenados de hipocampo previamente colocadas en baño maría. Una vez cargados todos los pozos del gel se le agregó el buffer de corrida (para 500 ml: TRIS 7.5, glicina 36g, SDS 2.5g, pH 8.3) y se corrió a 90V durante 2h.

Terminada la electrotransferencia, el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa utilizando buffer de transferencia (TRIS base 3.03g, glicina 14.4g, metanol 200ml); la cámara de transferencia se corrió a 25v, durante 30min. Posteriormente, la membrana fue colocada en una solución de bloqueo (leche descremada al 5% en TBST) durante 60min. Se le realizaron 3 lavados a la membrana durante 10 minutos cada uno con la solución de lavado TBST 1x (100nM TRIS, 2.5 M NaCl, pH 7.5), para después dejar incubando el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C (para el GR total se prepararon 10 μ l del GR (M-20) de Santa Cruz Biotechnology (1: 500 μ l); y 10 ml de α -tubulina (B-7) sc-5286 de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (1:1000) para el control de carga).

Se lavó la membrana y se colocaron 10 μ l del anticuerpo secundario (Alkaline Phosphatase Anti-Rabbit IgG (H+L) de Millipore® (1:5000 μ l)) manteniendo el sistema en agitación constante y a temperatura ambiente durante 2 h. Nuevamente se realizaron 3 lavados con PBST de 10 min c/u. Finalmente, para el revelado se utilizó el Kit AP Conjugate Substrate de Bio-Rad Laboratories® de acuerdo con las instrucciones del manual del fabricante. α tubulina fue usada como control de carga. Una vez reveladas las bandas, se escaneó la membrana y se analizó por densitometría utilizando el programa Image Lab (BIO-RAD).

Análisis estadístico

Entrenamiento y prueba.- Las latencias de entrada, escape y retención fueron analizadas con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para conocer si existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Para aquellos grupos que arrojaron diferencias significativas se realizó la prueba U de Mann-Whitney con el fin de observar entre cuáles grupos existía tal diferencia.

Extinción.- Los datos de las latencias de retención registrados durante los 9 días de extinción, se analizaron estadísticamente utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, empleando como prueba post-hoc la de U-Mann Whitney ($p > 0.05$) que permitió la comparación entre los grupos por día.

Western Blot.- Los resultados obtenidos en la densidad de la señal de cada banda del receptor a glucocorticoides, se analizaron con una prueba ANOVA de una vía y como prueba post-hoc se utilizó la de Bonferroni.

RESULTADOS

Adquisición, escape y Retención

Las latencias de entrada, escape y retención obtenidas en los grupos entrenados en la tarea de evitación inhibitoria con 0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mA se muestran en las Figuras 10 (A y B) y 11.

La prueba de Kruskal Wallis no arrojó diferencias significativas para las latencias de adquisición ($p = 0.1249$) y de escape ($p = 0.1880$). Las diferencias fueron significativas en la retención ($H(3) = 20.25$, $p = 0.0002$). La prueba post-hoc U de Mann-Whitney indicó que la retención de los grupos entrenados con 0.5, 1.0 y 2.0 mA fue superior a la del grupo entrenado con 0.0 mA ($p = 0.0401$, $p = 0.0002$ y $p = 0.0002$, respectivamente).

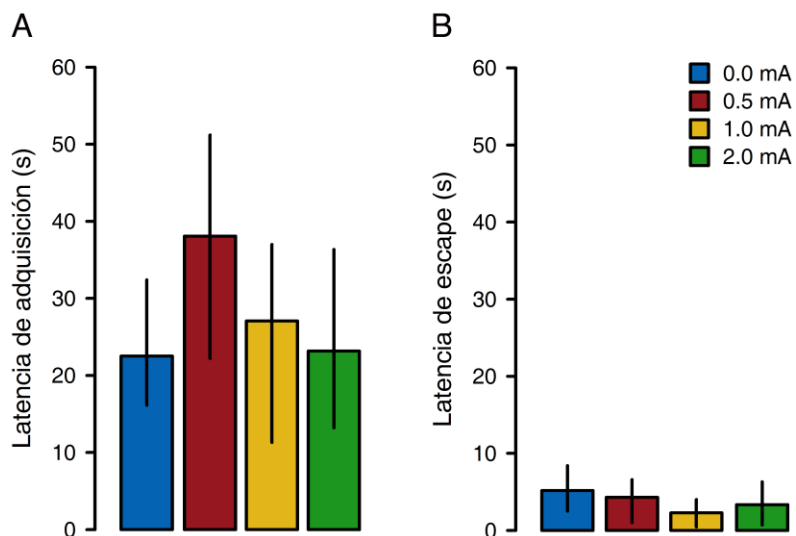


Figura 10. Los grupos entrenados con 0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mA no presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en las latencias de adquisición (A) ni en las de escape (B).

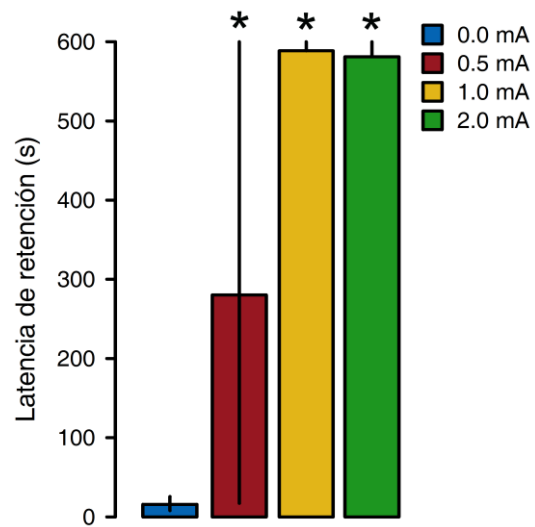


Figura 11. Las latencias de retención de los grupos entrenados con 0.5, 1.0 y 2.0 mA fueron significativamente diferentes de la retención del grupo de 0.0 mA (control) el cual fue sujeto al mismo procedimiento de entrenamiento, sólo que el choque eléctrico no se administró.

Extinción

El Análisis de varianza de Kruskal Wallis indicó diferencias significativas ($H(3) = 2.2599$, $p = 0.0001$) entre los 4 grupos sometidos a diferentes intensidades de choque eléctrico a lo largo de los 9 días de retención. La prueba post-hoc U de Mann-Whitney indicó diferencias significativas entre los grupos entrenados con 1.0 y 2.0 mA con respecto al grupo de 0.0 mA, así como diferencias significativas entre el grupo de 2.0 mA con respecto al grupo entrenado con 0.5 mA. La figura 11 muestra la curva de extinción de los grupos a lo largo de 9 días.

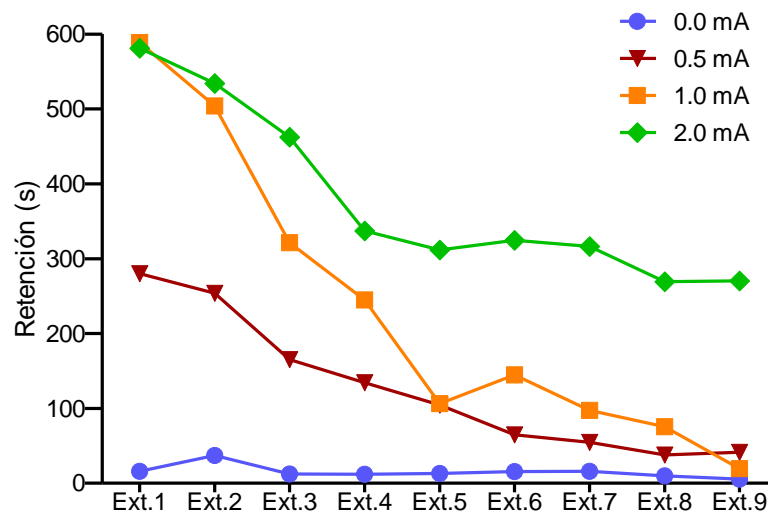


Figura 11. Media de las latencias de retención a través de las sesiones diarias de extinción (Ext.1-Ext.9) de los grupos entrenados en evitación inhibitoria con 0.5,1.0 ó 2.0 mA. También se muestra la latencia para pasar a través de los compartimientos de la cámara del grupo de 0.0 mA (control) el cual fue sujeto al mismo procedimiento de entrenamiento, sólo que el choque eléctrico no se administró. En la extinción 1 las retenciones de los grupos difieren significativamente excepto entre los grupos entrenados con 1.0 y 2.0 mA que presentaron los valores más altos de retención, y en la última extinción la retención del grupos entrenado con 2.0 mA fue significativamente más alta que el resto de los grupos.

Western Blot

Comparación de la concentración relativa de GR por nivel de choque eléctrico

La concentración relativa de GR se calculó a partir de los valores de carga de α -tubulina. A continuación se muestran los resultados cuando este parámetro se determinó a los 30 minutos, 2 ó 4 horas y se analizan en función de cada una de las intensidades de choque eléctrico. Los niveles de GR de cada grupo se compararon entre sí y con los niveles del grupo intacto, que sólo fue manipulado pero no se entrenó.

Grupos entrenados con 0.0 mA

Al analizar los niveles de GR cuando los grupos se entrenaron con 0.0 mA la ANOVA indicó que no se presentaron diferencias significativas ($p = 0.6946$). Sin embargo, se puede observar que aun cuando el estadístico muestra que la expresión del GR no fue diferente en la ventana de tiempo examinada, la concentración relativa de GR presenta una tendencia a incrementarse a las 2h.

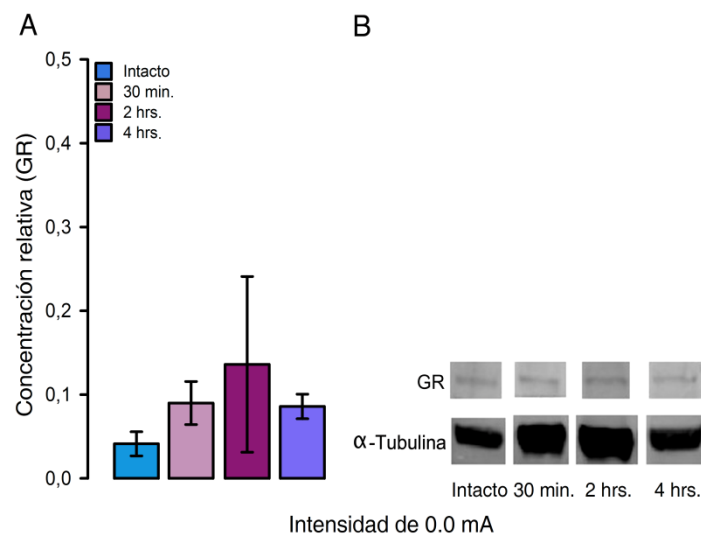


Figura 12. A. Representa la concentración relativa del GR dentro de los grupos entrenados con 0.0 mA en la tarea de evitación inhibitoria. B muestra la concentración del GR y el control de carga α tubulina, en las membranas de Western Blot.

Grupos entrenados con 0.5 mA

La ANOVA indicó diferencias significativas entre los grupos entrenados con 0.5 mA $F(3,11) = 13.89$, $p = 0.0015$ y la prueba post-hoc de Newman-Keuls señaló que el nivel de GR a los tiempos de 30 min, 2 h y 4 h fue significativamente superior al del grupo intacto.

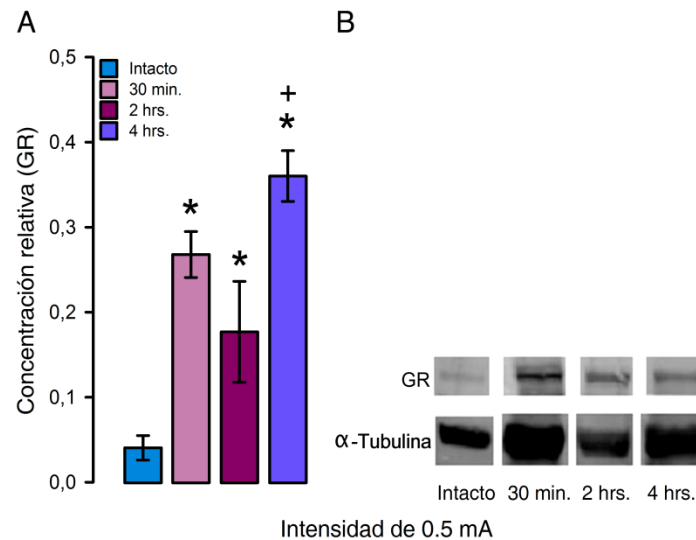


Figura 13. A. Representa la concentración relativa del GR dentro de los grupos entrenados con 0.5 mA en la tarea de evitación inhibitoria. B muestra la concentración del GR y el control de carga α -tubulina en las membranas de western blot. (*) Diferencias significativas con respecto al grupo intacto. (+) diferencia significativa con respecto al grupo sacrificado a las 2 hrs.

Estos datos nos indican que en los grupos entrenados en la tarea de evitación inhibitoria con un choque eléctrico de 0.5 mA existe un aumento significativo de la expresión del GR y este aumento fue mayor a las 4 h.

Grupos entrenados con 1.0 mA

La ANOVA marcó una diferencia significativa entre los grupos entrenados con 1.0 mA $F(3,11) = 6.668$, $p = 0.014$. La prueba post-hoc de Newman-Keuls indicó diferencia entre la concentración de GR medida a los 30 min y a las 2 h con respecto a la concentración del GR del grupo intacto.

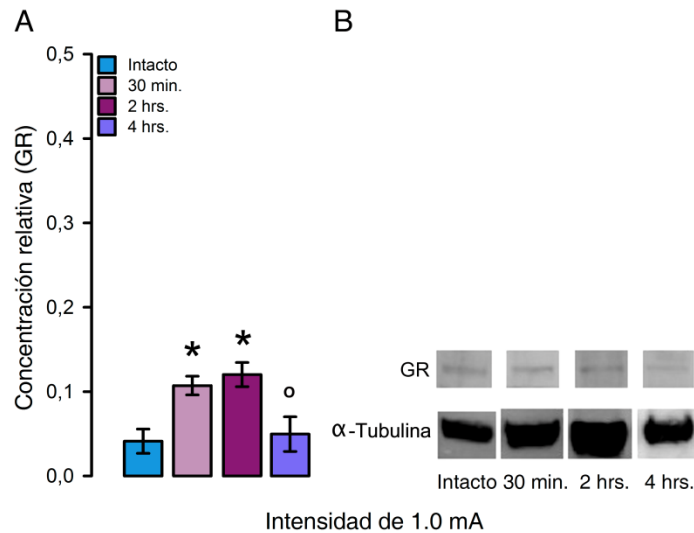


Figura. 14. A representa la concentración del GR dentro de los grupos entrenados con 1.0 mA en la tarea de evitación inhibitoria. (*) indica diferencias significativas con respecto al grupo intacto, (°) diferente significativamente de los grupos sacrificados a los 30 minutos y 2 horas. B Concentración del GR y el control de carga α -tubulina en la membrana de WB.

Existe un aumento significativo de la expresión del GR a los 30 minutos y a las 2 horas. La concentración de GR a las 4 horas es significativamente menor con respecto a la concentración encontrada a los 30 minutos y a las 2 horas.

Grupos entrenados con 2.0 mA

La prueba ANOVA indicó diferencias significativas entre estos grupos entrenados a 2.0 mA $F(3,11) = 6.569$, $p = 0.0150$. La prueba post-hoc de Newman-Keuls reveló diferencias entre la concentración de GR en los grupos evaluados a los 30 min, 2 h y 4 h.

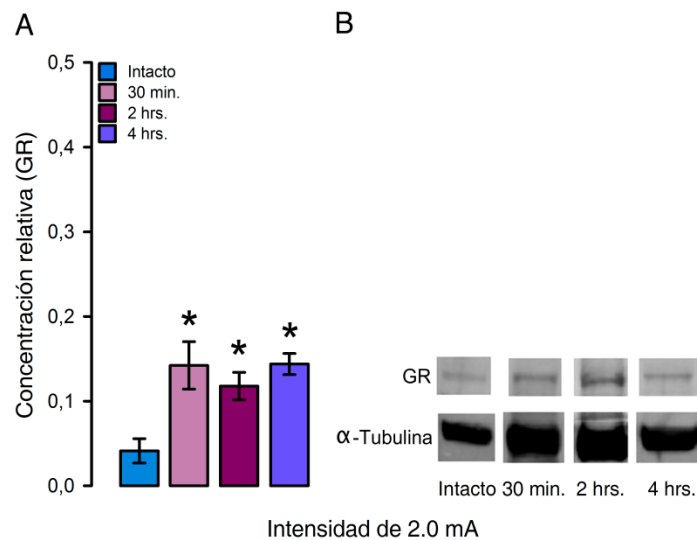


Figura. 15. A representa la concentración del GR dentro de los grupos entrenados con 2.0 mA en la tarea de evitación inhibitoria. (*) indica diferencias significativas con respecto al grupo intacto. B Concentración del GR y el control de carga α -tubulina en la membrana de WB.

Estos datos nos sugieren que en el choque eléctrico de 2.0 mA se presenta un aumento de la expresión de GR que se mantiene constante a los 30 min, 2 y 4 h.

Comparación de la concentración relativa de GR por tiempo

La concentración relativa de GR se calculó a partir de los valores de carga de α -tubulina. A continuación se muestran los resultados cuando este parámetro se determinó con niveles de 0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mA y se analizan en función del tiempo post-entrenamiento (30 min, 2 y 4 h). Los niveles de GR de cada grupo se compararon entre sí y con los niveles del grupo intacto, que sólo fue manipulado pero no se entrenó.

Medición del GR a los 30 minutos

El estadístico ANOVA marcó diferencia entre grupos $F(4,14) = 14.76$, $p = 0.0003$. La prueba post-hoc de Newman-Keuls mostró un aumento significativo en el nivel de GR en los sujetos entrenados con 0.5 mA con respecto a los entrenados con las demás intensidades (0.0, 1.0 y 2.0 mA), el grupo entrenado con 2.0 mA es diferente significativamente del grupo intacto.

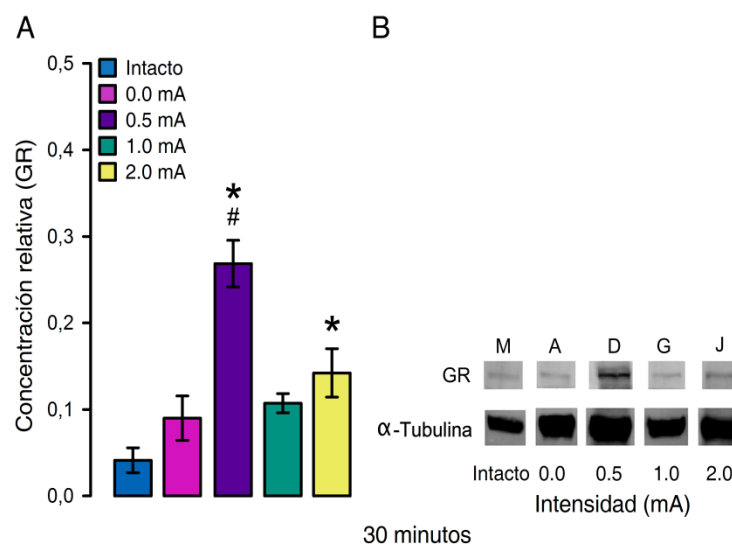


Figura. 16. A representa la concentración del GR a los 30 minutos en los grupos entrenados con diferentes intensidades de choque. (*) indica diferencias significativas con respecto al grupo intacto. (#) indica grupo significativamente diferente de los otros grupos. B Concentración del GR y el control de carga α -tubulina en la membrana de WB.

El estadístico ANOVA no arrojó diferencias significativas entre el grupo entrenado a 1.0 mA comparado con el grupo intacto, pero la prueba t sí arrojó diferencia significativas entre los grupos $p = 0.110$.

Medición del GR a las 2 horas.

La prueba ANOVA no indicó diferencias entre grupos $p = 0.549$, pero la prueba t demostró diferencias en el grupo de 0.5 mA ($p = 0.0446$), 1.0 mA ($p = 0.0089$) y 2.0 mA ($p = 0.0122$).

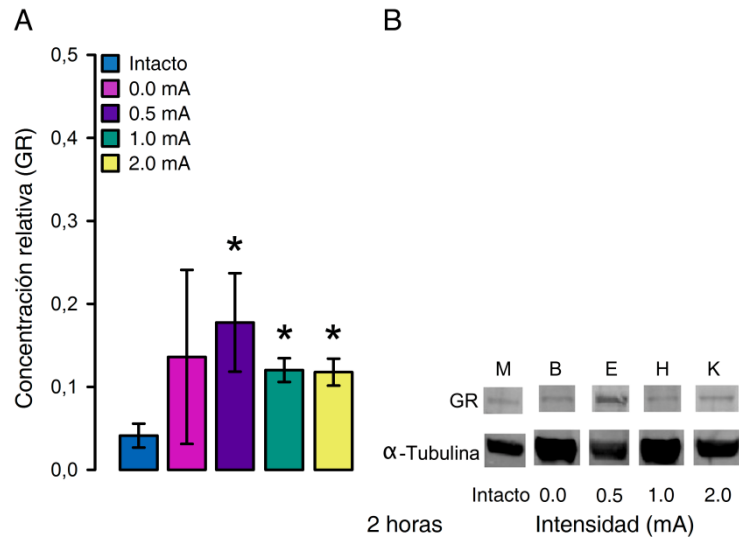


Figura. 17. A representa la concentración del GR a las 2 horas en los grupos entrenados con diferentes intensidades de choque eléctrico. (•) indica diferencias significativas con respecto al grupo intacto. B Concentración del GR y el control de carga α -tubulina en la membrana de WB.

Medición del GR a las 4 horas.

A las 4 horas después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria, se midió la concentración del GR en aquellos grupos sometidos a diferentes intensidades de choque eléctrico (0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mA) y fueron comparados con las concentración del grupo intacto. La prueba ANOVA encontró diferencias entre los grupos $F(4,14) = 46.01$, $p = 0.0001$. La prueba post-hoc de Newman-Keuls localizó diferencias en la concentración de GR de aquellos grupos entrenados a **0.5 y 2.0 mA** en comparación con los demás grupos.

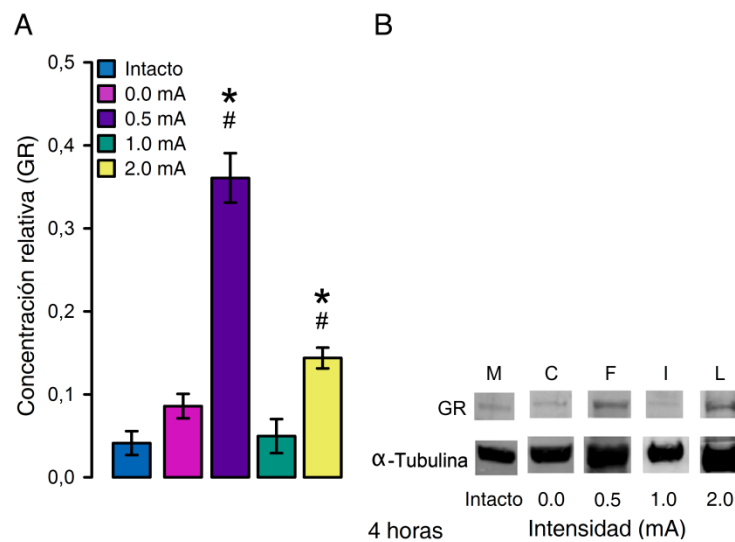


Figura. 18. A representa la concentración del GR a las 4 horas en los grupos entrenados con diferentes intensidades de choque. (*) indica diferencias significativas con respecto al grupo intacto.(#) indica grupo significativamente diferente de los otros grupos. B Concentración del GR y el control de carga α -tubulina en la membrana de WB.

DISCUSIÓN

Extinción

Tras haber medido las latencias de retención de la tarea a lo largo de las 9 sesiones de extinción, los resultados conductuales obtenidos indican que las ratas entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria con diferente intensidad de choque eléctrico (0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mA) presentan variaciones en las retenciones; en el primer día los grupos difieren entre sí, excepto entre los grupos entrenados con 1.0 y 2.0 mA que presentaron los valores más altos de retención, y en el último día el grupo entrenado con 2.0 mA difirió del resto de los grupos. De manera que a mayor nivel de choque eléctrico, las ratas presentan una mayor resistencia a la extinción, este fenómeno ya ha sido reportado en otras investigaciones (Garín-Aguilar et al., 2012), por lo que los datos obtenidos en nuestro caso complementan la literatura que evidencia que aquellos estímulos aversivos de mayor intensidad (en este caso 1.0 y 2.0 mA) fortalecen el aprendizaje así como la consolidación.

Cuantificación del receptor a glucocorticoides

Se sabe que ante situaciones que ocasionan estrés el receptor a glucocorticoides participa en la regulación de los mecanismos del organismo para restablecer la homeostasis, dicho receptor tiene gran presencia en el hipocampo (Kemp y Manahan-Vaughan 2008). En el presente trabajo se tomó en cuenta la expresión del GR en el hipocampo dorsal del grupo "íntacto" (no entrenado) como la concentración basal, con base a esta se comparó la concentración del GR presentada en los demás grupos. Se observó que la expresión de GR en el hipocampo dorsal, aumenta de forma significativa en aquellos grupos entrenados con 0.5, 1.0 y 2.0 mA; por otro lado el grupo entrenado sin choque (0.0 mA) no presenta cambios. Estos datos se relacionan con lo reportado por diversas investigaciones que muestran que ante una situación de estrés los niveles de corticosterona se elevan; y la expresión y activación del GR se incrementa (De

Kloet et al 1998, Dallman 2005 y Sandi 2001), lo cual era de esperarse puesto que aquellos grupos entrenados con 0.5, 1.0 y 2.0 mA fueron expuestos ante un estímulo estresante (choque eléctrico).

El grupo entrenado con 1.0 mA tiene un incremento en la concentración de GR a los 30 min y a las 2 h pero, decae a las 4 h donde presenta el mismo nivel basal que el grupo intacto. Por su parte al grupo que se le administró 2.0 mA mantiene elevado el nivel de GR en la ventana temporal registrada (30 min, 2 y 4h). En estos resultados puede observarse el papel de la autorregulación del GR a través de sus mecanismos de acción, se sabe que el GR presenta isoformas que regulan su función, y que pueden contribuir a su traslocación y transcripción (isoforma GR α) o por el otro lado pueden inhibirla (isoforma GR β) (Necela y Cidlowski 2004; Vandevyver et. al, 2011).

Sin embargo la concentración de GR registrada (a los 30 min, 2 y 4 h) del grupo entrenado con 0.5 mA presenta un incremento muy marcado en comparación con los otros grupos (intacto, 0.0, 1.0 y 2.0 mA). Cabe la posibilidad de que la diferencia significativa que presenta el grupo de 0.5 mA en la expresión del GR, con respecto a los niveles de 1.0 y 2.0 mA esté relacionado con los tiempos de acción del GR dependientes de la regulación de los glucocorticoides, los cuales pueden ser rápidos ante niveles altos de estrés o lentos ante niveles más bajos. Se ha reportado la rapidez de los efectos de los glucocorticoides (de milisegundos a minutos) particularmente en el cerebro, la conducta y la regulación del HPA, se sabe que estos efectos podrían requerir o no, de la mediación del GR, es decir, esta regulación rápida no es mediada por de glucocorticoides mecanismos genómicos habituales, (Dallman, 2005), en otras investigaciones se ha relacionado la participación de la señalización endocannabinoide en este efecto (Evanson et. Al 2010).

Con estos resultados es posible inferir que el entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria mediada por choque eléctrico, induce un aumento en la concentración del GR en el hipocampo, existe también la posibilidad de que este aumento en la concentración de GR sea dependiente de la regulación rápida o

lenta de los glucocorticoides sobre el eje HPA. No obstante establecer los tiempos de reacción del GR, su regulación y mecanismos de acción, es muy complicado, ya que está es dependiente de múltiples factores como la regulación génica, condiciones translocacionales, participación de co-factores y moléculas; además estas acciones también difieren entre tejidos y organismos (Necela y Cidlowski, 2004; Vandevyver et. al 2011; Sandi 2001; y Lu y Cidlowski, 2006).

Sin embargo, con estos datos no es posible saber si la retención de la tarea presenta una relación directa con la concentración del GR en el hipocampo, puesto que la concentración del GR en el grupo entrenado con 0.5 mA aumenta notablemente en comparación con los otros grupos, y no es consistente con su desempeño en la prueba de extinción, además cabe la posibilidad de que el tiempo de reacción de los glucocorticoides se haya presentado desde antes de los 30 min.

Los resultados obtenidos en esta investigación, pueden ser de utilidad para elaborar nuevas interrogantes y experimentaciones relacionadas con el papel de la acción del GR dependiente del tiempo y estímulo, así como su influencia en los procesos cognitivos de aprendizaje y memoria; como podría ser el caso del efecto protector y el sobrerreforzamiento, en los cuales se han relacionado sus efectos con estímulos de gran intensidad y fuerza.

CONCLUSIONES

- En la tarea de evitación inhibitoria los grupos a los cuales se les aplicó diferentes intensidades de choque eléctrico, tienen la misma latencia adquisición y escape pero difieren en la retención y en el proceso de extinción de la tarea. La resistencia a la extinción es mayor en aquellos grupos que recibieron las descargas eléctricas más altas (1.0 mA y 2.0 mA).
- Después de empleado el estímulo aversivo en la tarea de evitación inhibitoria, la concentración de GR en el hipocampo dorsal aumenta, con respecto al grupo intacto, y se mantiene a lo largo del tiempo (30 minutos, 2 y 4 horas) tras haber recibido el choque eléctrico (0.5 mA, 1.0 mA ó 2.0 mA).
- El grupo entrenado con 0.5 mA es el que más aumento de la expresión de GR presenta.
- La concentración del GR en el grupo que fue sometido a la tarea pero que no recibió choque eléctrico (0.0 mA) no difiere significativamente de la concentración de GR del grupo intacto, pero presenta un aumento porcentual.

PERSPECTIVAS

- Bajo las mismas condiciones experimentales, cuantificar el GR fosforilado para conocer cuánto de este se encuentra activado.
- Realizar otro grupo en la tarea de evitación inhibitoria aplicando un nivel de choque eléctrico más alto (3.0 mA), para establecer si la concentración de GR total se mantiene o decae.
- Con estas mismas intensidades cuantificar la concentración de GR en otras estructuras cerebrales.
- Entrenar a los sujetos con las mismas condiciones experimentales y agregar una tarea espacial posterior para establecer si la retención de esta puede relacionarse con la expresión de GR registrado.

BIBLIOGRAFÍA

- Bermúdez-Rattoni, F., Quirarte, G., & Prado-Alcalá, R. A. (2001). Pavlov y sus perros. En F. Bermúdez-Rattoni & R. A. Prado-Alcalá (Eds.), *Memoria ¿En dónde está y cómo se forma?* (pp. 71-84). México, D.F.: Trillas.
- Bower, G.H., & Hilgard, E.R. (2011). Teorías de aprendizaje. México: Editorial Trillas.
- Broadbent, N. J., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(40), 14515-14520.
- de Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., & Joëls, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews*, *19*(3), 269-301.
- Dorey, R., Pierard, C., Shinkaruk, S., Tronche, C., Chauveau, F., Baudonnat, M., & Beracochea, D. (2011). Membrane mineralocorticoid but not glucocorticoid receptors of the dorsal hippocampus mediate the rapid effects of corticosterone on memory retrieval. *Neuropsychopharmacology*, *36*(13), 2639-2649.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology*, *55*, 51-86.
- Garin-Aguilar, M. E., Diaz-Cintra, S., Quirarte, G. L., Aguilar-Vazquez, A., Medina, A. C., & Prado-Alcala, R. A. (2012). Extinction procedure induces pruning of dendritic spines in CA1 hippocampal field depending on strength of training in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *6*, 12.
- Gehring, U. (1993). The structure of glucocorticoid receptors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *45*(1-3), 183-190.
- González-Cabanach, R. (1995). Modelos de aprendizaje. En J. Beltrán & J. Bueno (Eds.), *Psicología de la educación* (pp. 287-306). Barcelona.: Editorial Boixareu Universitaria.

- Herman, J. y Spencer, R. (1998). Regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene transcription and protein expression in vivo. *The journal of Neuroscience*, 18, 18, 7462-7473.
- ILAR. (1996). *Guide for the care and use of laboratory animals* Washington, DC: National Academy Press.
- Joseph-Bravo, P., & De Gortari, P. (2007). El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. *Biotecnología*, 14, 65-76.
- Kandel, E. R. (2007). *En busca de la memoria: el nacimiento de una nueva ciencia de la mente* Buenos Aires: Katz Editores.
- Kesner, R. P., & Martinez, J. L., Jr. (2007). *Neurobiology of learning and memory*. En. USA: Academic Press.
- Kitabatake, Y, Sailor, K., Ming G., Song H. (2007). Adult Neurogenesis and hippocampal memory function: new cells, moreplasticity, new memories? *Neurosurgery clinics of north America*. 18,105-113.
- Koolman, J., & Röhm, K. (2004). *Bioquímica. Texto y Atlas* (3ra ed.) Argentina: Editorial Medica Panamericana.
- Lu, N. Z., & Cidlowski, J. A. (2006). Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends in Cell Biology*, 16(6), 301-307.
- McAuley, M. T., Kenny, R. A., Kirkwood, T. B., Wilkinson, D. J., Jones, J. J., & Miller, V. M. (2009). A mathematical model of aging-related and cortisol induced hippocampal dysfunction. *BMC Neuroscience*, 10, 26.
- McDonald R.and White N. (1993). A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience*. Vol. 107, No 1, 3-22.
- McEwen, B. S., Sakai, R. R., & Spencer, R. L. (1993). Adrenal steroid effects on the brain: Versatile hormones with good and bad effects. En J. Schulkin (Ed.), *Hormonally Induced Changes to the Mind and Brain* (pp. 157-189). Oxford: Academic Press.
- McGaugh, J. L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science*, 153(742), 1351-1358.

- McGaugh, J. L. (1973). *Learning and memory: An introduction*. San Francisco: Albion Publishing Company.
- McGaugh, J. (2000). Memory- a Century of consolidation. *Science*. Vol. 287, pag 248-251.
- McGaugh, J. L. (2013). Making lasting memories: remembering the significant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 Suppl 2, 10402-10407.
- Melmed S., Polonsky, K Larsen R. y Kronenberg, H. (2003). Williams Textbook of endocrinology. ELSEVIER
- Mendoza, G. M. (2002). Aprendizaje, atencion. En L. A. Téllez (Ed.), *Aprendizaje y Memoria: Aspectos Psicobiologicos*. México: Trillas.
- Morsink, M. C., Steenbergen, P. J., Vos, J. B., Karst, H., Joels, M., De Kloet, E. R., & Datson, N. A. (2006). Acute activation of hippocampal glucocorticoid receptors results in different waves of gene expression throughout time. *Journal of Neuroendocrinology*, 18(4), 239-252.
- Necela, B. M., & Cidlowski, J. A. (2003). Crystallization of the human glucocorticoid receptor ligand binding domain: a step towards selective glucocorticoids. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(2), 58-61.
- Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(5), 1033-1044.
- Paxinos, G.; Watson, C. the rat brain in stereotaxic coordinates. 5a ed. Gulf Professional Publishing, 2004, 166 páginas. ISBN 0120884720, 9780120884728
- Prado-Alcalá, R. A., Cobos-Zapiaín, G., Salado-Castillo, R., Quiroz Molina, C. R., Garin-Aguilar, M. E., Díaz, A., . . . Quirarte, G. (2006). El aprendizaje incrementado protege a la memoria contra tratamientos amnésicos. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, 32, 203-218.
- Pujols, L., Mullol, J., Roca-Ferrer, J., Torrego, A., Xaubet, A., Cidlowski, J. A., & Picado, C. (2002). Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-

- isoforms in human cells and tissues. *American Journal of Physiology*, 283(4), C1324-1331.
- Ramon y Cajal, S. (1899). *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados* Madrid: Imprenta y Librería de Nicolás Moya.
- Rosenzweig, M. R., & Leiman, A. I. (2003). *Psicología fisiológica* Madrid, España: McGraw-Hill.
- Rueda-Orozco, P. E., Montes-Rodríguez, C. J., Soria-Gómez, E., Solis-Herrera, A., Guzmán, K., Prospéro-García, A., . . . Prospéro-García, O. (2006). Dependencia de los sistemas de memoria al ciclo luz-oscuridad en la expresión de estrategias adaptativas. Primera parte. *Salud Mental*, 29(4), 18-26.
- Sampedro-Piquero, P., Begega, A., & Arias, J. L. (2014). Increase of glucocorticoid receptor expression after environmental enrichment: Relations to spatial memory, exploration and anxiety-related behaviors. *Physiology & Behavior*, 129, 118-129.
- Sandi, C. (1998). The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage. *Neural Plasticity*, 6(3), 41-52.
- Sandi, C. (2004). Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(12), 917-930.
- Sandi, C., Venero, C., & Cordero, M. (2001). *Estres, memoria y trastornos asociados. Implicaciones en el daño cerebral y el envejecimiento* España: Editorial Ariel.
- Sherwood, L. (2001). *Human physiology: from cells to systems*: Brooks/Cole.
- Sperling, A. P. (2004). *Psicología simplificada* México: Selector S.A. De C.V.
- Squire, L. R. (1987). The organization and neural substrates of human memory. *International Journal of Neurology*, 21-22, 218-222.
- Squire L. y Kandel E. (2000). *Memory. From mind to molecules*. Scientific American Library. New York.
- Sweatt, J. D., & McKnight, E. (2010). *Mechanisms of Memory* San Diego: Academic Press.

- Téllez, A. (2005). La memoria. En L. A. Téllez (Ed.), *Aprendizaje y Memoria: Aspectos Psicobiológicos* (pp. 69-104). México: Trillas.
- Zalachoras, I., Grootaers, G., van Weert, L. T., Aubert, Y., de Kreij, S. R., Datson, N. A., . . . Meijer, O. C. (2013). Antisense-mediated isoform switching of steroid receptor coactivator-1 in the central nucleus of the amygdala of the mouse brain. *BMC Neuroscience*, 14, 5.