



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología



**ADMINISTRACIÓN POST-ENTRENAMIENTO DE CORTICOSTERONA EN LAS
REGIONES DORSOLATERAL Y DORSOMEDIAL DEL ESTRIADO DE LA RATA
EN UNA TAREA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO AL CONTEXTO**

TESIS INDIVIDUAL

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Biología

Presenta:

Alejandro Reyes De la Torre

Dirigido por:

Dra. Gina Lorena Quirarte

Tutor:

Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos

SINODALES

Dra. Gina Lorena Quirarte
Presidente

Firma

Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos
Secretario

Firma

Dr. Roberto A. Prado Alcalá
Vocal

Firma

Dr. Isaac Silva Barrón
Suplente

Firma

Biól. Jaime Ángeles Ángeles
Director de la Facultad

Dr. Luis Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Mayo 2010
México

BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

No. Adq.	H74126
	TS
Clas.	573.8
	R457a

RESUMEN

La plasticidad neuronal así como las interacciones entre hormonas y sistemas cerebrales regulan el almacenamiento de la memoria a largo plazo. Las hormonas del estrés (epinefrina, norepinefrina y glucocorticoides) están involucradas en la consolidación de las memorias emocionales. La corticosterona es un glucocorticoide involucrado en los sistemas de la consolidación por medio de su unión a receptor (GR) en regiones cerebrales como la amígdala, hipocampo y estriado. Un modelo de estudio de memorias emocionales es el condicionamiento de miedo al contexto (CMC), un condicionamiento clásico donde se asocia un estímulo neutral (Estímulo condicionado, EC; p. ej. un ambiente distintivo) con un estímulo adverso (Estímulo incondicionado, EC; p. ej. un choque eléctrico) y se obtiene una respuesta condicionada (RC) de congelamiento. El estriado es un componente de los ganglios basales que participa en el control del movimiento y la consolidación de memorias emocionales. En el aprendizaje, el estriado puede dividirse en dos regiones funcionales involucradas en procesos distintos, el estriado dorsolateral (DL) relacionado al aprendizaje de procedimiento y el estriado dorsomedial (DM) involucrado en tareas de discriminación simple. En el presente estudio, ratas de la cepa Wistar fueron entrenadas en la tarea del CMC. Los dos primeros experimentos validaron las condiciones experimentales del CMC al administrar un choque eléctrico (EI) y posteriormente suministrarlo a diferentes tiempos. El tercer experimento consistió en la administración post-entrenamiento de dosis de corticosterona en las regiones DL y DM del estriado para evaluar si existía facilitación y una participación diferencial de estas dos áreas en la consolidación. Los resultados del experimento 1 y 2 muestran que existe un mayor índice de inactividad en las ratas que recibieron choque eléctrico, sin embargo, el tiempo al que se aplicó el primer choque (1, 3 o 5 min) no influyó en la consolidación. En el experimento 3 no se observó un efecto de facilitación al administrarse corticosterona en estriado DL o DM, por lo que la activación de los receptores a glucocorticoides en estas dos áreas del estriado, sugieren que no está relacionada con procesos neuronales involucrados en esta tarea.

(Palabras clave: corticosterona, condicionamiento de miedo al contexto, estriado dorsomedial, estriado dorsolateral)

SUMMARY

Neural plasticity, as well as interactions between hormones and brain systems regulates long-term memory storage. Stress hormones (epinephrine, norepinephrine and glucocorticoids) are involved in emotional memory consolidation. Corticosterone is a glucocorticoid involved in consolidation systems by binding to its receptor (GR) in brain regions such as the amygdala, hippocampus and striatum. Contextual fear conditioning (CFC) is a model of emotional memory, a classical conditioning task where a neutral stimulus (CE, e.g. a distinctive environment) is associated with an aversive stimulus (UCS, e.g. an electric shock) to produce behavioral freezing as a conditioned response (CR). The striatum is a component of the basal ganglia. It participates in the control of movement and in consolidation of emotional memory. Regarding learning, the striatum can be subdivided into two functional regions, involved in different processes; dorsolateral striatum (DL) related to procedural learning and dorsomedial striatum (DM) involved in simple discrimination tasks. In the present study, Wistar rats were trained in the CFC paradigm. The first two experiments validated CMC experimental conditions by delivering a series of electric shocks (UCS) at different times after the beginning of the training session (1, 3 or 5 min). In the third experiment, different doses of corticosterone were administered post-training into DL and DM to evaluate if there would be facilitation of CFC, and to look for a potential differential participation of these two areas in consolidation. Results of experiments 1 and 2 demonstrate a high inactivity score (freezing), regardless of the time where the first shock was applied. In experiment 3 there was no facilitation of CFC by corticosterone administration to DL or DM. These data suggest that activation of glucocorticoid receptors in these two striatal regions is not implicated in the neural processes involved in this task.

(Key words: corticosterone, contextual fear conditioning, dorsomedial striatum, dorsolateral striatum)

**A mis padres,
A Oliva**

Por su apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

En la elaboración de esta tesis se recibió el apoyo material y de espacios del laboratorio B-04 Aprendizaje y Memoria y el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Juriquilla.

En particular agradezco la paciencia y dedicación de la Dra. Gina Lorena Quirarte y el Dr. Roberto A. Prado Alcalá, la excelente asistencia técnica y logística de la MVZ. Norma Serafín López, Andrea Cristina Medina Fragoso, el Sr. Ángel Méndez Olalde y la camaradería de mis compañeros estudiantes del laboratorio.

Se agradece el apoyo económico de PAPIIT-UNAM (IN216708 e 208110) y CONACYT.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por mi formación académica.

Al Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos por sus excelentes asesorías en la elaboración de esta tesis. A todos mis maestros y amigos de la Licenciatura en Biología por su compañía y guía en esta etapa de mi vida.

A mis padres por su cariño, por creer en mí y apoyarme en todo momento. A Oliva por su invaluable amor y compañía.

"Siento, luego existo."
Milan Kundera

ÍNDICE

	Página
Resumen	ii
Summary	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Índice	vii
Índice de Figuras	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 El estudio del aprendizaje y la memoria	3
2.1.1 Clasificación de la memoria	3
2.2 Memorias emocionales	5
2.3 Memoria y plasticidad neuronal	6
2.4 Modulación de la memoria	9
2.5 Las hormonas del estrés	10
2.5.1 Glucocorticoides	11
2.6 Condicionamiento clásico	13
2.6.1 Condicionamiento de miedo al contexto	14
2.7 El estriado	17
2.7.1 Citología del estriado	19
2.7.2 El estriado y el aprendizaje	20
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
IV. HIPÓTESIS	25
V. OBJETIVOS	26
VI. METODOLOGÍA	27
6.1 Metodología general	27
6.1.1 Sujetos	27
6.1.2 Manipulación	27

6.1.3 Aparatos	28
6.1.4 Datos	28
6.2 Experimento 1	28
6.2.1 Grupos y tratamientos	29
6.2.2 Entrenamiento del CMC	29
6.2.3 Análisis estadístico	29
6.3 Experimento 2	30
6.3.1 Grupos y tratamientos	30
6.3.2 Entrenamiento del CMC	30
6.3.3 Análisis estadístico	31
6.4 Experimento 3	31
6.4.1 Cirugía	31
6.4.2 Preparación de fármacos	32
6.4.3 Grupos y tratamientos	32
6.4.4 Entrenamiento del CMC	33
6.4.5 Histología	33
6.3.9 Análisis estadístico	34
VII. RESULTADOS	35
7.1 Experimento 1	35
7.1.1 Resultados conductuales	35
7.2 Experimento 2	37
7.2.1 Resultados conductuales	37
7.3 Experimento 3	40
7.3.1 Histología	40
7.3.2 Resultados conductuales	41
VIII. DISCUSIÓN	46
IX. BIBLIOGRAFÍA	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Las etapas de la memoria se pueden representar al graficar la retención de una conducta a través del tiempo.	4
2. Esquema de una sinapsis entre una neurona presináptica y una postsináptica.	8
3. Niveles en plasma de corticosterona en ratas macho (cepa Wistar).	12
4. En el entrenamiento del CMC se coloca al animal en un ambiente novedoso y se suministra un estímulo adverso.	15
5. Localización del estriado en un corte coronal de cerebro humano y microfotografía de un corte coronal teñido con acetilcolinesterasa del estriado humano.	18
6. Localización de las áreas dorso medial (DM) y dorsolateral (DL) en el estriado (CPu) de la rata en un corte coronal (bregma 0.70 mm) de cerebro.	21
7. Línea de tiempo del entrenamiento.	30
8. Tiempo en inactividad por minuto de los grupos sin choque (CI, 0 mA) y con choque (CC, 0.6 mA) durante el entrenamiento y la prueba a las 48 horas del condicionamiento de miedo al contexto (CMC). Los datos se expresan como la media \pm Error Estándar de la Media (EEM).	35
9. Tiempo en inactividad de los grupos sin choque (CI, 0 mA, n=6) y con choque (CC, 0.6 mA, n=6) durante el minuto once del entrenamiento del CMC. Los datos se expresan como la media \pm EEM.	36
10. Tiempo en inactividad de los grupos sin choque (CI, 0 mA, n=6) y con choque (CC, 0.6 mA, n=6) durante los primeros tres minutos de la prueba de retención a las 48 horas del CMC. Los datos se expresan como la media \pm EEM. *P = 0.009.	37
11. Tiempo en inactividad por minuto de los grupos CC1 (primer choque al min 1, n=10), CC3 (min 3, n=10) y CC5 (min 5, n=10), choque eléctrico de 1.0 mA; durante el entrenamiento y la prueba a las 24 horas del condicionamiento de miedo al	38

contexto (CMC). Los datos se expresan como la media \pm EEM.

12. Tiempo en inactividad de los grupos **CC1** (primer choque al min 1, n=10), **CC3** (min 3, n=10) y **CC5** (min 5, n=10), choque eléctrico de 1.0 mA; durante el último minuto del entrenamiento del CMC. Los datos se expresan como la media \pm EEM. 39
13. Tiempo en inactividad de los grupos **CC1** (primer choque al min 1, n=10), **CC3** (min 3, n=10) y **CC5** (min 5, n=10), choque eléctrico de 1.0 mA; durante los primeros 3 minutos de la prueba de retención a las 24 horas del CMC. Los datos se expresan como la media \pm EEM. 40
14. Fotografía de un corte coronal del cerebro de rata, se muestra la marca de implantación bilateral de las cánulas en el estriado dorsomedial (A) y dorsolateral (B) teñido con la técnica de Nissl. 41
15. Diagramas de cortes coronales de los cerebros a nivel del estriado dorsomedial (A) y dorsolateral (B) de la rata (Bregma 0.2) en los que se hace una representación esquemática de las regiones donde se localizaron las puntas de los inyectores de todas las ratas incluidas en el estudio. 41
16. Tiempo en inactividad por minuto de los grupos a los que se administró corticosterona o vehículo en estriado dorsomedial: **DM-Veh** (vehículo, n=12), **DM-Cort5** (5 ng, n=10), **DM-Cort10** (10 ng, n=12) y **DM-Cort20** (20 ng, n=12) durante el entrenamiento y la prueba a las 48 horas del CMC. Los datos se expresan como la media del tiempo en inactividad (\pm EEM). 42
17. Tiempo en inactividad por minuto de los grupos a los que se administró corticosterona o vehículo en estriado dorsolateral: **DL-Veh** (vehículo, n=9), **DL-Cort5** (5 ng, n=7), **DL-Cort10** (10 ng, n=9), **DL-Cort20** (20 ng, n=7), durante el entrenamiento y la prueba a las 48 horas del CMC. Los datos se expresan como la media del tiempo en inactividad (\pm EEM). 43
18. Tiempo en inactividad de los grupos a los que se administraría corticosterona en estriado dorsomedial, **DM-Veh** (vehículo, n=12), **DM-Cort5** (5 ng, n=10), **DM-Cort10** (10 ng, n=12), **DM-Cort20** (20 ng, n=12); y en estriado dorsolateral **DL-Veh** (vehículo, n=9), **DL-Cort5** (5 ng, n=7), **DL-Cort10** (10 ng, n=9), **DL-Cort20** (20 ng, n=7) durante el último minuto del entrenamiento del CMC. Los datos se expresan como la media del tiempo en inactividad (\pm EEM). 44

19. Retención del CMC de los grupos a los que se administró corticosterona en estriado dorsomedial, **DM-Veh** (vehículo, n=12), **DM-Cort5** (5 ng, n=10), **DM-Cort10** (10 ng, n=12), **DM-Cort20** (20 ng, n=12); y en estriado dorsolateral **DL-Veh** (vehículo, n=9), **DL-Cort5** (5 ng, n=7), **DL-Cort10** (10 ng, n=9), **DL-Cort20** (20 ng, n=7), durante los primeros tres minutos de la prueba. Los datos se expresan como la media del tiempo en inactividad (\pm EEM).

I. INTRODUCCIÓN

El aprendizaje es el proceso por el que se adquiere información del entorno, y la memoria es el proceso por el cual esta información es codificada, almacenada y posteriormente evocada. Esta adquisición de la información del entorno forma parte de la capacidad del organismo de variar sus respuestas conductuales en términos de requerimientos ambientales diferentes (Kandel et al., 2006; McGaugh, 1973).

Se ha observado que no todas las memorias se retienen con la misma intensidad. Las memorias de experiencias emocionales (o memorias emocionales) tienden a ser recordadas bien y por un largo tiempo. Esta diferencia cobra sentido desde una perspectiva evolutiva y funcional, ya que los organismos podrían beneficiarse poco al guardar memorias de eventos triviales con la misma intensidad que para los eventos importantes. Las hormonas del estrés (epinefrina, norepinefrina y los glucocorticoides) juegan un papel importante en la consolidación de la memoria. Un glucocorticoide que ha sido utilizado en el estudio de los sistemas que regulan el almacenamiento de la información es la corticosterona, la cual es producto de la activación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenocortical y se le ha relacionado con la consolidación de memorias emocionales por medio de su unión a receptor en regiones cerebrales como la amígdala, el hipocampo y el estriado (Cahill y McGaugh, 1996a). Un modelo utilizado para estudiar las memorias emocionales en roedores es el condicionamiento de miedo al contexto, un tipo de condicionamiento clásico en donde el animal aprende a asociar un estímulo neutral con un estímulo nocivo (LeDoux, 1993).

El estriado es de particular interés para nuestro grupo de trabajo. Siendo componente de los ganglios basales, participa en el control del movimiento (Heimer et al., 1995), y se ha visto relacionado a otros procesos como el aprendizaje asociativo, tareas de discriminación instrumental simple (Featherstone

y McDonald, 2004a; Johnson et al., 2007) y más recientemente a la consolidación de la memoria de una prueba de evitación inhibitoria (Medina et al., 2007). El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar los efectos de la administración intracerebral de corticosterona en dos regiones del estriado sobre la consolidación del aprendizaje del condicionamiento de miedo al contexto.

II. ANTECEDENTES

2.1 El estudio del aprendizaje y la memoria

La habilidad de aprender y recordar es una característica fundamental del cerebro. La importancia del entendimiento de los mecanismos del aprendizaje y la memoria radica en que lo que aprendemos, y lo que recordamos determina en gran medida quién somos (Tsien, 2006). Se denomina aprendizaje a los cambios en el sistema nervioso provocados por la experiencia, que pueden ser duraderos y se manifiestan en el comportamiento de los organismos. La memoria, un fenómeno generalmente inferido a partir de estos cambios, es el efecto que permanece luego que un estímulo ha desaparecido y da a nuestras vidas un sentido de continuidad. El aprendizaje y la memoria se encuentran íntimamente relacionados. Es por medio del proceso de aprendizaje que se almacena la información en la memoria (McGaugh, 1973; Morgado, 2005).

2.1.1 Clasificación de la memoria

En 1890, al referirse a la duración de los recuerdos, William James acuñó los términos de “memoria primaria” y “memoria secundaria” (Prado-Alcalá y Quirarte, 2007). Santiago Ramón y Cajal, a finales del siglo XIX propuso la plasticidad en el número y fuerza de las conexiones neuronales como base física del aprendizaje y el soporte de la memoria (Morgado, 2005). En el estudio pionero de 1900, la hipótesis de perseveración-consolidación de Mueller y Pilzecker, se sugirió que los procesos neuronales activados por información recientemente aprendida, perseveran y, a lo largo del tiempo se vuelven consolidados permanentemente (McGaugh, 1999).

La memoria refleja varias etapas: adquisición, consolidación, retención, evocación y extinción (Abel y Lattal, 2001). De acuerdo a su duración, la memoria puede clasificarse en corto o largo plazo. La memoria de corto plazo se basa en

cambios efímeros, eléctricos o moleculares en las redes neuronales implicadas. Al repetirse la experiencia, tales cambios persisten y pueden activar mecanismos de iniciación y mantenimiento de la plasticidad sináptica, dar lugar a síntesis de nuevas proteínas y provocar cambios estructurales; este proceso involucra un diálogo entre genes y sinapsis, denominado proceso de consolidación de la memoria (Fig. 1). Su resultado es el establecimiento de una memoria de largo plazo basada en cambios estructurales persistentes (Morgado, 2005).

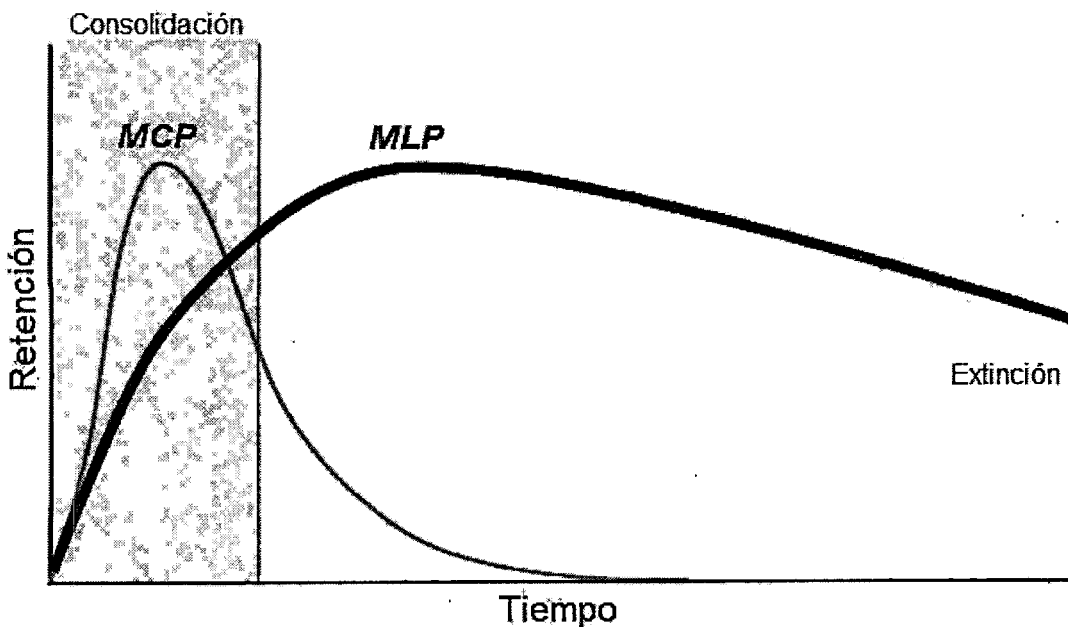


Figura 1. Las etapas de la memoria se pueden representar al graficar la retención de una conducta a través del tiempo. En la memoria de corto plazo (MCP) la conducta se extingue rápidamente. En la memoria de largo plazo (MLP), la consolidación estabiliza progresivamente la memoria después de la adquisición y la hace más duradera (modificado de Dudai, 2004).

Además de por su duración, la memoria puede clasificarse como implícita y explícita. La información acerca de cómo realizar algo se reconoce como memoria implícita (no declarativa) y el conocimiento de los hechos acerca de personas, lugares, cosas y lo que éstos significan como memoria explícita (declarativa). La memoria explícita es muy flexible e involucra la asociación de múltiples datos o piezas de información y es evocada por un esfuerzo consciente deliberado. En contraste, la memoria implícita es más rígida y se involucra principalmente en

entrenar habilidades motoras reflejas o perceptuales, se relaciona estrechamente a las condiciones del estímulo original bajo el cual ocurrió el aprendizaje y se evoca inconscientemente (Kandel et al., 2000; Tsien, 2006).

Las formas implícitas de la memoria han sido estudiadas al exponer a sujetos experimentales a experiencias sensoriales controladas. La memoria puede medirse por los cambios en la conducta de un sujeto algún tiempo después del aprendizaje. Dos procedimientos principales han emergido de tales estudios, y estos han identificado dos subclases principales de memoria implícita: asociativa y no asociativa. En el aprendizaje asociativo el sujeto aprende sobre la relación entre dos estímulos o entre un estímulo y una conducta. En el aprendizaje no asociativo el sujeto es expuesto una o varias veces a un tipo único de estímulo. Dos formas de aprendizaje asociativo se han distinguido basadas en los procedimientos experimentales utilizados para establecer el aprendizaje: el condicionamiento clásico, que involucra el aprendizaje de una relación entre dos estímulos; y el condicionamiento operante que involucra el aprendizaje de una relación entre la conducta del organismo y las consecuencias de esa conducta (Kandel et al., 2000). La memoria de estados emocionales (respuestas autónomas y somáticas involucra un almacenamiento de memoria implícita, mientras que la memoria de sensaciones involucra un almacenamiento de memoria explícita (Iversen et al., 2000).

2.2 Memorias emocionales

Los mecanismos neuronales de la memoria y las emociones se han ubicado por un largo tiempo en el sistema límbico. El concepto de sistema límbico ha sido refinado poco a poco por los circuitos neuronales específicos para los procesos emocionales y de la memoria. Las memorias emocionales involucran el aprendizaje (probablemente inconsciente) y el almacenamiento de información acerca del valor emocional de los eventos (LeDoux, 1993).

Los estímulos emocionalmente significativos activan vías de señalización sensoriales que disparan la modulación del ritmo cardiaco, presión sanguínea y respiración mediada por el hipotálamo. Esta información es luego enviada hacia la corteza cerebral, directamente desde los órganos periféricos cuyo estado homeostático haya sido perturbado e indirectamente desde el hipotálamo, la amígdala y estructuras relacionadas (Iversen et al., 2000).

Conexiones aferentes desde áreas de procesamiento sensorial del tálamo y la corteza median el aprendizaje emocional en situaciones que involucran pistas sensoriales específicas, mientras que el aprendizaje sobre la significancia emocional de pistas más generales o contextuales involucra proyecciones de la amígdala hacia la formación hipocámpica (LeDoux, 1993).

2.3 Memoria y plasticidad neuronal

En 1949 Hebb elaboró la hipótesis de un camino dual de la memoria, en donde un rastro inicial de corta duración basado en reverberación neuronal, induce cambios que finalmente desembocan en modificaciones neuronales, la actividad pre- y postsináptica podría modificar las conexiones neuronales en determinadas estructuras del cerebro, induciendo la formación de memoria a largo plazo (McGaugh, 1999; Morgado, 2005).

Hoy en día se sabe que los cambios que subyacen al almacenamiento de la información ocurren a nivel sináptico a través de procesos colectivamente denominados como "plasticidad sináptica". Dos fenómenos observados en estudios electrofisiológicos en el hipocampo pueden ser vistos como componentes del aprendizaje a nivel sináptico: la potenciación a largo plazo (Long-Term Potentiation, LTP) y la depresión a largo plazo (Long-Term Depression, LTD). En la LTP, una sinapsis glutamatérgica que es activada breve y fuertemente por estimulación de alta frecuencia (p. ej. 100 Hz) puede retransmitir impulsos eficientemente y permanecer haciéndolo por un largo tiempo, meses o más. En la

LTD, una estimulación prolongada de baja frecuencia (1 Hz) a una sinapsis glutamatérgica puede provocar que retransmita impulsos menos eficientemente por un periodo largo. Los mecanismos post-sinápticos que median la LTP y la LTD están relacionados a la activación y transporte de receptores a glutamato (Fig. 2). De esta manera, la efectividad de sinapsis particulares puede ser encendida o apagada, a través de episodios sucesivos de LTP y LTD. Siendo representaciones de alteraciones en la función de circuitos neuronales, son los únicos cambios en los circuitos que se conoce que ocurren lo suficientemente rápido. Se sabe que en algunas formas de aprendizaje ciertos métodos experimentales eliminan o atenúan la LTP y/o la LTD (Goda y Stevens, 1996; Tsien, 2006).

Aunque las bases moleculares exactas que subyacen a la plasticidad de largo plazo no son claras aún, existe un consenso general acerca de que la plasticidad estructural es una propiedad fundamental de las neuronas y que es un componente de los mecanismos de almacenamiento de memorias a largo plazo. Entre las diversas moléculas de señalización involucradas en las cascadas bioquímicas relevantes, la proteína cinasa II dependiente de Ca_2^+ /calmodulina (CaMKII) tiene un papel clave en la mediación de la expresión de la fase temprana de la LTP (Nicoll y Malenka, 1999). Se cree que la CaMKII activada en la zona de densidad postsináptica (Post-Synaptic Density, PSD) es responsable de potenciar las sinapsis, probablemente causando la inserción sináptica de los receptores a glutamato AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol-propionato) y/o incrementando su conductancia de canal único. Otras cinasas como la proteína cinasa C (PKC) o la proteína activada por mitógeno (MAP) cinasa pueden también estar involucradas en la expresión de LTP. El factor de transcripción CREB (cAMP response element-binding) en su forma fosforilada también se ha implicado en la LTP (Holz y Fisher, 2006; Tsien, 2006).

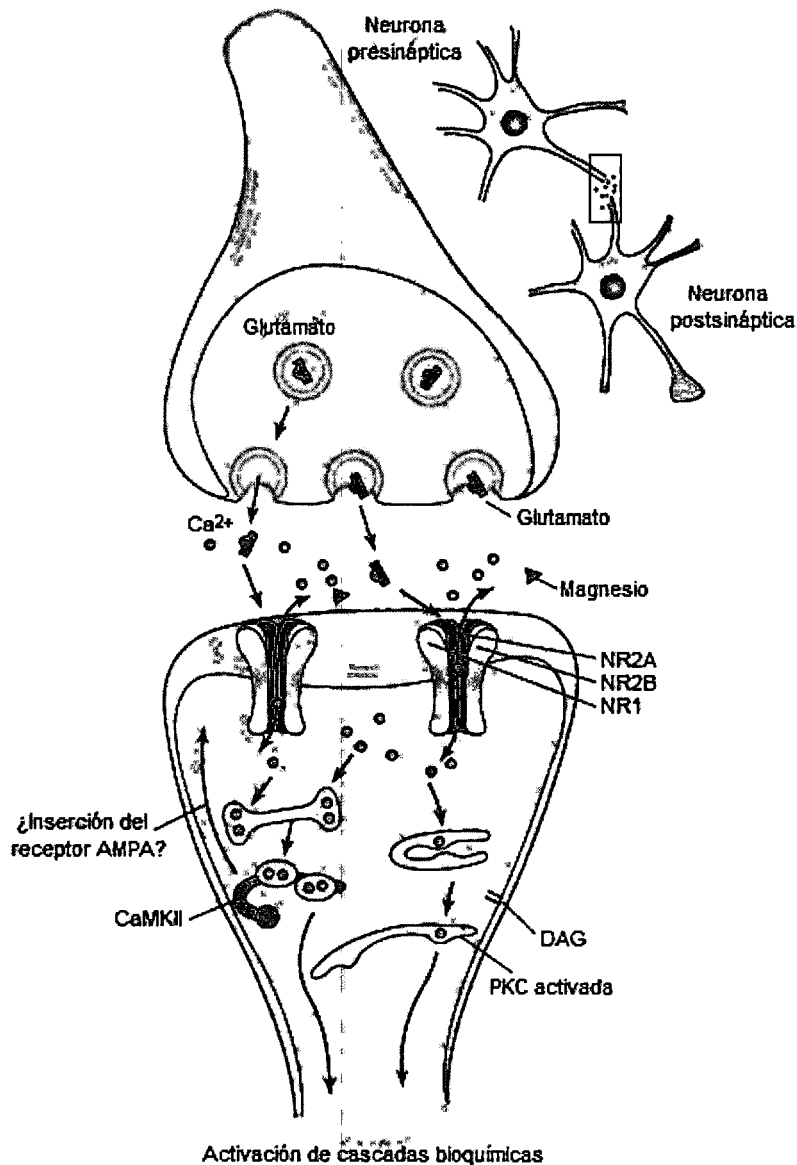


Figura 2. Esquema de una sinapsis entre una neurona presináptica y una postsináptica. El glutamato liberado de las terminales presinápticas activa los receptores AMPA y NMDA. La transmisión sináptica se potencia si el receptor NMDA detecta la coactividad de las neuronas presinápticas y postsinápticas (liberación y unión de glutamato y suficiente depolarización para liberar magnesio desde el poro del canal). Cuando esto ocurre, el receptor NMDA se activa, lo que abre el poro del canal y permite el influjo de sodio y calcio y la salida de potasio. El influjo de calcio activa cascadas bioquímicas que eventualmente fortalecen la sinapsis. Una vez iniciado el LTP, se cree que la célula libera mensajeros secundarios que actúan en las proteínas cinasas en la terminal presináptica para iniciar una potenciación de la liberación de transmisor que contribuye a la LTP (modificado de Tsien, 2006).

2.4 Modulación de la memoria

La consolidación de la memoria es un proceso que se da continuamente. La etapa inicial es muy probablemente como fue sugerida por Müller y Pilzecker (1900) y por Hebb (1949), mientras que las etapas posteriores involucran la reorganización de los procesos de la memoria en los sistemas cerebrales. El concepto de la modulación del almacenamiento de la memoria surgió a partir de dos descubrimientos: las memorias recientes son susceptibles a modulación en la adquisición de la tarea o después del entrenamiento (post-entrenamiento) por medio de inyecciones de drogas o estimulación cerebral por un tiempo limitado luego que son formadas (McGaugh, 1966) y, estos tratamientos pueden potenciar la memoria dependiendo de las condiciones experimentales (Gold y van Buskirk, 1976; Introini-Collison et al., 1992; Medina et al., 2007; Quirarte et al., 1997).

Desde el estudio de Goddard (1964) donde la estimulación eléctrica post-entrenamiento de la amígdala en ratas produjo amnesia retrógrada, se promovió la investigación de los sistemas cerebrales involucrados en la consolidación (McGaugh, 1999). La introducción de los inhibidores de la síntesis de proteínas y el desarrollo de tratamientos post-entrenamiento permitió la investigación de los mecanismos y sistemas neurobiológicos de la memoria sin afectar directamente la adquisición o la evocación (McGaugh, 1999). Con los hallazgos sobre la potenciación de la memoria por medio de la administración post-entrenamiento de drogas estimulantes se obtuvo evidencia adicional de que la consolidación de la memoria es susceptible a modulación (McGaugh, 1966).

Existen interacciones complejas entre varias hormonas y sistemas cerebrales que regulan el almacenamiento de la memoria de largo plazo. Dos sistemas son críticos en esta modulación: las hormonas endógenas del estrés y el complejo amigdalino (Cahill y McGaugh, 1996a).

2.5 Las hormonas del estrés

En mamíferos, la respuesta al estrés involucra tanto al sistema nervioso central como a elementos periféricos, incluyendo la activación del sistema nervioso autónomo y el eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenocortical (HPA). Una vasta cantidad de evidencia experimental indica que las hormonas liberadas durante o después de experiencias emocionales, las catecolaminas adrenomedulares epinefrina y norepinefrina, la hormona adrenocortical corticosterona (cortisol en humanos) y otras sustancias neuromoduladoras (β -endorfina, vasopresina, hormona adrenocorticotrópica, sustancia P y colecistoquinina) juegan un papel clave en la consolidación. Esto sugiere que el proceso relativamente lento de consolidación de la memoria por hormonas relacionadas al estrés permite a los sistemas neuromoduladores activados por la experiencia regular la fuerza de las memorias en el proceso de consolidación después del aprendizaje (Gold y McGaugh, 1984; McGaugh et al., 1996; McGaugh y Roozendaal, 2002; Sandi, 1998).

Gold y van Buskirk (1976) dieron la primera evidencia que sugería que una hormona endógena regulaba la consolidación de la memoria. En su estudio, las inyecciones sistémicas de epinefrina administradas post-entrenamiento producían potenciación dosis-dependiente de la retención a largo plazo de una tarea de evitación inhibitoria. En otro estudio, Cahill et al. (1994) administraron el antagonista al receptor β -adrenérgico hidrocloreuro de propanolol en sujetos que debían recordar una historia emocional o una historia semejante pero neutral. Los autores observaron efectos de deterioro en la retención de la memoria al bloquear los receptores β -adrenérgicos; es decir, el propanolol deterioró significativamente la consolidación en la historia emocional pero no afectó la memoria de la historia neutral.

También se ha encontrado evidencia a nivel de neuroplasticidad. Seidenbecher et al. (1997) encontraron que ocurre una modulación de la

neuroplasticidad celular por reforzadores adversos y apetitivos administrados después de la inducción de la potenciación a largo plazo y que tales efectos son bloqueados por antagonistas de receptores a hormonas del estrés.

2.5.1 Glucocorticoides

Además de la inducción de la liberación de las hormonas adrenomedulares epinefrina y norepinefrina, los eventos estresantes también liberan hormonas adrenocorticales. Los glucocorticoides, corticosterona en la mayoría de los vertebrados y cortisol en los humanos, son los productos finales de la activación del eje HPA y son liberados por las glándulas adrenales. Los glucocorticoides proveen una retroalimentación negativa de la actividad del eje y regulan un amplio número de respuestas periféricas, incluyendo procesos metabólicos y del sistema inmunológico (Cahill y Mcgaugh, 1996b; Sandi, 1998). Los glucocorticoides actúan en células inmunes directa e indirectamente al suprimir la inducción de respuestas proinflamatorias; inhiben la producción de citocinas como la interleucina 1 β y el factor de necrosis tumoral (TNF); promueven la producción de citocinas antiinflamatorias tal como la IL-10 por macrófagos y células dendríticas y también conducen a la inhibición de respuestas inmunes al promover la apoptosis de macrófagos, células dendríticas y células T (Sternberg, 2006).

En ratas, los niveles en plasma de corticosteroides se elevan justo antes de oscurecer, es decir, al inicio del periodo de mayor actividad (Fig. 3) y pueden ser modificados por eventos estresantes (Buijs et al., 1993). En mamíferos, se ha encontrado que la corticosterona incrementa rápidamente (en un rango de 7.5 min) al explorar un ambiente novedoso, lo cual puede ser un mecanismo potencial por el cual este esteroide influencia los procesos de aprendizaje. El entendimiento de estos mecanismos ha sido impulsado por estudios recientes que demuestran la habilidad de la corticosterona de producir incrementos rápidos de aminoácidos excitatorios, especialmente el glutamato, en estructuras cerebrales relevantes para el aprendizaje tal como el hipocampo (Sandi, 1998).

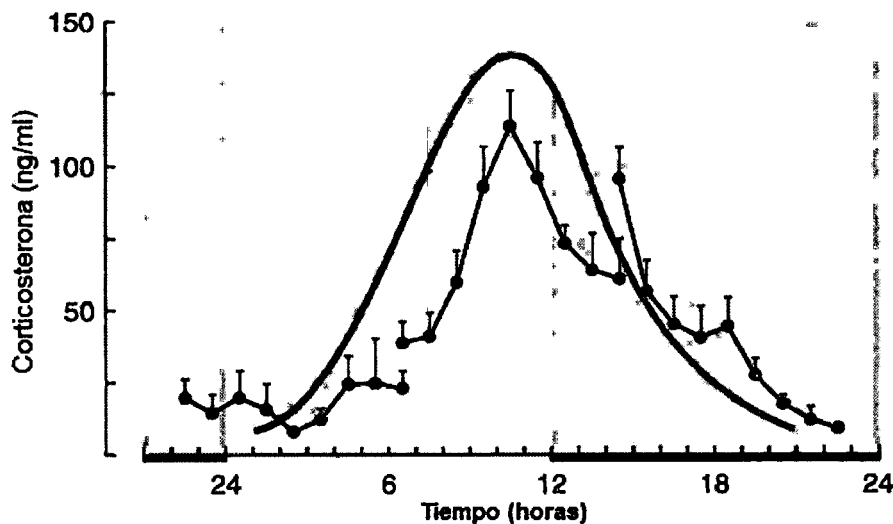


Figura 3. Niveles en plasma de corticosterona en ratas macho (cepa Wistar). El área sombreada representa el tiempo nocturno (Modificado de Buijs et al., 2003).

Dadas sus propiedades lipofílicas, los glucocorticoides atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica y entran al cerebro, donde pueden influenciar la función cerebral y la conducta a través de la unión a diferentes tipos de receptores: el Tipo I o mineralocorticoide (MR) y el Tipo II o glucocorticoide (GR), los cuales son activados por la unión de la hormona glucocorticoide o un agonista (Sandi, 1998). La afinidad de la corticosterona es unas diez veces mayor para los MRs que para los GRs y la concentración en plasma determina la ocupación de receptores *in vivo*. Al unirse la hormona al receptor, se induce un cambio conformacional en el receptor, conduciendo a la disociación de su proteína adjunta (heatshock protein, HSP90) y la activación de señales nucleares de traslocación y dimerización de complejos activados por el receptor. Subsecuentemente, el dímero del receptor se une a secuencias específicas de ADN, llamadas elementos de respuesta a corticosteroides, modulando la transcripción de genes y, por tanto, la síntesis de ciertas proteínas (Sandi, 1998).

La activación de los receptores a glucocorticoides influencia la consolidación de la memoria, sugiriendo que los tratamientos de corticosteroides a ciertas concentraciones potencian la retención (Cahill y McGaugh, 1996a). A

través de técnicas inmunohistoquímicas y de hibridación *in situ*, se ha demostrado una densidad alta de GRs en estriado, amígdala e hipocampo (Morimoto et al., 1996).

En estudios donde se realizó la administración de glucocorticoides o agonistas post-entrenamiento en el hipocampo, se afectó la consolidación de la memoria en tareas adversas y apetitivas. Las infusiones en la amígdala basolateral (BLA) facilitan la memoria y las lesiones selectivas de BLA bloquean la facilitación de tareas operantes de evitación inhibitoria. Quirarte et al. (1997) encontraron que por medio de la administración de antagonistas β -adrenérgicos en BLA se bloquean los efectos de potenciación de la memoria de glucocorticoides administrados sistémicamente o intra-amígdala. Los efectos de los glucocorticoides sobre la memoria dependen críticamente del BLA (McGaugh y Roozendaal, 2002).

Las inyecciones intracerebrales post-entrenamiento de glucocorticoides afectan la expresión de moléculas de adhesión celular neuronal (NCAMs) en el hipocampo y la corteza prefrontal y pueden causar cambios sinápticos estructurales de largo plazo. Los glucocorticoides actúan a través de receptores intracelulares e intranucleares y pueden afectar la transcripción de genes al unirse directamente a homodímeros, receptor a ADN. Los glucocorticoides también pueden afectar la consolidación de la memoria a través de la transactivación o interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción o sistemas efectores, como el de la cinasa regulada extracelularmente (ERK2), que es considerada crítica para la consolidación de la memoria y la plasticidad neuronal de largo plazo en la amígdala y el hipocampo (McGaugh y Roozendaal, 2002).

2.6 Condicionamiento clásico

Una manera de elucidar mecanismos involucrados en el aprendizaje es por medio del estudio de procesos asociativos, donde la conducta de un animal puede ser cuantificada utilizando mediciones por observación directa o con ayuda de instrumentos automatizados de una respuesta particular (Curzon et al., 2009). El

condicionamiento clásico fue estudiado por el fisiólogo ruso Iván Pavlov, quien reconoció que el aprendizaje frecuentemente consiste en la respuesta a un estímulo que originalmente era neutral. La esencia del condicionamiento clásico es el apareamiento de dos estímulos: el primero es llamado estímulo condicionado (EC), puede ser una luz, un tono, o un estímulo táctil, que no producen una respuesta predecible o producen una respuesta débil usualmente no relacionada a la respuesta que se aprenderá eventualmente; el segundo es el estímulo incondicionado (EI), tal como alimento o un choque eléctrico en un miembro, que generalmente producen una respuesta fuerte, consistente y manifiesta, llamada respuesta incondicionada (RI) como salivación o retirar un miembro expuesto al choque. Las RI son innatas y producidas sin aprendizaje. Cuando un EC es seguido por un EI, el EC comenzará a producir una respuesta nueva o diferente llamada respuesta condicionada (RC), idéntica o muy similar a la inducida por el EI. Si el EI implica una recompensa (comida o agua), el condicionamiento se denomina apetitivo; si el EI es nocivo (un choque eléctrico), el condicionamiento se denomina adverso (Kandel et al., 2006).

2.6.1 Condicionamiento de miedo al contexto

La defensa contra las amenazas en el ambiente es una función esencial obvia para la supervivencia del individuo y es coordinada por el cerebro (Motta et al., 2009). El condicionamiento de miedo al contexto (CMC) es el más básico de los procedimientos de condicionamiento. Involucra el colocar un animal en un ambiente novedoso y, suministrar un estímulo adverso (Fig. 4). Estímulos arbitrarios como tonos, luces o ambientes distintivos, pueden a través del condicionamiento clásico, convertirse en ECs al ser apareados con un EI como un choque eléctrico. Cuando el animal es regresado al mismo ambiente, generalmente demostrará una respuesta de congelamiento al recordar y asociar ese ambiente con el estímulo adverso (Curzon et al., 2009; Fanselow, 1984).

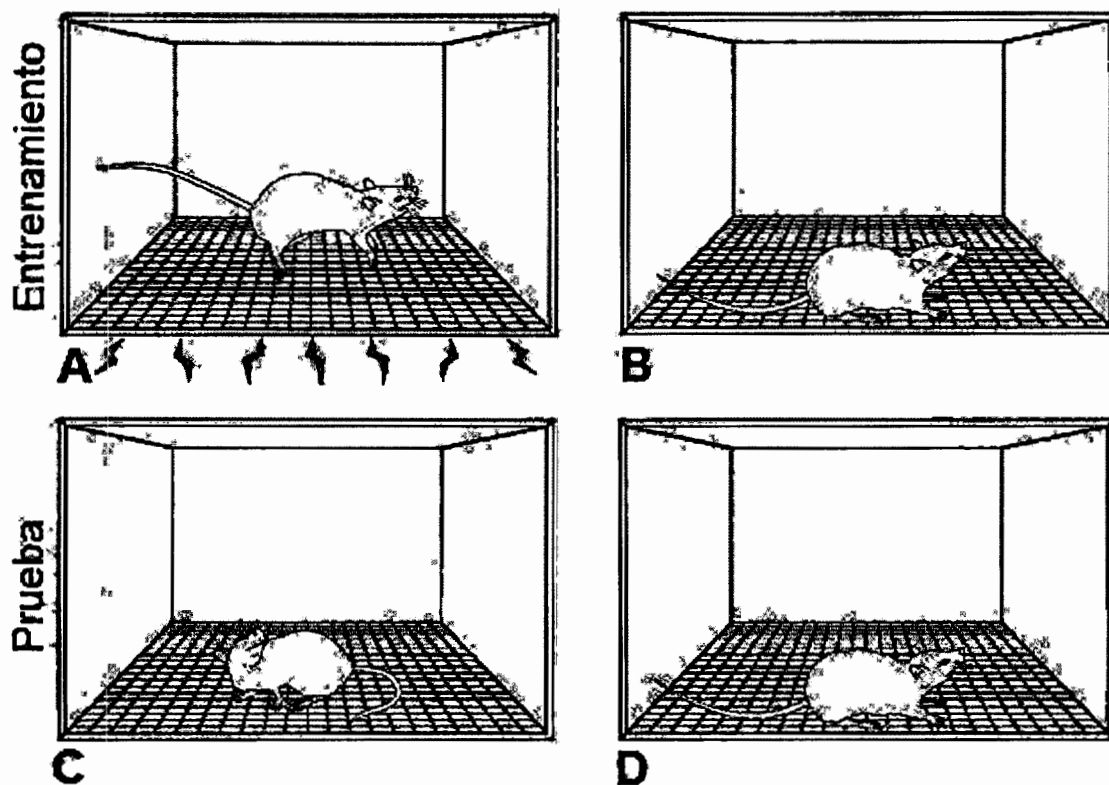


Figura 4. En el entrenamiento del CMC se coloca al animal en un ambiente novedoso y se suministra un estímulo aversivo, como un choque eléctrico (A). El animal demuestra una respuesta de congelamiento luego del estímulo aversivo (B). En la prueba del CMC se coloca al animal en un ambiente novedoso y no es expuesto a ningún estímulo aversivo (C). El animal demuestra una respuesta de congelamiento al haber asociado el ambiente (D) con el estímulo aversivo (Modificado de (Kandel et al., 2006).

La conducta de congelamiento en el CMC es interpretada como una activación del sistema de miedo. El miedo es definido como un sistema motivacional que protege al animal de amenazas ambientales (p. ej., depredación) a diferentes niveles de organización (conducta manifiesta, funcionamiento autónomo, etc.). La activación del sistema del miedo, limita la flexibilidad del repertorio conductual del animal a un conjunto de respuestas, llamadas reacciones de defensa específicas de especie (Species-Specific Defense Reactions, SSDRs). La rata posee varias SSDRs: congelamiento, boxeo defensivo, huida y enterramiento defensivo (Bolles, 1970; Fanselow, 1984).

La elección de una SDR sobre otra se ha planteado de modo que la conducta motivada adversamente es una función conjunta de la intensidad del mediador (nivel de miedo) y la presencia del estímulo de soporte conductual (un depredador, un miembro de la misma especie o un choque eléctrico) así como de la configuración del ambiente (conocido, inescapable, etc.). Esto es, al cambiar la configuración del ambiente, la respuesta del animal a un estímulo adverso cambia su respuesta de una SDR a otra; el animal puede aprender del soporte ambiental disponible en un ambiente particular y este aprendizaje puede influenciar su elección posterior de SDR. Sin embargo, se ha sugerido que el congelamiento es la SDR dominante en ratas en tareas de condicionamiento clásico adverso en situaciones ambientales variables: un conespecífico presente o ausente, con o sin salidas, con o sin luz (Fanselow, 1986; Fanselow y Lester, 1988).

La respuesta de congelamiento no es una simple supresión de actividad, sino un patrón conductual complejo y coordinado. Implica una postura inclinada, inmóvil, con un patrón distintivo de cambios autónomos; el ritmo cardíaco se desacelera, la respiración se vuelve rápida y superficial (los movimientos correlacionados a la respiración se vuelven difíciles de detectar) y existe analgesia. Las respuestas bradicárdicas son las mismas que acompañan la atención incrementada y el tiempo de reacción decrecido, posiblemente indicando que si ocurre un cambio sutil en el estímulo contextual la presa se encuentra lista para entrar en acción (Chance et al., 1978; Hofer, 1970; MacLennan et al., 1980). Por lo tanto, los complejos cambios conductuales que acompañan el miedo pueden ser descritos de mejor manera en términos de su función, que en contrarrestar la depredación (Fanselow, 1984). Típicamente el animal prefiere congelarse en lugares con características que podrían ser de utilidad como escondites, tal como junto a una pared, en esquinas o en áreas oscuras (Fanselow y Lester, 1988).

La respuesta de congelamiento puede ser utilizada como un índice de activación del sistema de miedo y fácilmente puede ser medida por observación

directa o por aparatos de monitoreo de actividad. Para provocar una respuesta de congelamiento confiable se recomienda un periodo de habituación (tiempo basal) a la cámara de 120 segundos para permitir su exploración y suministrar un choque de intensidad media (0.17 a 0.8 mA, generalmente de 0.6 mA). El congelamiento puede durar de segundos a minutos, dependiendo de la fuerza del estímulo adverso, el número de presentaciones y el grado de aprendizaje alcanzado por el sujeto, es decir, a estímulos adversos más fuertes, un mayor número de estímulos y una mejor consolidación, se demostrará mayor congelamiento. Una respuesta de congelamiento puede ocurrir con un solo apareamiento EC-EI (Curzon et al., 2009; Fanselow, 1984).

2.7 El estriado

El término “estriado” o “neostriado” fue asignado a las estructuras núcleo caudado y putamen debido a su apariencia estriada por la penetración de fascículos de axones corticofugales, estriatofugales y corticopetales dispersos. Junto con el globus-pallidus y algunas veces, el tálamo y el cuerpo amigdaloides, el estriado se identifica como un ganglio basal (Fig. 5). Los ganglios basales son conocidos por su papel en el control de las funciones motoras, aunque también están involucrados en procesos que conducen al movimiento o procesos que conducen acciones, incluyendo emociones, motivación y cognición (Haber y Gdowski, 2004).

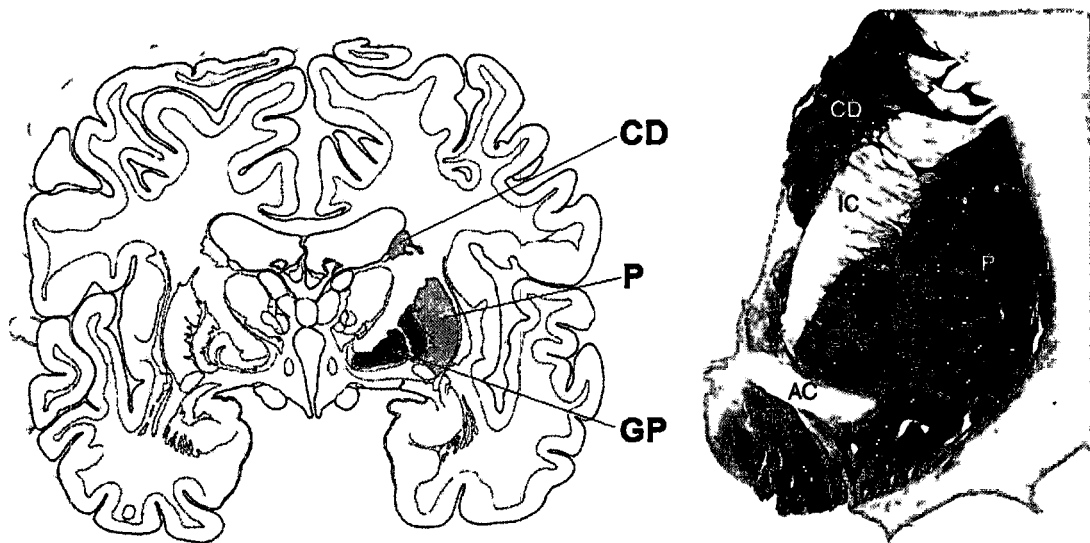


Figura 5. Localización del estriado en un corte coronal de cerebro humano (izquierda) y microfotografía de un corte coronal teñido con acetilcolinesterasa del estriado humano (derecha). AC, Comisura anterior; CD, núcleo caudado, GP, globus pallidus, GPe, globus pallidus segmento externo, IC, cápsula interna; P, putamen; VP, pallidum ventral; VS, estriado ventral (modificado de Haber y Gdowski, 2004).

El estriado en la rata es una gran masa gris que ocupa la parte más profunda del hemisferio cerebral. Es recipiente de entradas corticales y amigdaloides topográficamente organizadas y una batería de aferentes subcorticales desde la línea media y el núcleo talámico intralaminar, así como grupos monoaminérgicos y de otras células en el tallo cerebral. Las relaciones topográficas son mantenidas por proyecciones estriatales directas y vías estriatofugales (vía relevos en los núcleos intrínsecos de los ganglios basales) hacia los núcleos de salida de los ganglios basales, que, de hecho, se proyectan topográficamente de regreso hacia la corteza vía el tálamo, así como a un número de objetivos subcorticales, incluyendo el colliculus superior, habenula lateral y la formación reticular (Heimer et al., 1995).

El estriado parece ser homogéneo en tejido fresco y en preparaciones de Nissl, pero un estudio exhaustivo de las proyecciones corticostriatales en la rata McGeorge y Faull (1989) apoya la noción de dos territorios grandes aunque considerablemente superpuestos del estriado, una parte dorsal o dorsolateral, la

cual recibe una entrada neocortical, y un territorio ventromedial que recibe una entrada allocortical-mesocortical. Algunos patrones de entradas estriatales, salidas y marcadores neuronales intrínsecos y extrínsecos son reflejados en numerosas subdivisiones neuroquímicas distintas tanto en el estriado dorsal como en el ventral. A pesar de su apariencia homogénea general en tinciones Nissl normales y varias preparaciones histológicas convencionales, se ha vuelto evidente que el estriado se encuentra lejos de ser un tejido homogéneamente organizado (Heimer et al., 1995).

2.7.1 Citología del estriado

Del 90 al 95% de neuronas estriatales en la rata son de las llamadas medianas espinosas, presentes en estriado dorsal, núcleo accumbens y tubérculo olfatorio. Estas células tienen somas con diámetros entre los 12 y 18 μm y de cuatro a ocho dendritas que se encuentran relativamente carentes de espinas proximales a donde se encuentra su primera ramificación, pero más lejanamente son muy densamente espinosas hasta sus ápices, los cuales están típicamente a 100-250 μm del cuerpo celular. Las neuronas medianas espinosas dan origen a axones que dejan el estriado y abundan colaterales axonales locales que típicamente se quedan en las inmediaciones de la neurona de origen, pero ocasionalmente viajan algo de distancia dentro del estriado de la rata. Así, las neuronas medianas espinosas tienen características tanto de neuronas de proyección como de interneuronas. El gran número y empaçado denso de las neuronas medianas espinosas contribuye a la apariencia homogénea del estriado. Sin embargo, una heterogeneidad igualmente notable es exhibida por esta clase numéricamente dominante de neuronas y contribuye significativamente a la compartimentalización neuroquímica del estriado. Una variedad de neuronas grandes (15–25 μm) y medianas sin espinas o sólo algunas escasamente espinosas completan el resto de las neuronas estriatales. La mayoría de observaciones favorecen la visión de que la mayoría, si no todas, de las neuronas

sin espinas y neuronas escasamente espinadas del estriado representan diversas clases de interneuronas (Heimer et al., 1995).

El estriado está compuesto en su mayoría por neuronas medianas espinosas (10-20 μm de diámetro), siendo estas la mayoría de neuronas aferentes del estriado. Las células con menos espinas dendríticas son consideradas interneuronas. Las neuronas medianas espinosas son GABAérgicas, aunque pueden expresar otros péptidos como sustancia P o encefalina. La función fisiológica más importante de la actividad eferente estriatal es la inhibición de neuronas GABAérgicas tónicamente activas en el globus pallidus y la substantia nigra pars reticulata. Por lo tanto, la entrada excitatoria desde la corteza cerebral, cuyas aferentes hacen sinapsis asimétricas con las espinas de las neuronas medianas espinosas, conduce la actividad eferente del estriado (Gerfen, 1988; Kawaguchi, 1993).

2.7.2 El estriado y el aprendizaje

El éxito en los esfuerzos de localizar funciones mentales en áreas específicas del cerebro (p. ej. el daño en la porción posterior del lóbulo frontal izquierdo o área de Broca produce un daño específico en el lenguaje), condujo a la pregunta: ¿existen sistemas discretos en el cerebro que se encargan de la memoria? Estudios como el de Penfield (1958), donde la estimulación eléctrica en el lóbulo temporal de pacientes sometidos a cirugía cerebral producía una respuesta coherente de experiencias pasadas y el de Milner (1966), donde la remoción quirúrgica bilateral de porciones de los lóbulos temporales (hipocampo, amígdala y secciones de corteza temporal) en el paciente H. M. desembocaron en la incapacidad de transferir memorias nuevas de corto plazo a memorias de largo plazo han llevado gradualmente a la conclusión de que existen diversos tipos fundamentalmente diferentes de almacenamiento de la memoria y que ciertas regiones del cerebro son más importantes para algunos tipos que otras. Formas

diferentes de memoria implícita son adquiridas a través de diferentes tipos de aprendizaje e involucran regiones cerebrales distintas (Kandel et al., 2006).

El estriado tiene un papel importante en tareas de aprendizaje asociativo, de procedimiento, de hábito, asociación a recompensa y emocional (Ferreira et al., 2008). En la parte dorsal del estriado se han identificado dos regiones que se involucran en procesos distintos (Figura 6), el estriado dorsolateral (DL) está relacionado con el aprendizaje de procedimiento (incremental, basado en ruta) y el estriado dorsomedial (DM) con acciones flexibles (componentes de ubicación en tareas de navegación) y la adquisición y desempeño de acciones dirigidas a metas en tareas de condicionamiento operante (Johnson et al., 2007).

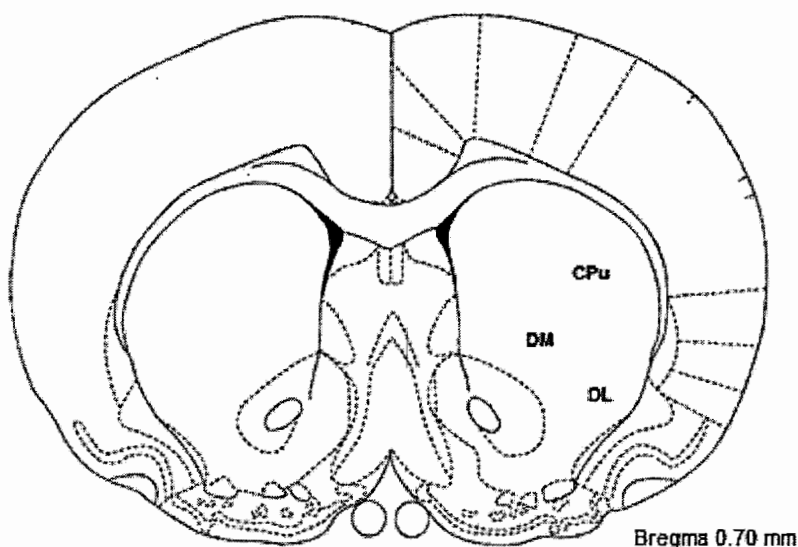


Figura 6. Localización de las áreas dorsomedial (DM) y dorsolateral (DL) en el estriado (CPu) de la ratona en un corte coronal (Bregma 0.70 mm) de cerebro según coordenadas estereotaxicas de Featherstone y McDonald (2004a) y Ragozzino et al. (2009) (diagrama modificado de Paxinos y Watson, 1998).

Lesiones neurotóxicas en el estriado DL o DM en una tarea de condicionamiento operante de discriminación simple, demostraron que las ratas con lesiones en DL tenían impedimentos en la adquisición (Featherstone y McDonald, 2004a). Cuando se realizaron lesiones en estriado DM y DL en dos tareas, donde la primera fue una tarea de discriminación simple y la segunda fue una tarea de aprendizaje de preferencia de lugar condicionada, los animales con

lesiones en DL tuvieron deterioro en la tarea de discriminación simple pero mantuvieron la habilidad de aprender la tarea de aprendizaje de preferencia de lugar. En contraste, los animales con lesiones en DM no tuvieron impedimentos en ninguna tarea. En un estudio de aprendizaje inverso de lugar se observó la liberación diferencial de acetilcolina en las regiones dorsomedial y dorsolateral. Los resultados sugieren que las regiones del estriado DM y DL están implicadas en procesos diferentes (Featherstone y McDonald, 2004b). Otros estudios recientes apoyan estos hallazgos (Featherstone y McDonald, 2005a, b; Ragozzino, 2003; Ragozzino et al., 2009).

Evidencia reciente indica que el estriado contribuye a la consolidación de las memorias emocionales. White y Salinas (2003) sugieren que el estriado puede formar parte de la adquisición o que es posible que la amígdala y el estriado dorsal sean partes de un sistema neuronal que media en el congelamiento en el CMC. Se ha observado que las lesiones bilaterales del hipocampo o la amígdala antes del entrenamiento afectan la consolidación del CMC. Las lesiones bilaterales en el estriado dorsal de ratas deterioran el aprendizaje en una tarea de condicionamiento de miedo al tono (TFC). Las ratas con lesiones muestran menos congelamiento que los controles; mostrando que el estriado dorsal tiene un papel en la expresión del condicionamiento de miedo (Ferreira et al., 2003; Ferreira et al., 2008).

Hui et al. (2004) demostraron que la administración sistémica de corticosterona facilitó selectivamente la memoria de una tarea de TFC. En otro estudio, Abrari et al. (2009) demostraron que la administración sistémica después del entrenamiento de corticosterona facilita la consolidación de la memoria de miedo al contexto y la LTP hipocámpica en ratas. Los autores sugieren que los glucocorticoides pueden facilitar la consolidación de la memoria de miedo al contexto por medio de la potenciación de la LTP hipocámpica.

El antecedente inmediato al presente trabajo es el realizado por Medina *et al.* (2007) quienes encontraron que la administración de corticosterona en el estriado dorsal de ratas produce una facilitación dosis y tiempo-dependiente de la consolidación de la memoria de una tarea de evitación inhibitoria. Al modificar el paradigma de evitación inhibitoria administrando corticosterona después del contexto o después del choque eléctrico no se muestra facilitación. Los autores concluyen que, mientras el estriado dorsal juega un papel dominante en el control del movimiento, la administración postentrenamiento de corticosterona en el estriado dorsal puede potenciar la memoria al reforzar específicamente la memoria de movimiento.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estriado es una estructura importante para que se lleve a cabo la consolidación de la memoria del aprendizaje asociativo y de las memorias emocionales. Al lesionar el estriado dorsal, se deteriora el aprendizaje del TFC, por lo que se sugiere que el estriado y la amígdala forman parte de un circuito neuronal que media en el congelamiento en el condicionamiento de miedo (Ferreira et al., 2003; Ferreira et al., 2008; White y Salinas, 2003). Aunque su anatomía es homogénea, las funciones de sus distintas áreas no han sido claramente definidas, y se ha demostrado una participación de las regiones DM y DL en procesos distintos (Featherstone y McDonald, 2004a; Johnson et al., 2007; Ragozzino et al., 2009).

La administración sistémica post-entrenamiento de corticosterona facilita la consolidación de la memoria de miedo al contexto y la LTP hipocámpica en ratas (Abrari et al., 2009). Se conoce que las inyecciones intracerebrales post-entrenamiento de glucocorticoides pueden causar cambios sinápticos estructurales de largo plazo (McGaugh y Roozendaal, 2002) y se ha demostrado una densidad alta de GRs en el estriado, la amígdala y el hipocampo (Morimoto et al., 1996), estructuras implicadas en la consolidación de memorias emocionales (LeDoux, 1993). La administración intracerebral de corticosterona en el estriado dorsal de ratas produce una potenciación dosis y tiempo-dependiente de la consolidación de la memoria de una prueba de evitación inhibitoria (Medina et al., 2007); pero a la fecha, no se ha estudiado si existe una potenciación de la memoria del CMC al administrar corticosterona en las regiones dorsomedial (DM) o dorsolateral (DL) en el estriado de la rata.

IV. HIPÓTESIS

Si las regiones dorsomedial y dorsolateral del estriado de la rata participan diferencialmente en la consolidación de la memoria del condicionamiento de miedo al contexto; entonces, al administrar corticosterona post-entrenamiento existirá una diferencia significativa en el congelamiento de las ratas inyectadas en el estriado dorsomedial con respecto al de las ratas inyectadas en el estriado dorsolateral.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si existe diferenciación funcional en la consolidación de la memoria de una tarea de condicionamiento de miedo al contexto, entre las regiones dorsomedial y dorsolateral del estriado de la rata al administrar corticosterona post-entrenamiento en esas regiones.

Objetivos particulares

1. Validar las condiciones experimentales para que se lleve a cabo el aprendizaje de la tarea de condicionamiento de miedo al contexto.
2. Evaluar si existen diferencias en la retención de la tarea de condicionamiento de miedo al contexto cuando se administra el primer choque eléctrico a diferentes tiempos (1, 3 o 5 minutos) durante el entrenamiento.
3. Evaluar si existen diferencias en la retención de la tarea de condicionamiento de miedo al contexto cuando se administran diferentes dosis de corticosterona en el estriado dorsomedial (DM) y en el estriado dorsolateral (DL) de la rata.

VI. METODOLOGÍA

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 y está acorde a las normas estipuladas en la "Guide for care and use of Laboratory animals" del NIH (ILAR, 1996). La metodología y los análisis utilizados se basaron en los procedimientos descritos por Curzon et al. (2009) para CMC en roedores. Las dosis de corticosterona utilizadas se basaron en las utilizadas por Medina et al. (2007). A continuación se presentan los métodos generales, comunes a los tres experimentos de esta tesis; posteriormente se presentarán los métodos particulares de cada experimento.

6.1 Metodología general

6.1.1 Sujetos

Ratas macho de la cepa Wistar de entre 250 y 350 g se mantuvieron individualmente en cajas de plástico transparente (47.5 cm. de largo, 26 cm. de ancho y 20 cm. de altura) con acceso *ad libitum* a agua y comida (Rodent Lab Chow) en el bioterio del laboratorio de Aprendizaje y Memoria del Instituto de Neurobiología, UNAM. La temperatura del bioterio se mantuvo a 22 °C, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (las luces se apagaron a las 19:00 h). Los sujetos permanecieron en el bioterio del laboratorio por lo menos una semana para acostumbrarse a las condiciones del lugar. Todos los procedimientos experimentales se realizaron entre las 10:00 y las 15:00 horas, durante los niveles más bajos del ciclo de corticosterona de la rata (Hui et al., 2004).

6.1.2 Manipulación

Se manipuló a cada uno de los sujetos experimentales durante 3 minutos por tres días consecutivos antes del entrenamiento.

6.1.3 Aparatos

El entrenamiento y la prueba se realizaron en una cámara de actividad motora VersaMax Activity Monitor VMXYZ (AccuScan Instruments Inc., Ohio), que consta de una caja de acrílico transparente (40.5 cm. de largo, 40.5 cm. de ancho, 26.0 cm. de altura) donde se mide la actividad a través de una red de haces de luz infrarroja (16 por cada eje, X, Y y Z) que se ven interrumpidos cuando el animal se mueve dentro de la caja. El piso de la caja está hecho de una serie de barras metálicas igualmente espaciadas (1.17cm.) que atraviesan la caja transversalmente y una cama de aserrín en el fondo. El choque eléctrico se suministró a través de las barras metálicas con un estimulador de corriente constante (Coulbourn Instruments, Pennsylvania). La cámara cuenta con un techo movable de acrílico. La cámara de actividad motora se localiza dentro de una habitación sonoamortiguada. Los datos del experimento son registrados con ayuda de una computadora y software especializado fuera de la habitación de experimentación.

6.1.4 Variables

La actividad del sujeto durante el experimento es reportada por el sistema VersaMax por diferentes variables en muestras de un minuto. Una de estas variables indica el tiempo que el animal se movió (MOVTIME) al registrar interrupciones en los haces de rayos infrarrojos con duración mayor a un segundo. El tiempo en inactividad (RESTIME) es calculado como la diferencia entre el tiempo de la muestra (60 segundos) y el tiempo en movimiento.

6.2 Experimento 1

El primer experimento sirvió para validar las condiciones experimentales de la tarea de condicionamiento de miedo al contexto.

6.2.1 Grupos y tratamientos

El diseño experimental consistió de los siguientes grupos:

- Grupo Control Sin Choque (CI), 0 mA, n=6
- Grupo Control Con Choque (CC), 0.6 mA, 1 s, n=6

6.2.2 Entrenamiento del CMC

El experimento consistió de dos etapas: entrenamiento y prueba, cada uno con una duración de once minutos. Durante el entrenamiento se suministró una serie de choques eléctricos de una intensidad de 0.6 miliamperios (mA) con duración de 1 segundo cada minuto después de un tiempo basal sin choque de 3 minutos para el grupo CC. El último choque fue suministrado al minuto diez. El grupo CI no recibió ningún choque. Después de terminado el entrenamiento se extrajo al sujeto de la cámara y se regresó a su caja. Entre los entrenamientos de cada rata se limpiaron las paredes y las barras metálicas de la cámara con alcohol etílico al 70%.

La prueba de retención se realizó a las 48 horas. Durante la prueba, se regresó al sujeto a la cámara de actividad motora donde los sujetos no fueron expuestos a ningún choque eléctrico.

6.2.3 Análisis estadístico

Los datos reportados y los análisis estadísticos se hicieron con la variable RESTIME. El análisis estadístico del tiempo en inactividad entre grupos se realizó con una prueba t de student y pruebas *post hoc* de Tukey.

6.3 Experimento 2

El segundo experimento sirvió para evaluar si existen diferencias en la retención de la tarea de condicionamiento de miedo al contexto al administrar el choque eléctrico a distintos tiempos durante el entrenamiento.

6.3.1 Grupos y tratamientos

El diseño experimental consistió de los siguientes grupos

- Choque min 1 (CC1), 1.0 mA, 1 s, n=10
- Choque min 3 (CC3), 1.0 mA, 1 s, n=10
- Choque min 5 (CC5), 1.0 mA, 1 s, n=10

6.3.2 Entrenamiento del CMC

Durante el entrenamiento se suministró una serie de choques eléctricos de una intensidad de 1.0 miliamperios (mA) con duración de 1 segundo cada minuto después de un tiempo basal sin choque de 1 minuto para el grupo CC1, de 3 minutos para el grupo CC3 y de 5 minutos para el grupo CC5 (Fig. 7). El último choque fue suministrado al minuto diez. Después de terminado el entrenamiento se extrajo al sujeto de la cámara y se regresó a su caja. Entre los entrenamientos de cada rata se limpiaron las paredes y las barras metálicas de la cámara con alcohol etílico al 70%.

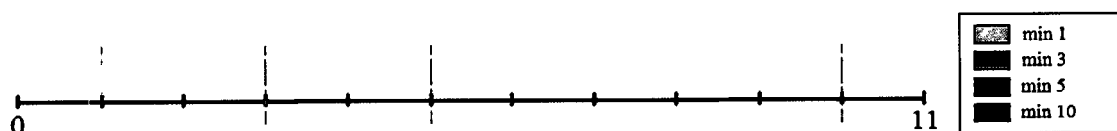


Figura 7. Línea de tiempo del entrenamiento. Para el grupo CC1 el primer choque fue suministrado al minuto uno, para el CC3 al minuto tres y para el CC5 al minuto cinco. El último choque fue suministrado al minuto diez.

La prueba de retención se realizó a las 24 horas. Durante la prueba, se regresó al sujeto a la cámara de actividad motora donde los sujetos no fueron expuestos a ningún choque eléctrico.

6.3.3 Análisis estadístico

Los datos reportados y los análisis estadísticos se hicieron con la variable RESTIME. El análisis estadístico del tiempo en inactividad entre grupos se realizó con pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y pruebas *post hoc* de Tukey.

6.4 Experimento 3

El tercer experimento sirvió para evaluar si existen diferencias en la retención de la tarea de condicionamiento de miedo al contexto cuando se administra corticosterona en el estriado dorsomedial (DM) y en el estriado dorsolateral (DL) de la rata.

6.4.1 Cirugía

La implantación bilateral de cánulas se realizó por medio de cirugía estereotáxica. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (Sedalphorte, 45 mg/kg) y atropina (Atropisa, 0.4 mg/ml) administrados intraperitonealmente. Se rasuró la piel del cráneo y se fijó la cabeza en un aparato estereotáxico (Stoelting Co., Illinois). Posteriormente se incidió la piel a nivel de la línea media del cráneo en una longitud aproximada de 1.5 cm. Con un taladro de uso fino se realizaron dos orificios pequeños en el cráneo a través de los cuales se introdujeron cánulas guías de 11 mm de largo, fabricadas con tubo de aguja hipodérmica de acero inoxidable del número 23. La implantación de las cánulas para el estriado dorsomedial se realizó con las coordenadas AP +0.8, ML \pm 2.2, DV -4.0 y para el estriado dorsolateral con las coordenadas AP +0.8, ML \pm 3.7, DV -4.6

según coordenadas estereotáxicas de Featherstone y McDonald (2004a) y Ragazzino et al. (2009) para cada región. Un tercer orificio se utilizó para colocar un tornillo y fijar las cánulas con cemento dental. A cada cánula se le colocó un tapón-estilete de 11 mm de longitud. Las ratas se dejaron recuperar por 5 días posteriores a la cirugía.

6.4.2 Preparación de fármacos

La solución stock de corticosterona (Sigma) se preparó con 5 mg de corticosterona disuelta en 3.33 ml de etanol. De este stock se preparó una dosis de 30 ng (200 µl del stock + 9,800 µl de solución salina isotónica), de la cual se prepararon las otras diluciones: de 20 ng (2000 µl de dosis de 30 ng + 1000 µl de vehículo), de 10 ng (2,000 µl de dosis de 30 ng + 4,000 µl de vehículo) y de 5 ng (1,000 µl de dosis de 30 ng + 5,000 µl de vehículo). El vehículo se preparó con 19,600 µl de solución salina isotónica + 400 µl de etanol. Todos los fármacos fueron preparados el día de la administración.

6.4.3 Grupos y tratamientos

El diseño experimental consistió de los siguientes grupos:

- Grupos experimentales con microinyección en estriado dorsomedial
 - Vehículo (**DM-Veh**), n=12
 - Corticosterona 5 ng (**DM-Cort5**), n=10
 - Corticosterona 10 ng (**DM-Cort10**), n=12
 - Corticosterona 20 ng (**DM-Cort20**), n=12
- Grupos experimentales con microinyección en estriado dorsolateral
 - Vehículo (**DL-Veh**), n=10
 - Corticosterona 5 ng (**DL-Cort5**), n=8
 - Corticosterona 10 ng (**DL-Cort10**), n=9
 - Corticosterona 20 ng (**DL-Cort20**), n=7

6.4.4 Entrenamiento del CMC

El experimento consistió de dos etapas: entrenamiento y prueba, cada uno con una duración de once minutos. Durante el entrenamiento se suministró una serie de choques eléctricos de una intensidad de 0.6 miliamperios (mA) con duración de 1 segundo cada minuto después de un tiempo basal sin choque de 3 minutos para el grupo CC. El último choque fue suministrado al minuto diez. Después de terminado el entrenamiento se extrajo al sujeto de la cámara y se regresó a su caja. Inmediatamente después de terminado el entrenamiento se extrajo al sujeto de la cámara y se le administró el fármaco correspondiente con ayuda de una bomba de inyección automática (WPI, modelo 220i). Los microinyectores fueron hechos de tubo de aguja hipodérmica de acero inoxidable del número 30, unidos a tubo de polietileno y conectados a microjeringas Hamilton. Los microinyectores bajaron a 2 mm de la punta de la cánula para llegar a la estructura cerebral correspondiente. El volumen del fármaco inyectado fue de 0.5 μ l y se inyectó a una velocidad de 0.5 μ l/min. Pasado el minuto de inyección, se dejó el microinyector en la cánula guía por otro minuto para asegurar la difusión. Luego de terminado este procedimiento se devolvió la rata a su caja. Entre los entrenamientos de cada rata se limpiaron las paredes y las barras metálicas de la cámara con alcohol etílico al 70%.

6.4.5 Histología

Posterior a la prueba de retención, las ratas se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico y se perfundieron intracardiamente con solución salina isotónica seguida de formaldehído al 10% para ser decapitadas posteriormente. Los cerebros fueron removidos e inmersos en una solución de formaldehído al 10% para una mejor fijación del tejido. Se realizaron secciones coronales a 50 μ m de espesor en un criostato. Los cortes fueron teñidos con cresil violeta (técnica de Nissl) y se examinaron bajo un microscopio óptico. Se evaluó la ubicación de las cánulas y se descartaron del estudio aquellos cerebros donde no

se apreciaron las puntas de los microinyectores dentro del área del estriado dorsomedial o dorsolateral.

6.4.6 Análisis estadístico

Los datos reportados y los análisis estadísticos se hicieron con la variable RESTIME. El análisis estadístico del tiempo en inactividad entre grupos se realizó con pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y pruebas *post hoc* de Tukey.

VII. RESULTADOS

7.1 Experimento 1

7.1.1 Resultados conductuales

Los animales que recibieron choques eléctricos (**CC**) durante el entrenamiento mostraron un incremento de la inactividad mayor que la del grupo que no recibió choques (**CI**). El análisis del tiempo en inactividad entre el primer y el último minutos del entrenamiento para los grupos **CI** (0 mA) y **CC** (0.6 mA) utilizando una prueba t de student para evaluar si existían diferencias entre la inactividad al principio y al final de la tarea, indicó que **CI** no mostró diferencias ($P = 0.482$) y **CC** mostró una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.043$, Fig. 8).

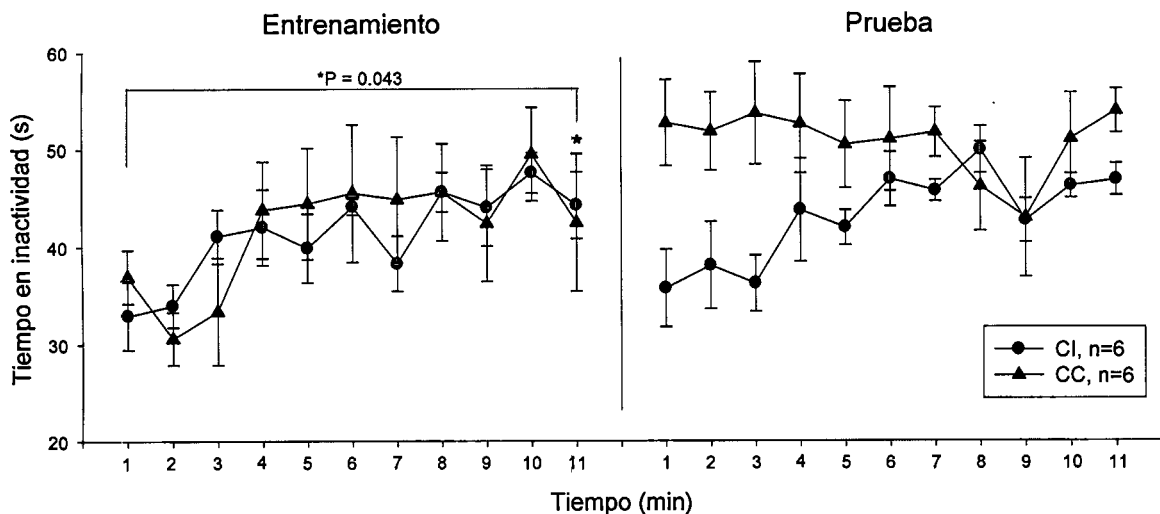


Figura 8. Tiempo en inactividad por minuto de los grupos sin choque (**CI**, 0 mA) y con choque (**CC**, 0.6 mA) durante el entrenamiento y la prueba a las 48 horas del condicionamiento de miedo al contexto (CMC). Los datos se expresan como la media \pm Error Estándar de la Media (EEM). El número de animales (n) se muestra después del nombre del grupo.

El análisis del tiempo en inactividad después del último choque durante el entrenamiento para los grupos **CI** (0 mA) y **CC** (0.6 mA) utilizando una prueba t de

student para evaluar si existían diferencias significativas en la adquisición de la tarea, indicó que **CI** y **CC** no mostraron diferencias ($P = 0.826$; Fig. 9).

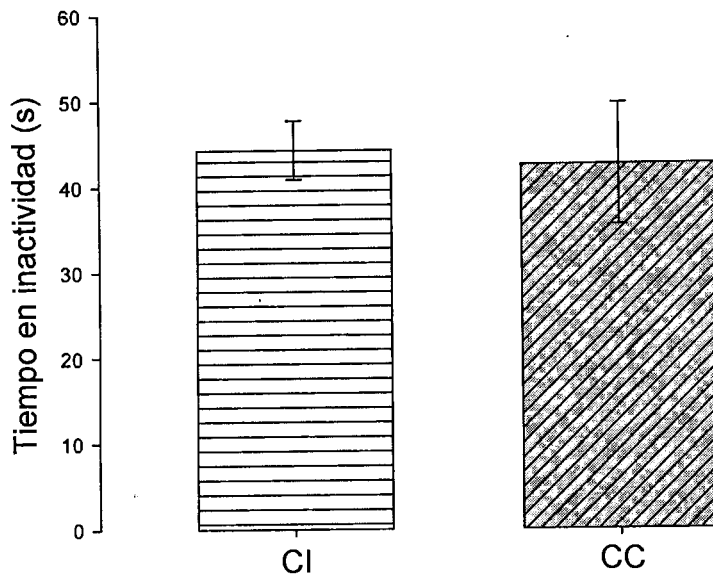


Figura 9. Tiempo en inactividad de los grupos sin choque (**CI**, 0 mA, n=6) y con choque (**CC**, 0.6 mA, n=6) durante el minuto once del entrenamiento del CMC. Los datos se expresan como la media \pm EEM.

El análisis del tiempo en inactividad durante los primeros tres minutos de la prueba utilizando una prueba t de student para evaluar si existían diferencias significativas en la retención de la tarea entre los grupos, indicó que **CI** y **CC** mostraron diferencias significativas ($P = 0.009$; Fig. 10).

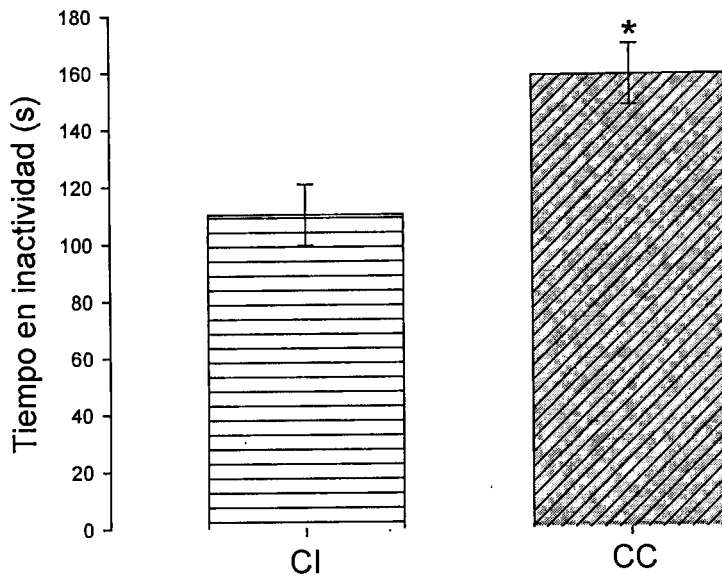


Figura 10. Tiempo en inactividad de los grupos sin choque (CI, 0 mA, n=6) y con choque (CC, 0.6 mA, n=6) durante los primeros tres minutos de la prueba de retención a las 48 horas del CMC. Los datos se expresan como la media \pm EEM. *P = 0.009.

7.2 Experimento 2

7.2.1 Resultados conductuales

Los animales que recibieron el primer choque eléctrico al minuto 1 del entrenamiento (CC1) mostraron un incremento de la inactividad, previa a los grupos que lo recibieron al minuto 3 (CC3) y al minuto 5 (CC5). El análisis del tiempo en inactividad entre el primer y el último minutos del entrenamiento para los grupos CC1 (primer choque al min 1), CC3 (primer choque al min 3) y CC5 (primer choque al min 5) utilizando una prueba t de student para evaluar si existían diferencias entre la inactividad al principio y al final de la tarea, indicó que los tres grupos mostraron diferencias estadísticamente significativas: CC1 ($P < 0.001$), CC3 ($P < 0.001$) y CC5 ($P < 0.001$, Fig. 11).

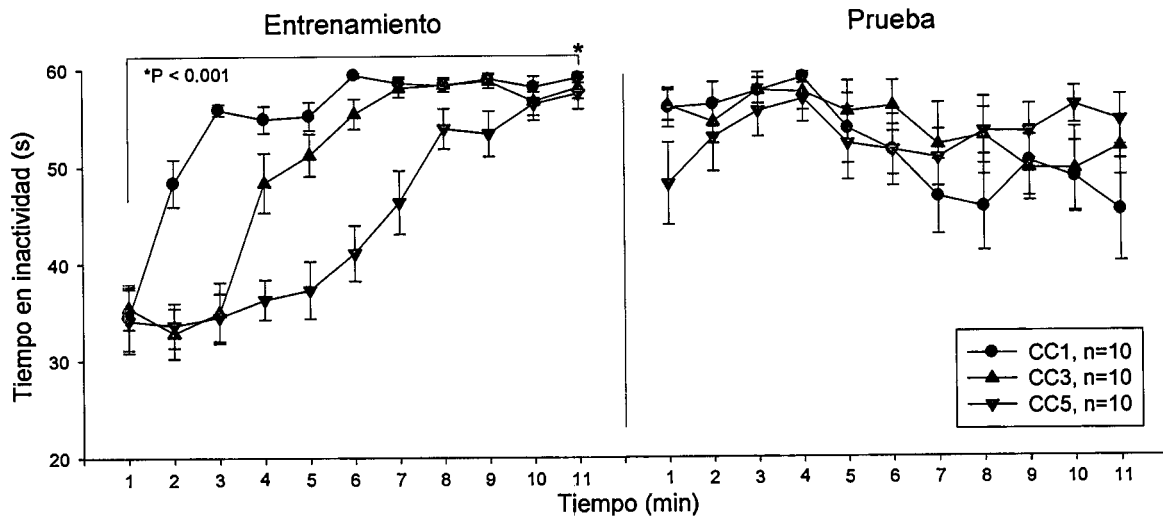


Figura 11. Tiempo en inactividad por minuto de los grupos **CC1** (primer choque al min 1, n=10), **CC3** (min 3, n=10) y **CC5** (min 5, n=10), choque eléctrico de 1.0 mA; durante el entrenamiento y la prueba a las 24 horas del condicionamiento de miedo al contexto (CMC). Los datos se expresan como la media \pm EEM. El número de animales (n) se muestra después del nombre del grupo.

El análisis del tiempo en inactividad después del último choque eléctrico durante el entrenamiento para los grupos **CC1** (primer choque al min 1), **CC3** (primer choque al min 3) y **CC5** (primer choque al min 5) utilizando una prueba ANOVA de una vía para evaluar si existían diferencias significativas en la adquisición de la tarea entre los grupos, indicó que **CC1**, **CC3** y **CC5** no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($F_{2,27} = 0.501$, $P = 0.611$; Fig. 12).

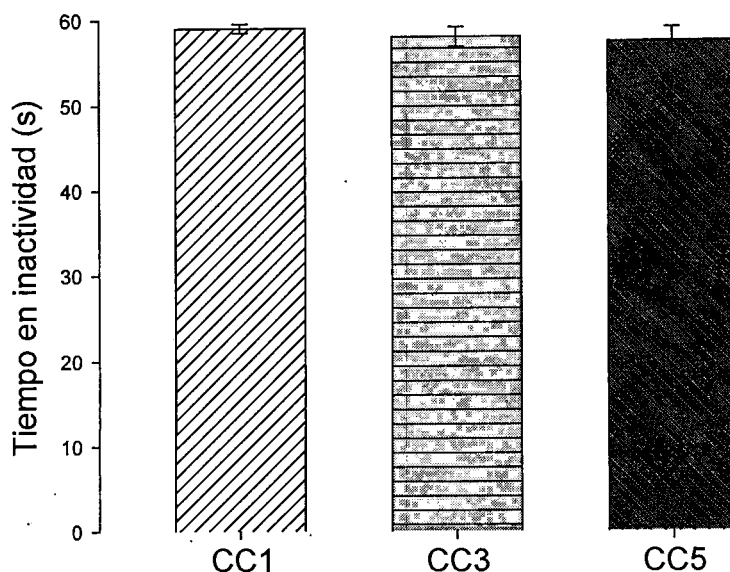


Figura 12. Tiempo en inactividad de los grupos **CC1** (primer choque al min 1, n=10), **CC3** (min 3, n=10) y **CC5** (min 5, n=10), choque eléctrico de 1.0 mA; durante el último minuto del entrenamiento del CMC. Los datos se expresan como la media ±EEM.

El análisis del tiempo en inactividad durante los primeros tres minutos de la prueba utilizando una prueba ANOVA de una vía para evaluar si existían diferencias significativas en la retención de la tarea entre los grupos, indicó que CC1, CC3 y CC5 no mostraron diferencias significativas ($F_{2,27} = 1.189$, $P = 0.320$; Fig. 13).

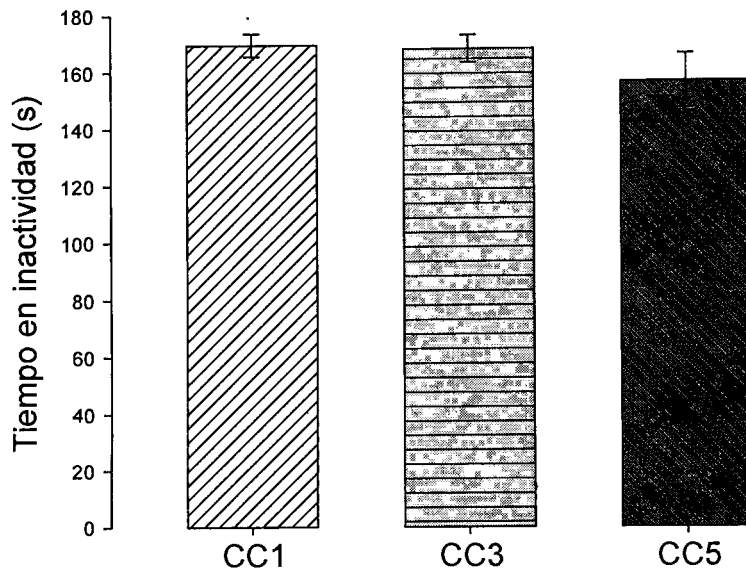
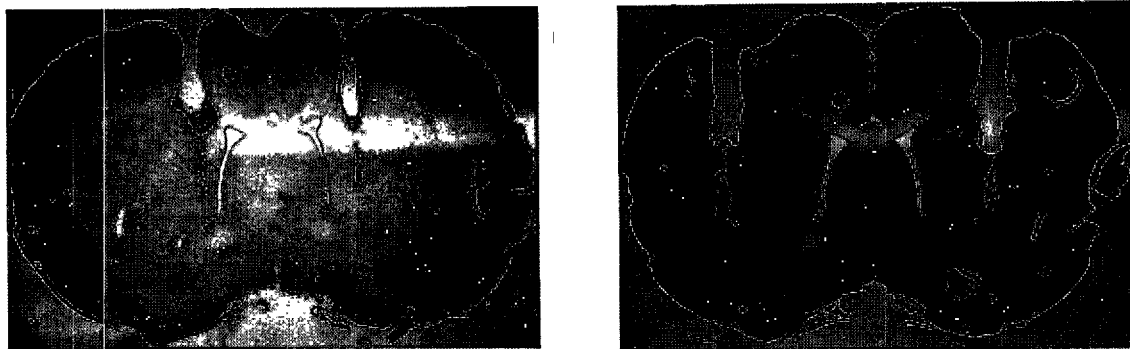


Figura 13. Tiempo en inactividad de los grupos **CC1** (primer choque al min 1, n=10), **CC3** (min 3, n=10) y **CC5** (min 5, n=10), choque eléctrico de 1.0 mA; durante los primeros 3 minutos de la prueba de retención a las 24 horas del CMC. Los datos se expresan como la media \pm EEM.

7.3 Experimento 3

7.3.1 Histología

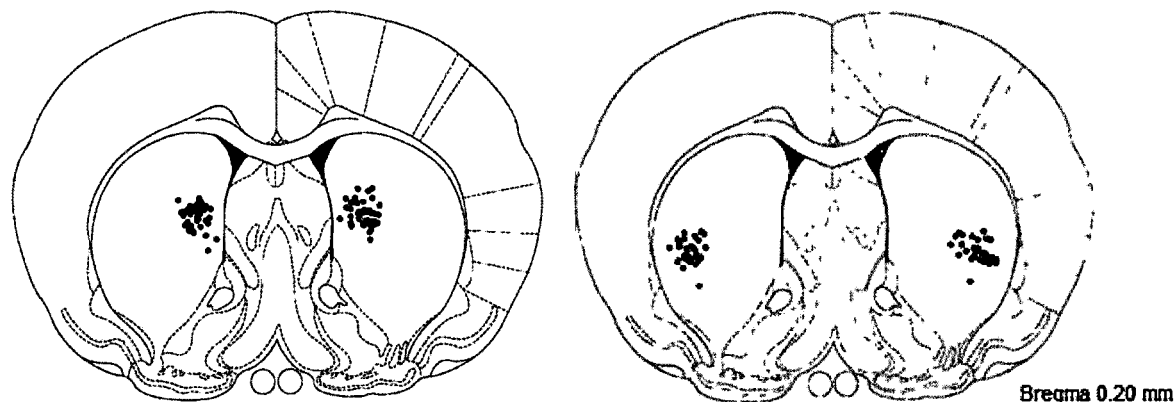
El análisis histológico consistió en el análisis de la ubicación de las puntas de las cánulas en cada una de las ratas. Los datos de las ratas cuyas cánulas no estuvieron en los sitios indicados fueron excluidos del análisis estadístico (Fig. 14 y Fig. 15).



A

B

Figura 14. Fotografía de un corte coronal del cerebro de rata, se muestra la marca de implantación bilateral de las cánulas en el estriado dorsomedial (A) y dorsolateral (B) teñido con la técnica de Nissl. Ambas fotos fueron tomadas con un microscopio de campo claro (Nikon, Eclipse E600, Japón).



A

B

Figura 15. Diagramas de cortes coronales de los cerebros a nivel del estriado dorsomedial (A) y dorsolateral (B) de la rata (Bregma 0.2) en los que se hace una representación esquemática de las regiones donde se localizaron las puntas de los inyectores de todas las ratas incluidas en el estudio. Esquemas modificados del Atlas de Paxinos y Watson (1998).

7.3.2 Resultados conductuales

Los grupos que fueron administrados con corticosterona o vehículo en estriado dorsomedial y dorsolateral mostraron un incremento de la inactividad luego del suministro de choques eléctricos. El análisis del tiempo en inactividad entre el primer y el último minutos del entrenamiento para los **DM-Veh** (vehículo),

DM-Cort5 (Cort. 5 ng), **DM-Cort10** (Cort. 10 ng) y **DM-Cort20** (Cort. 20 ng) utilizando una prueba t de student para evaluar si existían diferencias entre la inactividad al principio y al final de la tarea, indicó que los tres grupos mostraron diferencias estadísticamente significativas: **DL-Veh** ($P < 0.001$), **DL-Cort5** ($P < 0.001$), **DL-Cort10** ($P < 0.001$) y **DL-Cort20** ($P = 0.000$, Fig. 16).

El análisis del tiempo en inactividad entre el primer y el último minutos del entrenamiento para los grupos **DL-Veh** (vehículo), **DL-Cort5** (Cort. 5 ng), **DL-Cort10** (Cort. 10 ng) y **DL-Cort20** (Cort. 20 ng) utilizando una prueba t de student para evaluar si existían diferencias entre la inactividad al principio y al final de la tarea, indicó que los cuatro grupos mostraron diferencias estadísticamente significativas: **DL-Veh** ($P < 0.001$), **DL-Cort5** ($P < 0.001$), **DL-Cort10** ($P < 0.001$) y **DL-Cort20** ($P < 0.001$, Fig. 17).

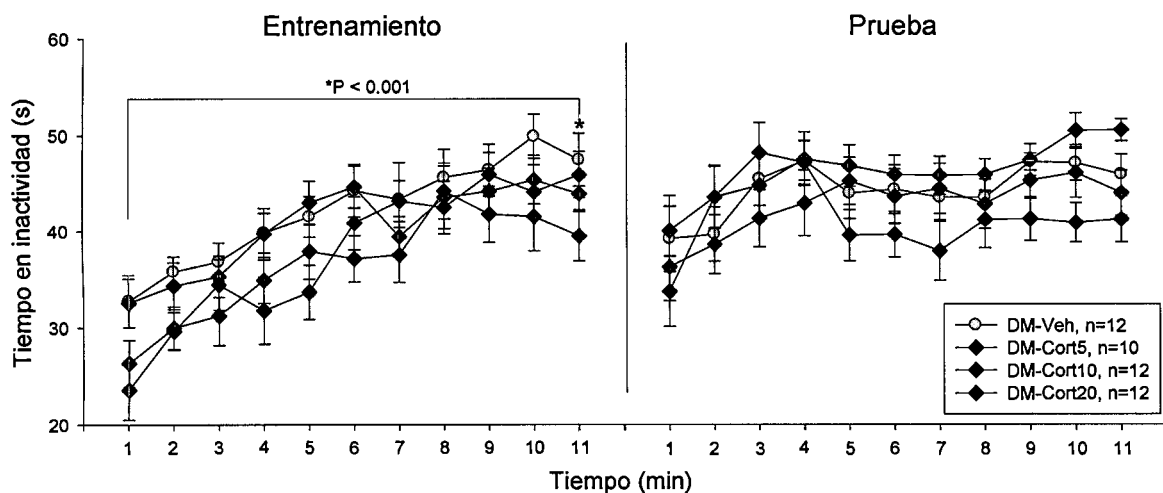


Figura 16. Tiempo en inactividad por minuto de los grupos a los que se administró corticosterona o vehículo en estriado dorsomedial: **DM-Veh** (vehículo, $n=12$), **DM-Cort5** (5 ng, $n=10$), **DM-Cort10** (10 ng, $n=12$) y **DM-Cort20** (20 ng, $n=12$) durante el entrenamiento y la prueba a las 48 horas del CMC. Los datos se expresan como la media del tiempo en inactividad (\pm EEM).

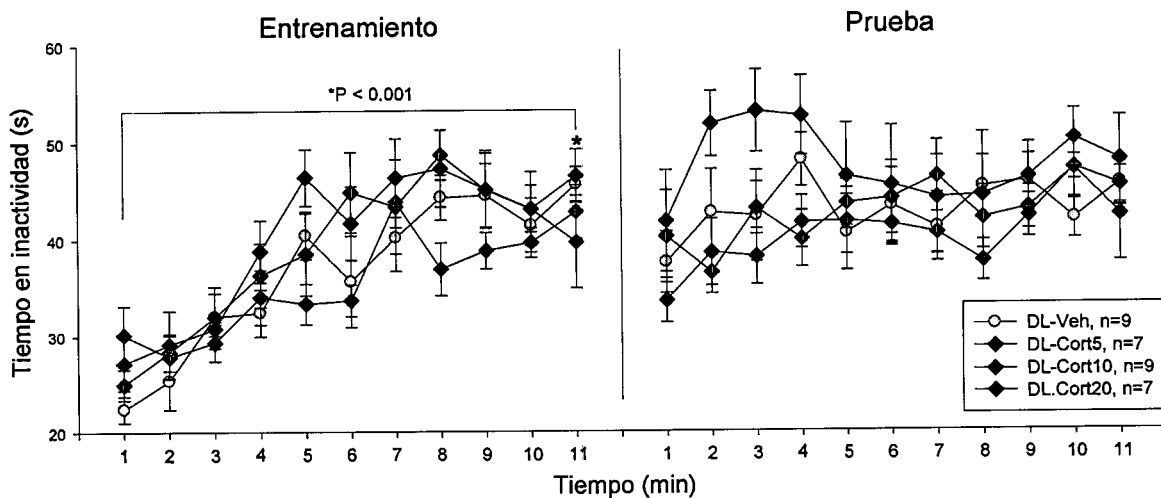


Figura 17. Tiempo en inactividad por minuto de los grupos a los que se administró corticosterona o vehículo en estriado dorsolateral: **DL-Veh** (vehículo, n=9), **DL-Cort5** (5 ng, n=7), **DL-Cort10** (10 ng, n=9), **DL-Cort20** (20 ng, n=7), durante el entrenamiento y la prueba a las 48 horas del CMC. Los datos se expresan como la media del tiempo en inactividad (\pm EEM).

El análisis del tiempo en inactividad después del último choque eléctrico durante el entrenamiento para los grupos que serían administrados con una dosis de fármaco en estriado dorsomedial, DM-Veh (vehículo), DM-Cort5 (5 ng), DM-Cort10 (10 ng) y DM-Cort20 (20 ng); y en estriado dorsolateral, DL-Veh (vehículo), DL-Cort5 (5 ng), DL-Cort10 (10 ng) y DL-Cort20 (20 ng) utilizando una prueba ANOVA de dos vías para evaluar si existían diferencias significativas en la adquisición de la tarea entre los grupos, no mostró diferencias en los grupos con cánulas en estriado dorsomedial y los grupos con cánulas en estriado dorsolateral ($F_{1,61} = 0.0000199$, $P = 0.996$) no mostró diferencias entre los grupos ($F_{3,61} = 1.016$, $P = 0.392$, Fig. 18).

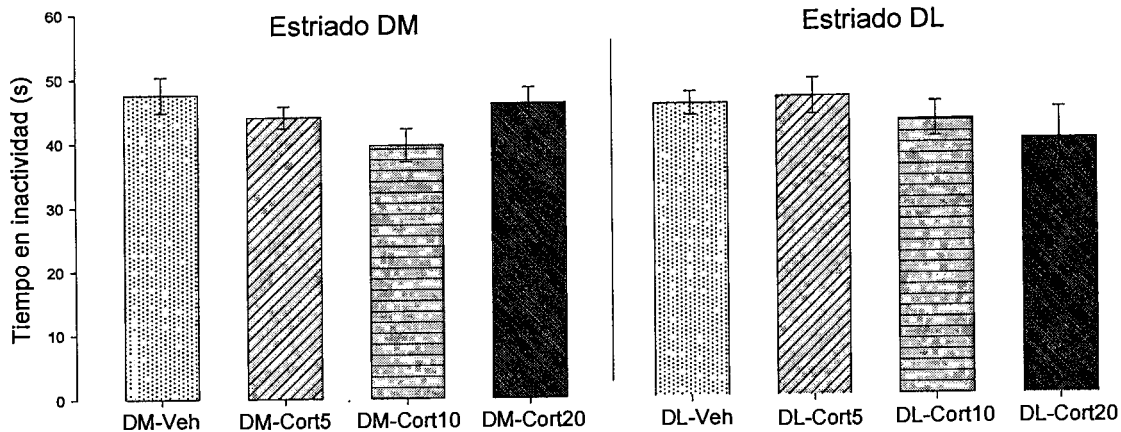


Figura 18. Tiempo en inactividad de los grupos a los que se administraría corticosterona en estriado dorsomedial, **DM-Veh** (vehículo, n=12), **DM-Cort5** (5 ng, n=10), **DM-Cort10** (10 ng, n=12), **DM-Cort20** (20 ng, n=12); y en estriado dorsolateral **DL-Veh** (vehículo, n=9), **DL-Cort5** (5 ng, n=7), **DL-Cort10** (10 ng, n=9), **DL-Cort20** (20 ng, n=7) durante el último minuto del entrenamiento del CMC. Los datos se expresan como la media del tiempo en inactividad (\pm EEM).

El análisis del tiempo en inactividad durante los primeros tres minutos de la prueba utilizando una prueba ANOVA de dos vías para evaluar si existían diferencias significativas en la retención de la tarea entre los grupos, no mostró diferencias en los grupos inyectados en estriado dorsomedial y los grupos inyectados en estriado dorsolateral ($F_{1,61} = 0.0602$, $P = 0.807$) ni mostró diferencias entre los grupos (vehículo o dosis de corticosterona, $F_{3,61} = 1.607$, $P = 0.197$; Fig. 19).

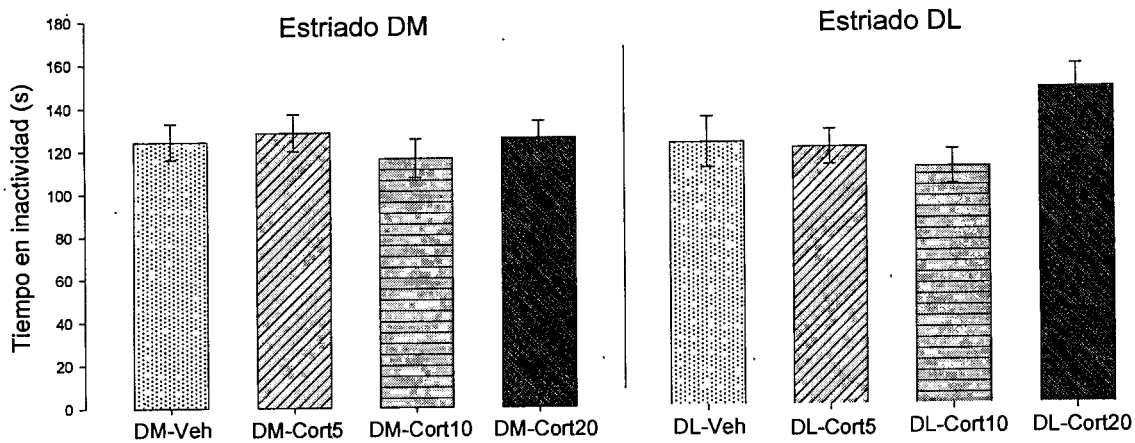


Figura 19. Retención del CMC de los grupos a los que se administró corticosterona en estriado dorsomedial, **DM-Veh** (vehículo, n=12), **DM-Cort5** (5 ng, n=10), **DM-Cort10** (10 ng, n=12), **DM-Cort20** (20 ng, n=12); y en estriado dorsolateral **DL-Veh** (vehículo, n=9), **DL-Cort5** (5 ng, n=7), **DL-Cort10** (10 ng, n=9), **DL-Cort20** (20 ng, n=7), durante los primeros tres minutos de la prueba. Los datos se expresan como la media del tiempo en inactividad (\pm EEM).

VIII. DISCUSIÓN

El primer experimento consistió en determinar si la aplicación de choques eléctricos provoca una respuesta de congelamiento en el CMC. Los resultados indican que al suministrar choques eléctricos cada minuto a partir del minuto 3 durante el entrenamiento, no existieron diferencias en la actividad motora (tiempo que los sujetos experimentales permanecieron inactivos) con respecto a la que se observó al no suministrar ningún choque. Sin embargo, al introducirse un sujeto experimental en un ambiente nuevo, luego de algún tiempo, su actividad motora decae (la inactividad aumenta), por lo que la comparación de la actividad motora al final del entrenamiento con o sin choque resulta inexacta. Se pueden observar diferencias en la actividad motora de los grupos en la prueba de retención, donde los sujetos que recibieron choques eléctricos (0.6 mA) muestran, desde el inicio de la prueba, una supresión de la actividad motora mayor que la del grupo que no recibió ningún choque eléctrico. Es decir, los choques eléctricos con una intensidad media (0.6 mA) son suficientes para provocar una respuesta de congelamiento, y por lo tanto una activación del sistema de miedo, consistente con estudios anteriores (Curzon et al., 2009; Fanselow, 1984).

En el experimento 2, se suministró el primer choque eléctrico a diferentes tiempos (1, 3 o 5 min); aumentando el tiempo de exposición del sujeto al contexto previo al suministro del primer choque eléctrico y variando el número de choques eléctricos recibidos por cada grupo, siendo el grupo del primer choque eléctrico al minuto 1 el que recibió más (10 choques en total) y el minuto 5 el que recibió menos (6 choques en total) para evaluar si existían diferencias en la retención de la tarea. La intensidad del choque eléctrico suministrado fue de 1.0 mA (1s). Acorde a Curzon et al. (2009) y Fanselow (1984) y protocolos experimentales de otros estudios (Abrari et al., 2009; Ferreira et al., 2003; Hui et al., 2004) el tiempo basal de exposición a la cámara de experimentación antes de suministrar el primer choque debe ser de por lo menos 120 s (2 min) para que el sujeto asocie el contexto con el estímulo adverso. Los resultados del entrenamiento demuestran

que la inactividad incrementó primero en el grupo al que le fue suministrado el choque eléctrico al minuto 1 (CC1), luego al que le fue suministrado al minuto 3 (CC3) y finalmente al del minuto 5 (CC5); sin embargo, la tarea fue adquirida de manera semejante, ya que no existieron diferencias en la inactividad de los tres grupos durante el último minuto del entrenamiento. En la prueba de retención, donde se esperaba un mayor congelamiento en el grupo con la exposición a un número mayor de choques eléctricos (CC1), no se observaron diferencias significativas entre los grupos. Fanselow (1984) sugiere que la respuesta de congelamiento puede ocurrir con un solo apareamiento EC-EI, por lo que la exposición del sujeto a choques eléctricos de intensidad alta de manera repetida cada minuto, sin importar el tiempo de exposición previa al contexto, provoca una respuesta de congelamiento muy alta, por lo que el número de presentaciones al estímulo y la intensidad del choque provocaron la misma intensidad de activación del sistema de miedo.

En el tercer experimento se suministraron choques eléctricos de intensidad media (0.6 mA, 1 s) cada minuto, con un tiempo de exposición previa al contexto de 3 minutos para evaluar si existían diferencias en la retención de la tarea de CMC al administrar corticosterona o vehículo en el estriado dorsomedial (DM) y en el estriado dorsolateral (DL). En el entrenamiento no se encontraron diferencias en la adquisición del CMC, por lo que la tarea fue aprendida de igual manera en todos los grupos. En la prueba de retención, la prueba estadística de ANOVA de dos vías, demostró que no existieron diferencias significativas en el tiempo en inactividad entre el grupo al que se administró vehículo y los grupos a los que se administró corticosterona en el estriado dorsomedial y en el estriado dorsolateral, por lo que no se observó un efecto de facilitación de la droga. Tampoco se observaron diferencias entre los grupos que fueron inyectados en estriado dorsomedial y los que fueron inyectados en estriado dorsolateral; por lo que el hallazgo más importante del presente estudio es que la administración de corticosterona en dos regiones del estriado dorsal no produce una facilitación en la memoria de CMC. Estudios relacionados han demostrado que la lesión bilateral

del estriado deteriora el aprendizaje de un condicionamiento de miedo al tono (TFC, Ferreira et al., 2003; Ferreira et al., 2008) y se ha señalado que el estriado contribuye al congelamiento (White y Salinas, 2003) y a la consolidación de las memorias emocionales (LeDoux, 1993). Aunque esta estructura posee una gran cantidad de receptores a glucocorticoides (Morimoto et al., 1996) y se haya observado que la administración de corticosterona potencia tareas de evitación inhibitoria, que constituyen un condicionamiento operante (Medina et al., 2007); la activación de los receptores a glucocorticoides en estas dos áreas del estriado, aparentemente no está relacionada a procesos neuronales involucrados en esta tarea de condicionamiento clásico. Esta proposición también está apoyada por los resultados obtenidos al lesionar electrolíticamente el estriado dorsal en ratas que fueron entrenadas en una tarea de CMC en la que se midieron los cambios en la frecuencia cardíaca como índice de aprendizaje. Se encontró que, a pesar de la lesión, los animales fueron capaces de adquirir dicha respuesta condicionada (Reyes-Vázquez *et al.*, 1979).

En conjunto, los datos reportados en esta tesis y los descritos en el párrafo anterior nos permiten concluir que el estriado no participa en el condicionamiento de miedo al contexto, en particular y probablemente en algunos procesos del condicionamiento clásico.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abel, T., and K. M. Lattal. 2001. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 180-187.
- Abrari, K., A. Rashidy-Pour, S. Semnanian, and Y. Fathollahi. 2009. Post-training administration of corticosterone enhances consolidation of contextual fear memory and hippocampal long-term potentiation in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 91: 260-265.
- Bolles, R. C. 1970. Species-specific defense reactions and avoidance learning. *Psychol. Rev.* 77: 32-48.
- Buijs, R. M., A. Kalsbeek, T. P. Vanderwoude, J. J. Vanheerikhuize, and S. Shinn. 1993. Suprachiasmatic nucleus lesion increases corticosterone secretion. *Am. J. Physiol.* 264: R1186-R1192.
- Buijs, R. M., C. G. van Eden, V. D. Goncharuk, and A. Kalsbeek. 2003. The biological clock tunes the organs of the body: Timing by hormones and the autonomic nervous system. *J. Endocrinol.* 177: 17-26.
- Cahill, L., and J. L. McGaugh. 1996a. Modulation of memory storage. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 237-242.
- Cahill, L., and J. L. McGaugh. 1996b. The neurobiology of memory for emotional events: Adrenergic activation and the amygdala. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 39: 81-84.
- Cahill, L., B. Prins, M. Weber, and J. L. McGaugh. 1994. Beta-adrenergic activation and memory for emotional events. *Nature* 371: 702-704.
- Curzon, P., N. R. Rustay, and K. E. Browman. 2009. Cued and contextual fear conditioning for rodents. In: J. J. Buccafusco (ed.) *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Chance, W. T., A. C. White, G. M. Krynock, and J. A. Rosencrans. 1978. Conditional fear-induced antinociception and decreased binding of [3h]n-leu-enkephalin to rat brain. *Brain Res.* 141: 371-374.
- Dudai, Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol.* 55: 51-86.
- Fanselow, M. S. 1984. What is conditioned fear? *Trends Neurosci.* 7: 460-462.
- Fanselow, M. S. 1986. Associative vs topographical accounts of the immediate shock-freezing deficit in rats: Implications for the response selection rules governing species-specific defensive reactions. *Learn. Motiv.* 17: 16-39.
- Fanselow, M. S., and L. S. Lester. 1988. A functional behavioristic approach to aversively motivated behavior. Predatory imminence as a determinant of the topography of defensive behavior. In: R. C. Bolles and M. D. Beecher (eds.) *Evolution and Learning*. p 185-211. Lawrence Erlbaum Associates, Inc., Hillsdale, NJ.
- Featherstone, R. E., and R. J. McDonald. 2004a. Dorsal striatum and stimulus-response learning: Lesions of the dorsolateral, but not dorsomedial, striatum impair acquisition of a simple discrimination task. *Behav. Brain Res.* 150: 15-23.
- Featherstone, R. E., and R. J. McDonald. 2004b. 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: 23-31.
- Featherstone, R. E., and R. J. McDonald. 2005a. Lesions of the dorsolateral or dorsomedial striatum impair performance of a previously acquired simple discrimination task. *Neurobiol. Learn. Mem.* 84: 159-167.
- Featherstone, R. E., and R. J. McDonald. 2005b. Lesions of the dorsolateral striatum impair the acquisition of a simplified stimulus-response dependent conditional discrimination task. *Neuroscience* 136: 387-395.
- Ferreira, T. L., K. M. Moreira, D. C. Ikeda, Q. F. A. Bueno and M. G. M. Oliveira. 2003. Effects of dorsal striatum lesions in tone fear conditioning and contextual fear conditioning. *Brain Res.* 987: 17-24.
- Ferreira, T. L., S. J. Shammah-Lagnado, Q. F. A. Bueno, K. M. Moreira, R. V. Fornari and M. G. M. Oliveira. 2008. The indirect amygdala-dorsal striatum pathway mediates conditioned freezing: Insights on emotional memory networks. *Neuroscience* 153: 84-94.
- Gerfen, C. R. 1988. Synaptic organization of the striatum. *Journal of electron microscopy technique* 10: 265-281.
- Goda, Y., and C. F. Stevens. 1996. Synaptic plasticity: The basis of particular types of learning. *Curr. Biol.* 6: 375-378.
- Goddard, G. V. 1964. Amygdaloid stimulation + learning in rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 58: 23-&.
- Gold, P. E., and J. L. McGaugh. 1984. Endogenous processes in memory consolidation. In: H. Weingartner and E. Parker (eds.) *Memory Consolidation.* p 65-83. Lawrence Erlbaum, Hillsdale, NJ.
- Gold, P. E., and R. B. van Buskirk. 1976. Enhancement and impairment of memory processes with post-trial injections of adrenocorticotrophic hormone. *Behav. Biol.* 16: 387-400.
- Haber, S. N., and M. J. Gdowski. 2004. The basal ganglia. In: G. Paxinos and J. K. Mai (eds.) *The Human Nervous System.* p 676-738. Elsevier Academic Press, San Diego, California.
- Hebb, D. O. 1949. *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory.* John Wiley & Sons Inc, New York.
- Heimer, L., D. S. Zahm, and G. F. Alheid. 1995. Basal ganglia. In: G. Paxinos (ed.) *The Rat Nervous System.* p 579-628. Academic Press, San Diego, California.
- Hofer, M. A. 1970. Cardiac and respiratory function during sudden prolonged immobility in wild rodents. *Psychosom. Med.* 32: 633-647.
- Holz, R. W., and S. K. Fisher. 2006. Synaptic transmission and cellular signaling: An overview. In: G. J. Siegel, R. W. Albers, S. Brady and D. Price (eds.) *Basic Neurochemistry.* p 167-183. Elsevier Academic Press, San Diego, California.
- Hui, G. K., I. R. Figueroa, B. S. Poytress, B. Roozendaal, J. L. McGaugh and N. M. Weinberger. 2004. Memory enhancement of classical fear conditioning by post-training injections of corticosterone in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 81: 67-74.

- Introini-Collison, I., D. Saghafi, G. D. Novack, and J. L. McGaugh. 1992. Memory-enhancing effects of post-training dipivefrin and epinephrine: Involvement of peripheral and central adrenergic receptors. *Brain Res.* 572: 81-86.
- ILAR. 1996. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academy Press, Washington, DC.
- Iversen, S., I. Kupfermann, and E. R. Kandel. 2000. Emotional states and feelings. In: E. R. Kandel, J. H. Schwartz and T. M. Jessell (eds.) *Principles of Neural Science*. p 982-997. McGraw-Hill, New York.
- Johnson, A., M. A. van der Meer, and A. D. Redish. 2007. Integrating hippocampus and striatum in decision-making. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17: 692-697.
- Kandel, E. R., I. Kupfermann, and S. Iversen. 2000. Learning and memory. In: E. R. Kandel, J. H. Schwartz and T. M. Jessell (eds.) *Principles of Neural Science*. p 1227-1246. McGraw Hill, New York.
- Kandel, E. R., I. Kupfermann, and S. Iversen. 2006. Learning and memory. In: E. R. Kandel, J. H. Schwartz and T. M. Jessell (eds.) *Principles of Neural Science*. p 1228-1247. McGraw Hill, New York.
- Kawaguchi, Y. 1993. Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J. Neurosci.* 13: 4908-4923.
- LeDoux, J. E. 1993. Emotional memory systems in the brain. *Behav. Brain Res.* 58: 69-79.
- MacLennan, A. J., R. L. Jackson, and S. F. Maier. 1980. Conditioned analgesia in the rat. *Bull. Psychon. Soc.*
- McGaugh, J. L. 1966. Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153: 1351-1358.
- McGaugh, J. L. 1973. *Learning and Memory: An Introduction*. Albion Publishing Co, San Francisco.
- McGaugh, J. L. 1999. The perseveration-consolidation hypothesis: Mueller and pilzecker, 1900. *Brain Res. Bull.* 50: 445-446.
- McGaugh, J. L., L. Cahill, and B. Roozendaal. 1996. Involvement of the amygdala in memory storage: Interaction with other brain systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 13508-13514.
- McGaugh, J. L., and B. Roozendaal. 2002. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12: 205-210.
- McGeorge, A. J., and R. L. Faull. 1989. The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29: 503-537.
- Medina, A. C. J. R. Charles, V. Espinoza-González, O. Sánchez-Resendiz, R. A. Prado-Alcalá, B. Roozendaal and G. L. Quirarte. 2007. Glucocorticoid administration into the dorsal striatum facilitates memory consolidation of inhibitory avoidance training but not of the context or footshock components. *Learn. Mem.* 14: 673-677.
- Milner, B. 1966. Amnesia following operation on the temporal lobes. In: C. W. M. Whitty and O. L. Zangwill (eds.) *Amnesia*. p 109-133. Butterworths, London.
- Morgado, I. 2005. Psicobiología del aprendizaje y la memoria: Fundamentos y avances recientes. *Rev. Neurol.* 40: 289-297.
- Morimoto, M., N. Morita, H. Ozawa, K. Yokoyama, and M. Kawata. 1996. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mrna in the rat

- brain: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci. Res.* 26: 235-269.
- Motta, S. C., M. Goto, F. V. Gouveia, M. V. C. Baldo, N. S. Canteras and L. W. Swanson. 2009. Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 4870-4875.
- Müller, G. E., and A. Pilzecker. 1900. Experimentelle beitrage zur lehre vom gedachtniss. *Zeitschnft für Psychologie Ergänzungsband* 1: 1-288.
- Nicoll, R. A., and R. C. Malenka. 1999. Expression mechanisms underlying nmda receptor-dependent long-term potentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868: 515-525.
- Paxinos, G., and C. Watson. 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (4th ed). Academic Press, New York.
- Penfield, W. 1958. Functional localization in temporal and deep sylvian areas. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 36: 210-226.
- Prado-Alcalá, R. A., and G. L. Quirarte. 2007. La consolidacion de la memoria, un siglo despues. *Rev. Neurol.* 45: 284-292.
- Quirarte, G. L., B. Roozendaal, and J. L. McGaugh. 1997. Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 14048-14053.
- Ragozzino, M. E. 2003. Acetylcholine actions in the dorsomedial striatum support the flexible shifting of response patterns. *Neurobiol. Learn. Mem.* 80: 257-267.
- Ragozzino, M. E., E. G. Mohler, M. Prior, C. A. Palencia, and S. Rozman. 2009. Acetylcholine activity in selective striatal regions supports behavioral flexibility. *Neurobiol. Learn. Mem.* 91: 13-22.
- Reyes-Vazquez, C. T. Ibarra and H. Brust-Carmona. 1979. Persistence of classical conditioned heart rate after extensive lesions of the striatum in rats. *Physiol. Behav.* 22: 1101-1105
- Sandi, C. 1998. The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage. *Neural Plast.* 6: 41-52.
- Seidenbecher, T., K. G. Reymann, and D. Balschun. 1997. A post-tetanic time window for the reinforcement of long-term potentiation by appetitive and aversive stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 1494-1499.
- Sternberg, E. M. 2006. Neural regulation of innate immunity: A coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 318-328.
- Tsien, J. Z. 2006. Learning and memory. In: G. J. Siegel, R. W. Albers, S. Brady and D. Price (eds.) *Basic Neurochemistry*. p 859-874. Elsevier Academic Press, San Diego, California.
- White, N. M., and J. A. Salinas. 2003. Mnemonic functions of dorsal striatum and hippocampus in aversive conditioning. *Behav. Brain Res.* 142: 99-107.