



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Posible interacción de los glucocorticoides y el sistema GABAérgico estriatal en la consolidación de la tarea de evitación inhibitoria”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

EDGAR RODRIGO JUVERA AVALOS

DIRIGIDA POR

Dra. GINA LORENA QUIRARTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Posible interacción de los glucocorticoides y el sistema GABAérgico estriatal en la consolidación de la tarea de evitación inhibitoria”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

EDGAR RODRIGO JUVERA AVALOS

DIRIGIDA POR

Dra. GINA LORENA QUIRARTE

SINODALES

Dra. GINA LORENA QUIRARTE

(DIRECTOR)

Dra. ANGELINA RODRIGUEZ TORRES

(SINODAL)

Dr. CARLOS FRANCISCO SOSA FERREYRA.

(SINODAL)

M. en C. CRISTINA SILLER PÉREZ

(SINODAL)

Agradecimientos

Agradezco a las siguientes dependencias y personas por la gran ayuda brindada durante la realización de esta tesis:

A la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Al Laboratorio de Aprendizaje y Memoria. Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva. Instituto de Neurobiología, Universidad Autónoma de México, Campus Juriquilla.

Al programa PAPIITT de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM por la beca otorgada a través del Donativo IN202414, asimismo al apoyo para el desarrollo del proyecto.

Agradezco de manera muy especial a mi asesora M. en C. Cristina Siller Pérez por su tiempo, por sus consejos guía, su paciencia y sobre todo por su apoyo indispensable para hacer posible este proyecto.

A la Dra. Angelina Torres, por sus valiosas observaciones

Al Dr. Carlos Sosa por su apoyo y disposición en todo momento.

A mi Tutora Dra. Gina L. Quirarte por permitirme ser parte de su grupo de investigación el laboratorio de Aprendizaje y Memoria por su dirección y por permitirme la oportunidad de realizar mi proyecto de tesis.

A la M.V.Z. Norma Serafín por su gran ayuda técnica, especialmente en la edición de imágenes y revisión bibliográfica.

Al Dr. Roberto A. Prado Alcalá y la Dra. Andrea Cristina Medina Fragoso por su gran apoyo.

Al Sr Ángel Méndez Olalde y la Sra. Bertha Islas Rivas por el manejo y cuidado de los animales.

A las siguientes personas de las unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología
Campus UNAM-Juriquilla

Bioterio: M.V.Z. Martín García Servín

Cómputo: Ing. Ramón Martínez Olvera, Ing. Alberto Lara Ruvalcaba, Ing. Omar
González Hernández e I.S.C Sandra Hernández García.

Enseñanza: Mtra Leonor Casanova Rico.

Biblioteca: Lic. Francisco Javier Valles Valenzuela y Lic. Soledad Medina Malagón.

Agradezco especialmente a mi familia, mi hermano Roberto Juvera por su apoyo y
compañía, a mi hermana Janett Juvera por sus valiosos consejos y observaciones,
mis padres, el Ing. Roberto M. Juvera Figueroa y la Sra. M. Natalia Avalos Méndez
por su apoyo durante todo mi camino y ser el pilar de mis aspiraciones y logros

ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	vi
2. ANTECEDENTES	1
2.1.1 Aprendizaje y sistemas de memoria	1
2.1.1.1 Aprendizaje asociativo y no asociativo	1
2.1.1.2 Condicionamiento clásico y condicionamiento operante	1
2.1.1.3 Memoria	2
2.1.1.4 Tipos de memoria	2
2.1.1.4.1 Memoria implícita	5
2.1.1.4.2 Memoria explícita	6
2.2.1 La evitación inhibitoria como una tarea de aprendizaje y memoria	6
2.3.1 Estructuras cerebrales involucradas en el aprendizaje y la memoria	7
2.3.2 El cuerpo estriado: su importancia en el aprendizaje y la memoria	8
2.4.1 Participación de los glucocorticoides en la memoria	12
2.4.2 Sistema GABAérgico y memoria.	13
2.4.3 Receptores GABA _A y estrés	14
2.4.3.1 Sitios de unión de GABA _A y agonistas	18
2.4.4 Receptores de membrana a GR	19
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	28

5.1 General	28
5.2 Específicos	28
6. METODOLOGÍA	29
6.1 Materiales	29
6.1.1 Reactivos	29
6.1.2 Equipos	30
6.2 Material Biológico	30
6.3 Cámara de evitación inhibitoria	30
6.4. Métodos	31
6.4.1 Cirugía	31
6.4.2 Manipulación	32
6.4.3 Administración de fármacos	32
6.4.4 Tarea de evitación inhibitoria	32
6.4.5 Sesión de entrenamiento	33
6.4.5 Sesión de prueba	33
6.4.6 Histología	34
6.4.7.1 Análisis estadístico	34
7 RESULTADOS	37
7.1 Verificación Histológica	37
7.2 Experimento 1	38
7.3 Experimento 2	39
7.4 Experimento 3	41
8 DISCUSIÓN	43
9 CONCLUSIÓN	48
10 REFERENCIAS	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Cambios por el estrés en el sitio de unión del GABA _A .	15
2 Ligandos de los receptores GABA _A .	19
3 Formación de grupos para la administración de los tratamientos	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Fases de la consolidación de la memoria	3
2 Sistemas de memoria	4
3 Clasificación de los tipos de memoria de largo plazo y su posible ubicación	5
4 Equipo utilizado en la tarea de evitación inhibitoria	7
5 Relaciones anatómicas en humano de los ganglios basales	10
6 Estructura del núcleo lenticular en humano.	11
7. Esquema del receptor GABA _A y sitios putativos de unión	17
8 Mecanismo de transducción de señales no genómicas	22
9 Estrés en la sinapsis	24
10 Diagrama de cortes coronales del cerebro de la rata	37
11 Corte coronal de cerebro de rata de 50 µm	38
12 Experimento 1.	39
13 Experimento 2	40
14 Experimento 3	41

RESUMEN

Ante las experiencias aversivas, se induce la liberación de glucocorticoides como la corticosterona. La activación de los receptores a glucocorticoides (GR), en conjunto con los receptores muscarínicos colinérgicos en el estriado facilita la consolidación de la memoria. Sin embargo, se desconoce si en primer lugar, dicha facilitación es debida a la activación de los GR membranales (GRms); y en segundo lugar si existe interacción con otros receptores como los GABA_A. En el presente trabajo, investigamos si en el estriado los GRms interactúan con los receptores GABA_A en la consolidación de la memoria. Ratas macho *Wistar* se implantaron con cánulas bilaterales en el estriado anterodorsal, se entrenaron en la tarea de evitación inhibitoria y se midió la retención a las 48 horas. En el Experimento 1 las ratas se entrenaron con una intensidad de 0.45 mA e inmediatamente después del entrenamiento recibieron corticosterona conjugada a BSA (CORT:BSA) (5, 10 o 20 ng/0.5 µl) o vehículo. En el Experimento 2, las ratas se entrenaron con una intensidad de 0.6 mA e inmediatamente después recibieron el agonista a GABA_A muscimol (5 o 50 µM/0.5 µl) o vehículo. En el Experimento 3 las ratas se entrenaron con 0.45 mA e inmediatamente después del entrenamiento recibieron muscimol (5 µM/ 0.5 µl) y 10 minutos después CORT:BSA (20 ng/0.5 µl). Encontramos que el muscimol causa deterioro de la memoria (5 µM); la CORT:BSA facilita la retención de la memoria (20 ng); y la facilitación causada por la CORT:BSA se bloquea con la administración previa de muscimol (5 µM). Nuestros resultados sugieren que la modulación de la memoria se da por vías rápidas de señalización a través de los GRms y que los glucocorticoides interactúan con el sistema GABAérgico estriatal en la consolidación de la memoria.

1. INTRODUCCIÓN

El aprendizaje se define como el proceso que representa el cambio en la conducta del individuo derivado de la experiencia; este representa cambios en el sistema nervioso (Bayley y Squire, 2007; Hilgard y Bower, 1987), por otro lado la memoria es todo recuerdo más o menos permanente de la experiencia que se ha obtenido por medio del aprendizaje (Camarasa, 2008).

Las especies animales a lo largo de su vida son expuestas a diversas situaciones o factores adversos. Existen mediadores de estrés que son liberados en dichas situaciones provocando cambios bioquímicos intra y extracelulares que son traducidos en cambios inmediatos en la conducta así como la modificación en la conducta futura del individuo (Kronenberg y col., 2003). Esto se logra a través de la modulación del funcionamiento neuronal en varios niveles del sistema nervioso central; niveles que rigen la toma de decisiones, el aprendizaje y la memoria, las hormonas, las respuestas autonómicas y las emocionales (Maguire, 2014).

Varios mediadores de estrés han sido descritos, incluyendo neurotransmisores como la noradrenalina y la serotonina; así como las hormonas esteroides cortisol en humanos y corticosterona en roedores (Joëls y Baram, 2009).

La información con contenido emocional es modulada según la intensidad de la experiencia, se ha demostrado que si el estímulo es mayor se generan mejores memorias (Joëls y Baram, 2009). Existen diferentes tareas para estudiar los procesos de memoria con contenido emotivo positivo o negativo, una de ellas es la tarea de evitación inhibitoria que involucra un estímulo negativo.

La tarea de evitación inhibitoria consiste en colocar una rata en una caja de dos compartimientos, el primero iluminado y el segundo compartimiento oscuro separado por una puerta. Cuando la puerta es abierta, la rata cruza al compartimiento oscuro (debido a la exploración y a su ftofobia). Una vez que ha cruzado, se le administra un leve choque eléctrico en las patas (estímulo negativo), 48 horas después se repite el procedimiento donde se puede observar que la rata

ya no pasa al compartimento oscuro, esto debido a que almacenó la información del evento aversivo a largo plazo.

La corticosterona administrada directamente en el estriado facilita la consolidación de la memoria de una tarea de evitación inhibitoria (Medina y col., 2007). Este hallazgo apoya la evidencia de la modulación de los mediadores del estrés sobre la memoria y la participación en este proceso de los GR del estriado.

Uno de los sistemas que regulan el almacenamiento de la memoria es el sistema GABAérgico, que ejerce inhibición sobre otras neuronas; se distribuye en las neuronas de todo el cerebro, sin embargo se encuentran en mayor concentración en ciertas regiones como en el estriado. El GABA puede unirse a distintos tipos de receptores. Los receptores para GABA son de varios tipos; los ionotrópicos (GABA_A) y los metabotrópicos (GABA_B y GABA_C).

Los receptores GABA_A estriatales se expresan en las neuronas principales del estriado y participan en la consolidación de la memoria (Siller, 2012).

Con el fin de conocer si la activación de los receptores a glucocorticoides membranales (GRm) en el estriado interactúan con los receptores GABA_A en la modulación del almacenamiento de una memoria aversiva será necesario el uso de sustancias agonistas o antagonistas. El agonista muscimol tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica rápidamente (Flexner y Goodman, 1975; LaBar y Cabeza, 2006; Quirarte y col., 1997).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue investigar si en el estriado los GRms en conjunto con los receptores GABA_A modulan la consolidación de la memoria de una tarea con contenido aversivo.

2. ANTECEDENTES

2.1.1 Aprendizaje y sistemas de memoria

Continuamente los seres vivos reciben un sinnúmero de estímulos, los cuales contemplan una gran variedad de respuestas dependiendo de lo que estos generen en nuestro organismo a través de nuestros órganos sensoriales.

Toda esta información es captada por nuestro cerebro para poder responder de una mejor manera ante futuras situaciones.

El aprendizaje se define como aquellos cambios más o menos permanentes que tienen lugar en la conducta del individuo y son resultado de una experiencia (Camarasa, 2008).

2.1.1.1 Aprendizaje asociativo y no asociativo

La habituación y la sensibilización son dos formas de aprendizaje no asociativo. La primera se refiere a la disminución de una respuesta ante un estímulo que es presentado en repetidas ocasiones. De manera opuesta, la sensibilización se trata de un incremento o facilitación de la respuesta ante una amplia variedad de estímulos después de haber recibido un estímulo nocivo o intenso (McDonald y col., 2004).

Como parte del aprendizaje asociativo dos o más estímulos se asocian y generan respuestas más complejas que en la sensibilización, o la habituación; además en esta categoría se agrupan dos tipos de aprendizaje: el que se produce por el condicionamiento clásico y el que se obtiene por el condicionamiento operante.

2.1.1.2 Condicionamiento clásico y condicionamiento operante.

La diferencia entre el condicionamiento clásico y el operante radica en que en el clásico, la asociación se da entre estímulos externos que provocan la respuesta y la antecedente, mientras que en el condicionamiento operante la asociación se da entre

una respuesta y la consecuencia que esta provoca (el énfasis no es en lo que antecede, si no en la consecuencia) (Morgado, 2005).

La distinción básica entre ambos condicionamientos radica en las consecuencias de la respuesta condicionada. En el condicionamiento clásico, las consecuencias de los fenómenos son independientes de lo que haga el sujeto. Pero en el condicionamiento operante, la recompensa es consecuencia de la respuesta. En el condicionamiento clásico el estímulo condicionado se presenta a la vez que el estímulo incondicionado y después se produce la respuesta. El aprendizaje por reforzamiento es aquel en el la conducta de un organismo aumenta su frecuencia de aparición luego de recibir algún estímulo reforzante, o disminuye después de recibir un castigo.

En el condicionamiento operante el reforzador o el castigo aparecen después de la conducta (Kimble, 1961).

Ambos tipos de condicionamientos tienen una importancia adaptativa para las especies animales porque les permite hacer asociaciones predictivas de tareas previamente realizadas (Díaz-Trujillo y col., 2009; Dudai, 2002).

2.1.1.3 Memoria

La memoria se define como todo recuerdo más o menos permanente de la experiencia que se ha obtenido por medio del aprendizaje (Camarasa, 2008).

2.1.1.4 Tipos de memoria

El almacenamiento de la memoria en los mamíferos se divide en dos tipos memoria según el tiempo que permanece la información en las estructuras cerebrales (Figura 1). La memoria de corto plazo: tiene una duración de minutos u horas; y la memoria de largo plazo: va desde días hasta años.

La memoria de largo plazo depende de la síntesis de proteínas de *novo* de la experiencia que será recordada posteriormente (Dudai, 2002) esto en condiciones experimentales de reforzamiento moderado, ya que existen estudios que sugieren

que en condiciones de sobrerreforzamiento la síntesis de proteínas de *novo* no es indispensable para el establecimiento (consolidación) de una memoria sólida (Díaz-Trujillo y col., 2009).

Para que la memoria de corto plazo se transforme en memoria de largo plazo y sea sujeta de evocarse semanas o años más tarde, debe quedar consolidada. Es decir si la memoria a corto plazo se activa repetidas veces, pondrá en marcha cambios anatómicos, físicos y químicos en las sinapsis que son responsables del tipo de memoria de largo plazo (Hall, 2011; Lechner y col., 1999).

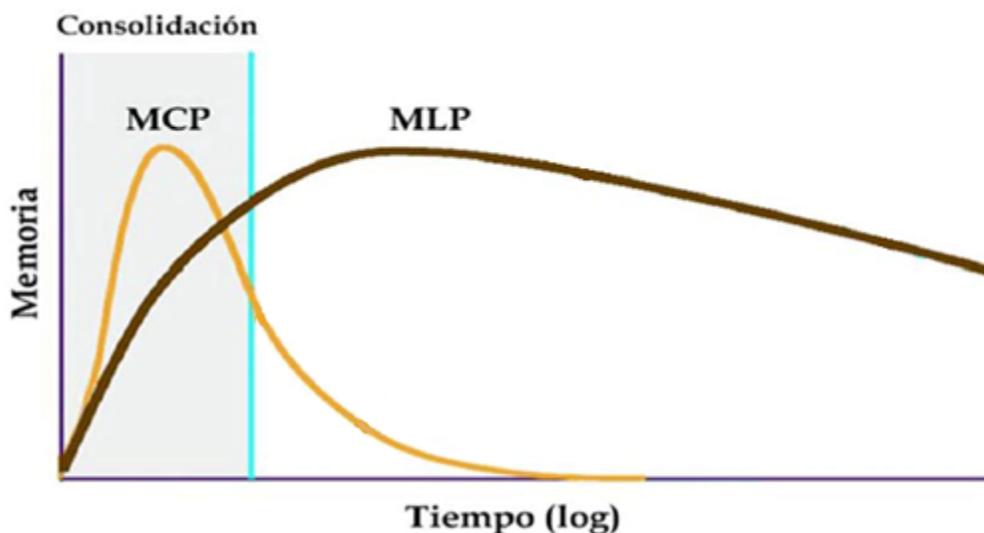


Figura 1. Fases de la consolidación de la memoria, memoria de corto plazo (MCP), memoria de largo plazo (MLP). Modificado de Dudai (2004).

La memoria de largo plazo depende de la activación de genes específicos que contienen la codificación necesaria para la síntesis de proteínas (McEwen, 2007; Morsink y col., 2006), de esta manera, la información derivada de una experiencia de aprendizaje quedará almacenada en virtud de los cambios en la estructura y metabolismo neuronal (crecimiento dendrítico, génesis de espinas dendríticas, incremento en la producción y liberación de neurotransmisores, síntesis de receptores de membrana sensibles a neurotransmisores específicos, etc.) (Kandel y col., 2000).

La consolidación de la memoria involucra la participación de genes y en algunos casos, la síntesis de nuevas proteínas que dan lugar a cambios estructurales que almacenan la memoria a lo largo del tiempo.

Asimismo se han establecido sistemas de memoria tomando como modelo el cerebro de la rata (Figura 2) (White y McDonald, 2002). Cada sistema consiste en una serie de estructuras neuronales interconectadas. Las tres estructuras centrales son el hipocampo, el cuerpo estriado (caudado y putamen) y la amígdala. La información viaja a través de estos sistemas de manera independiente y es procesada de la misma manera. Todos los sistemas tienen acceso a esta información cuando se da el aprendizaje, sin embargo cada sistema está especializado en responder de manera particular ante ciertos elementos (estímulos, eventos, reforzadores) (White y McDonald, 2002).

Los sistemas están identificados según el nombre anatómico de sus estructuras centrales: el sistema del hipocampo, el sistema del estriado dorsal y el sistema de la amígdala. El sistema del hipocampo es importante para mediar los efectos en la recuperación de la memoria espacio-contextual. El sistema dirigido por el estriado participa en el aprendizaje a través de la adquisición gradual de asociaciones entre un estímulo y una respuesta para realizar una acción y no otra (White, 2008). Por último, el sistema dirigido por la amígdala ejerce un papel modulador en la memoria.

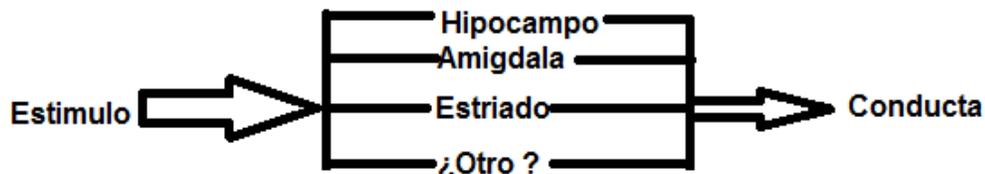


Figura 2. Sistemas de memoria. Cada sistema recibe y procesa información de diversos aspectos durante el aprendizaje. Todos los sistemas influyen en la conducta del sujeto de manera conjunta o individual. Modificada de McDonald y col. (2004).

Por otro lado, se han establecido dos tipos de memoria de largo plazo y la participación diferencial de estructuras cerebrales para cada una (Figura 3); la memoria explícita se forma por el sistema de memoria del hipocampo y la memoria implícita por el sistema del estriado.

Asimismo se describe una memoria de trabajo como un tipo de almacenamiento temporal (Thompson y Kim, 1996).

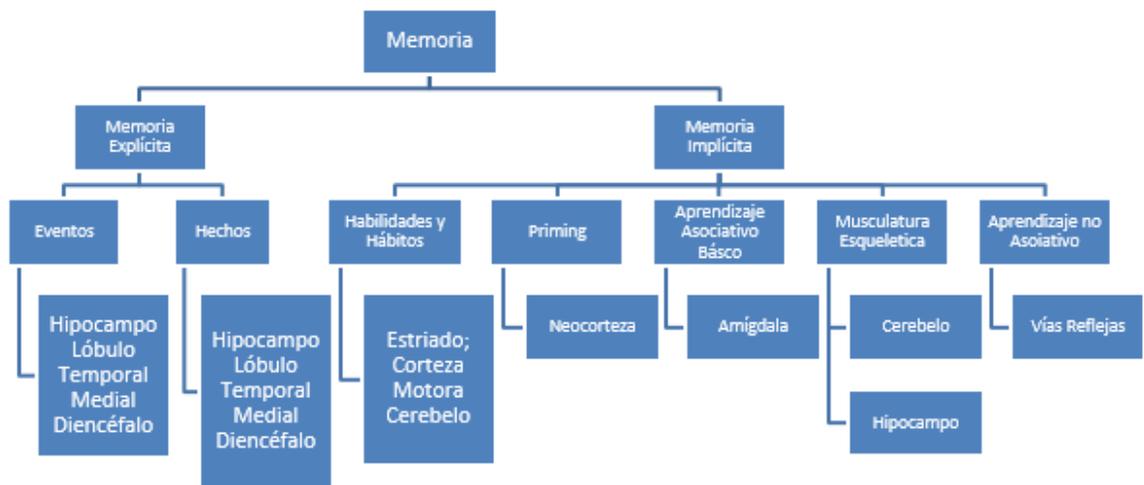


Figura 3. Clasificación de los tipos de memoria de largo plazo y su posible ubicación estructural asociada. Modificado de Thompson y Kim (1996).

2.1.1.4.1 Memoria implícita

La Memoria implícita también llamada procedimental, es la información que nos permite ejercer hábitos cognitivos y motores. Su expresión es en gran medida automática, inconsciente y difícil de verbalizar. Se adquiere gradualmente y se perfecciona con la práctica. Suele ser una memoria fiel, rígida y duradera, derivada de tipos de aprendizaje básico y filogenéticamente antiguos, como la habituación y la sensibilización, el aprendizaje perceptivo y motor, o los condicionamientos clásico e instrumental (Morgado, 2005).

2.1.1.4.2 Memoria explícita

La memoria declarativa o explícita (ME) es la recolección y almacenamiento consciente de información relacionada con acontecimientos específicos, es una forma de aprendizaje complejo que consiste en analizar y comparar diferentes tipos de información (Morgado, 2005).

La ME es el almacenamiento de hechos (memoria semántica) y eventos (memoria episódica). Se expresa conscientemente y es fácil de declarar verbalmente o por escrito. A diferencia de la memoria implícita (MI), este tipo de memoria puede adquirirse en pocos ensayos y tiene como destacada particularidad poder expresarse en situaciones y modo diferentes a los del aprendizaje original (Morgado, 2005).

2.2.1 La evitación inhibitoria como una tarea de aprendizaje y memoria.

Existen diferentes tareas para estudiar los procesos de memoria. Una tarea ampliamente usada es la de evitación inhibitoria, también denominada prevención pasiva, fue inicialmente estudiada por Slotnick y Jarvik en 1966. En este aprendizaje están involucrados los sistemas de memoria estudiados por McDonald y White: a) alto componente emocional que se establece con la aplicación de un evento aversivo: un choque eléctrico administrado en las patas de las ratas, b) se establece mediante claves espaciales e información contextual: un compartimento iluminado y otro oscuro con pisos de diferente textura y c) implica la asociación de los estímulos ambientales con la respuesta motora.

En la evitación inhibitoria, se colocó una rata en un compartimento iluminado llamado de seguridad (Figura 4), separado por una puerta deslizable de otro compartimento llamado de castigo que es oscuro. Cuando la puerta deslizable se abre la rata cruza al compartimento oscuro de manera innata debido a su ftofobia y se contabiliza este tiempo (latencia de entrada). Una vez que ha cruzado la puerta esta se cierra y se le administra un choque eléctrico en las patas, en el caso del presente estudio la duración fue de 1 segundo. Cuarenta y ocho horas después

se repite el procedimiento, solo que esta vez no se aplica el choque eléctrico. Se considera que la rata aprendió, cuando se observa que no pasa al compartimento de castigo en el que se le aplicó el choque eléctrico días antes. Esta conducta implica que la rata almacenó en la memoria de largo plazo la experiencia aversiva. Las ratas con un recuerdo deficiente o amnésico, vuelven a pasar al compartimento oscuro a las 48 horas. Se contabiliza nuevamente el paso del compartimento de seguridad al de castigo, si la rata no pasa a los 600 segundos se da por terminada la sesión.



Figura 4. Equipo utilizado en la tarea de evitación inhibitoria. Se muestran ambos compartimentos, A) Compartimento de seguridad y (B) Compartimento de castigo.

2.3.1 Estructuras cerebrales involucradas en el aprendizaje y la memoria

La memoria es un proceso que se lleva a cabo gracias a la participación de distintas regiones cerebrales y se procesa de distintas maneras en relación con el tipo de información recibida.

Disímiles formas de memoria son adquiridas a través de diferentes tipos de aprendizaje e involucran distintas áreas del cerebro: el hipocampo, la amígdala, el estriado, la corteza insular, la corteza prefrontal, la corteza entorrinal, la corteza perirrinal, la corteza parahipocampal y el cerebelo entre otras (Poldrack y Packard, 2003).

El cerebelo participa en el aprendizaje que lleva información del movimiento y del estímulo a través de las fibras musgosas paralelas y fibras ascendentes que transportan información de movimientos específicos y eventos aversivos. Estos convergen en las neuronas de Purkinje ubicadas en la corteza cerebelar para alterar la eficacia sináptica de la sinapsis de las fibras musgosas paralelas en sus dendritas (Thompson y Kim, 1996).

El hipocampo favorece el almacenamiento de los recuerdos. Los dos hipocampos se han extirpado en el tratamiento de epilepsia en algunos pacientes. Este procedimiento no afecta gravemente a la memoria de la persona en lo que atañe a la información almacenada en el cerebro antes de extraer los hipocampos. Sin embargo, a partir de entonces prácticamente pierden su capacidad para guardar recuerdos de tipo verbal y simbólico (memoria de tipo declarativo) en la memoria de largo plazo (Hall, 2011; Roth y Sweatt, 2008).

De todas las estructuras subcorticales, la amígdala es la que se ha relacionado de un modo más consistente con la emoción, tanto en animales como en humanos (LeDoux, 1993). Esta estructura es capaz de producir una respuesta rápida a estímulos aversivos simples sin la necesidad de la participación de la corteza (Sánchez-Navarro y Román, 2004).

La amígdala permite modular la memoria, ya que influye sobre otras estructuras cerebrales para la consolidación de la memoria, es una estructura de direccionamiento de información (Siller, 2012).

Todas las estructuras en conjunto permiten almacenar trazas de memoria para permitirnos recordar experiencias vividas, tanto a humanos como a las demás especies.

2.3.2 El cuerpo estriado: su importancia en el aprendizaje y la memoria.

El cuerpo estriado forma parte de los ganglios basales y en los primates consiste en dos masas nucleares situadas profundamente en la base de los hemisferios

cerebrales, el núcleo caudado y el lenticular (putamen y globo pálido) (Hall, 2011). En los roedores no existe una clara diferenciación entre el caudado y el putamen por que las fibras de la cápsula interna que separa a estas dos regiones en los primates son muy pobres o ausentes, así que se usa el término del estriado. La parte dorsomedial del estriado en roedores (Figura 5) corresponde al núcleo caudado y en primates la parte dorsolateral del estriado corresponde al putamen (Voorn y col., 2004).

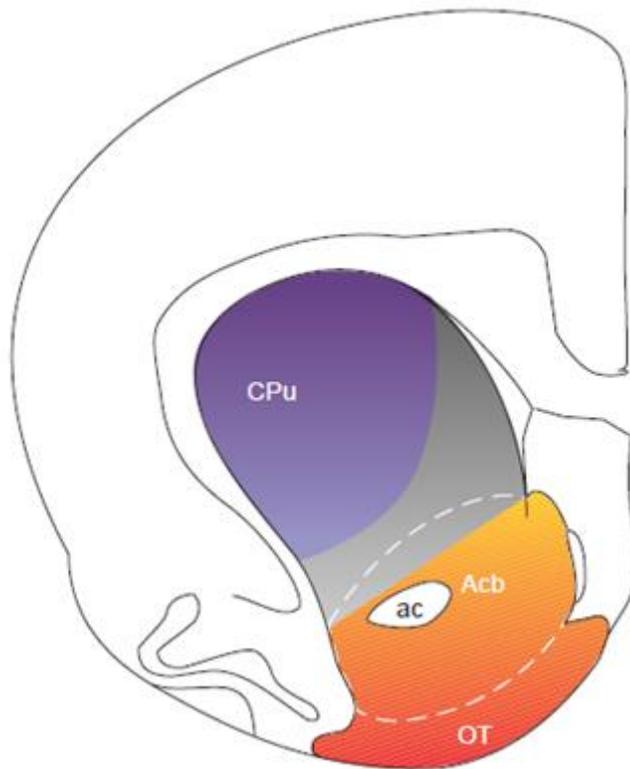


Figura 5. Diferentes maneras de subdividir el estriado. Sección transversal del prosencéfalo de rata, mostrando el estriado, formado por el complejo caudado-putamen (CPu), el núcleo accumbens (Acb), y elementos estriales del bulbo olfatorio (OT). Modificado de Voorn y col. (2004).

En humanos el núcleo lenticular está formado por el putamen y el globo pálido, se llama cuerpo estriado por el aspecto que presentan estos núcleos grises estriados por las fibras blancas de la cápsula interna. Sus funciones son el control del

movimiento, la formación de memoria emocional, la función motora y la memoria de procedimiento (Kandel y col., 2000).

Los términos estriado, estriado dorsal y neoestriado se refieren a la parte dorsal del caudado y putamen.

Las neuronas neoestriatales (putamen y caudado) son de dos tipos: espinosas principales o de proyección (96%), las intrínsecas (4%). Las neuronas espinosas o de proyección neoestriatal contienen GABA, taurina y varios neuropéptidos (Snell, 2010). Estas neuronas producen descargas cuando son estimuladas por aferencias corticales y extracorticales. Las neuronas intrínsecas contienen acetilcolina, GABA, dopamina y somastostatina.

El núcleo caudado es una masa alargada gris con forma de C (Figura 5) que se encuentra situado en el piso del ventrículo lateral y poslateral al tálamo óptico.

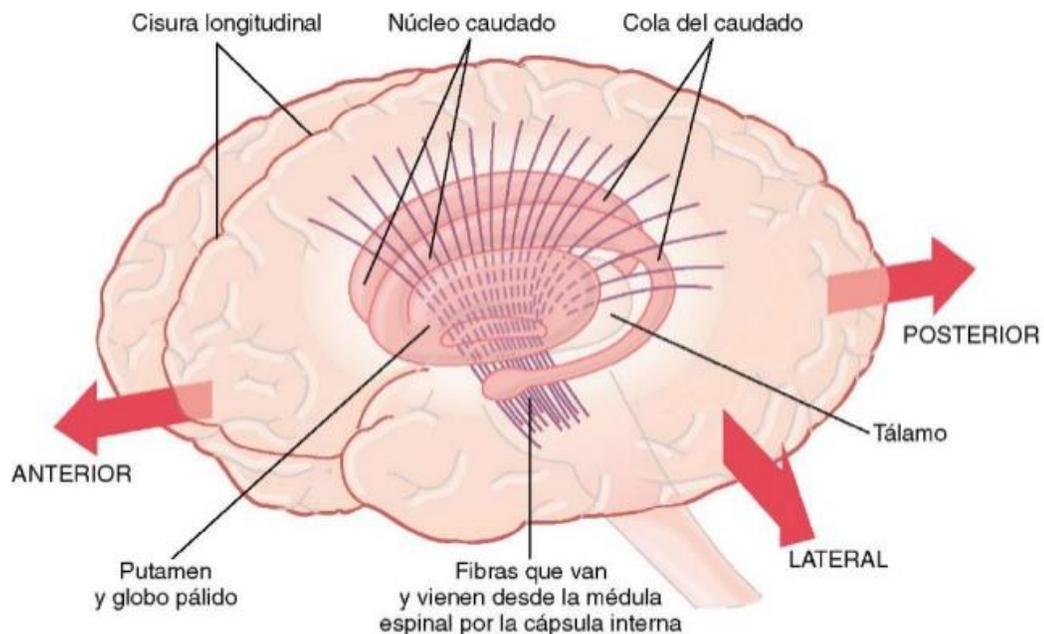


Figura 5. Relaciones anatómicas en humano de los ganglios basales con la corteza cerebral y el tálamo, representadas en una imagen tridimensional. Modificado de Hall (2011).

El núcleo lenticular (Figura 6) es una masa de sustancia gris, con forma de un lente biconvexo, situado en la profundidad de la sustancia blanca de los hemisferios cerebrales, por encima del asta inferior del ventrículo lateral. El núcleo lenticular está dividido por una lámina vertical de sustancia blanca, en dos porciones. Una lateral o externa más grande y oscura llamada putamen y otra medial o interna más pequeña llamada globo pálido. El globo pálido en dos segmentos: medial y lateral. El putamen y el núcleo caudado son similares en estructura.

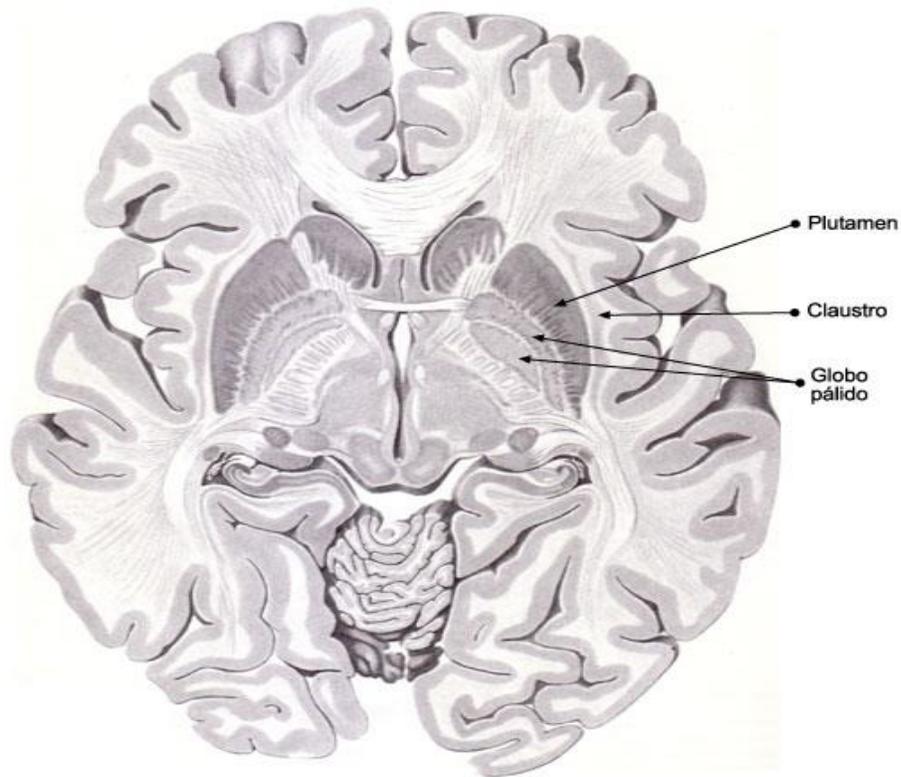


Figura 6. Estructura del núcleo lenticular en el humano. Modificado de Snell (2010).

Los ganglios basales están unidos entre sí y conectados con una gran cantidad de regiones diferentes del sistema nervioso por una compleja cantidad de neuronas. Básicamente, el cuerpo estriado recibe información aferente de la mayor parte de la corteza cerebral, el tálamo óptico, el subtálamo y el tronco del encéfalo. La actividad del cuerpo estriado tiene inicio con la información recibida de la corteza sensitiva, el tálamo óptico y el tronco del encéfalo. La aferencia del cuerpo estriado

es canalizada a través del globo pálido, que luego influye en las actividades de las áreas motoras de la corteza cerebral u otros centros motores del tronco del encéfalo. Por lo tanto, el cuerpo estriado puede controlar los movimientos musculares al influir sobre el control de la corteza cerebral.

Aunque ya existe una gran cantidad de trabajos que demuestran la participación del cuerpo estriado en el refinamiento y el control del movimiento motor. La evidencia actual indica que el cuerpo estriado contribuye directamente a la toma de decisiones, en especial a la selección y el inicio de la acción, a través de la integración senso-motora, cognitiva y la información motivacional/emocional dentro de los circuitos corticoestriatales específicos que involucran regiones del estriado y en la formación de memorias de tipo aversivo (Balleine y col., 2007).

2.4.1 Participación de los glucocorticoides en la memoria.

Las hormonas se definen como señales químicas secretadas en el torrente sanguíneo que actúan en tejidos distantes, normalmente de una manera regulatoria (Kronenberg y col., 2003). Las hormonas tienen la característica de actuar sobre las células, que deben disponer de una serie de receptores específicos.

Las hormonas pertenecen al grupo de los mensajeros químicos, todos los organismos multicelulares producen hormonas, incluyendo las plantas.

La liberación de ciertas hormonas en algunas circunstancias se da durante una situación adversa o de estrés para que el organismo responda de una manera rápida. Un componente clave en la respuesta ante el estrés es la acción de las glándulas suprarrenales a través de la síntesis y secreción de hormonas como los corticosteroides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) y catecolaminas (como por ej. la adrenalina y la noradrenalina).

La liberación de corticosterona en respuesta al estrés es independiente de la liberación normal durante el ciclo circadiano. En periodos de estrés la concentración de corticosterona en la sangre se eleva hasta aproximadamente 100

nM. Este incremento de concentración se mantiene elevado entre 60 y 90 minutos. (Karst y col., 2005).

Se sabe que la vivencia de episodios traumáticos involucra la formación de nuevas memorias (Kim y Diamond, 2002; McEwen, 2007). La respuesta ante el estrés es multifacética e incluye la liberación de hormonas glucocorticoides que afectan al cerebro y la conducta del individuo, así como conductas futuras ante el mismo estímulo (Gold, 2004).

Diversos modelos experimentales de aprendizaje han demostrado que la corticosterona es un potente regulador de la memoria emocional (Prager y Johnson, 2009).

Los glucocorticoides pueden actuar de diferentes maneras; por medio de sus receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides (GRs y MRs), ya sean citosólicos o membranales. La afinidad de los MRs por la corticosterona es más alta que la afinidad de los GRs en un factor de 10, la corticosterona se une con una afinidad 10 veces mayor constante de disociación ($K_d \sim 0,5$ nM) (De Kloet, 1991). Cuando actúan por medio de los receptores citosólicos, estos se translocan al núcleo para funcionar como factores de transcripción. Por otro lado, los receptores en la membrana activan vías de señalización rápidas.

Los procesos de aprendizaje y memoria a nivel molecular son muy complejos ya que involucran varias cascadas de señalización que conducen a cambios en la expresión génica de las neuronas, las cuales producen cambios de la plasticidad sináptica, cambios en el aprendizaje y la memoria.

2.4.2 Sistema GABAérgico y memoria.

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitorio por excelencia en el sistema nervioso central (CNS) en mamíferos (Zheng y col., 2007).

La regulación de los receptores a GABA por acción de su agonista muscimol o antagonista bicuculina, provoca cambios en el aprendizaje mediado por estímulos negativos (Introini-Collison y col., 1994).

Hay 3 tipos de receptores del sistema GABAérgico: los tipos A, B y C.

Los receptores GABA_B son heterodímeros (B1 y B2) y son receptores transmembranales que activan el sistema de segundos mensajeros de la fosfolipasa C y la adenil ciclasa además de activar los canales iónicos acoplados a proteínas G de K⁺ y Ca²⁺ (Johnston y col., 2010).

Los receptores GABA_B producen señales inhibitorias lentas, prolongadas y modulan la liberación de neurotransmisores (Johnston y col., 2010).

Los receptores presinápticos GABA_B reducen el flujo de Ca²⁺ inhibiendo los canales de Ca²⁺ en la membrana vía subunidades G β_v. Estudios posteriores, definieron que actúan sobre todo en las proteínas G (Bettler y col., 2004).

El receptor GABA_c es miembro de la súper familia de Cys- loop de los canales iónicos activados por ligando que incluyen receptores a flicina y 5 HT₃ (Qian y Ripps, 2009). La estructura de los receptores pentaméricos GABA se compone de subunidades ρ, y tres de los cuales (ρ1 - ρ3) han sido clonados a partir de la retina de mamíferos (Qian y Ripps, 2009).

Particularmente el receptor GABA_A es responsable de inhibir la mayoría de las transmisiones sinápticas en el cerebro, que a través de la activación de la conductividad de Cl⁻ resulta en la hiperpolarización membranal y la disminución de la excitabilidad neuronal (Slotnick y Jarvik, 1966).

2.4.3 Receptores GABA_A y estrés.

Los receptores GABA_A son sensibles a cambios sutiles en el ambiente tanto en la edad temprana como en la vida adulta (Skilbeck y col., 2010). El estrés agudo induce cambios (Cuadro 1) en la expresión de los receptores GABA_A (Bmax) en

animales experimentales dependiendo del sexo de los animales y de la tarea utilizada para su estudio (Skilbeck y col., 2010).

Estudios donde la unión de GABA ha sido medida sugieren que la disponibilidad de sitios de baja afinidad son rápidamente afectados por el estrés dependiendo directamente del sexo y de la tarea de estudio (Skilbeck y col., 2010).

Cuadro 1. Cambios inducidos por estrés en el sitio de unión ortostérico del receptor GABA_A. (Bmax.) Modificado de Skilbeck y col. (2010).

Tipo de estrés	Animal	Radioligando	Cambio en afinidad	Referencia
Nado (32°C, 3 min)	Rata Macho	[³ H]GABA, baja afinidad.	Sin cambio	Akinci and Johnston 1993
	Rata Hembra		Incremento	
Nado (32 °C, 3 min)	Rata Macho	[³ H]GABA, baja afinidad.	Sin cambio	Skerritt et al. 1981
	Rata Hembra		Incremento	
Nado (32 °C, 3min)	Rata Macho	[³ H] Muscimol	Sin cambio	Motohashi et al. 1993
Nado (17 ° C, 10 min)	Rata Macho	Muscimol	Incremento	Schwartz et al. 1987
Choque eléctrico	Rata Macho	[³ H]GABA, baja afinidad.	Decremento	Biggio et al. 1981
	Rata Macho	[³ H] GABA, baja afinidad	Decremento	Cuadra and Molina 1993
	Par de Ratas Macho	[³ H] GABA, baja afinidad	Sin cambio	
	Rata Macho	[³ H] Muscimol	Incremento	Drugan et al. 1993
	Rata Macho	[³ H]GABA, baja afinidad.	Decremento	Biggio et al. 1981.

Asimismo se ha demostrado que los receptores GABA_A juegan un papel importante en los procesos de memoria (Sharma y Kulkarni, 1990).

Los receptores GABA_A son una familia de canales iónicos activados por ligando que son el blanco principal del neurotransmisor inhibitor endógeno (GABA) y mantienen la mayoría de las corrientes de iones inhibitoras rápidas en el SNC. (Zheng y col., 2007).

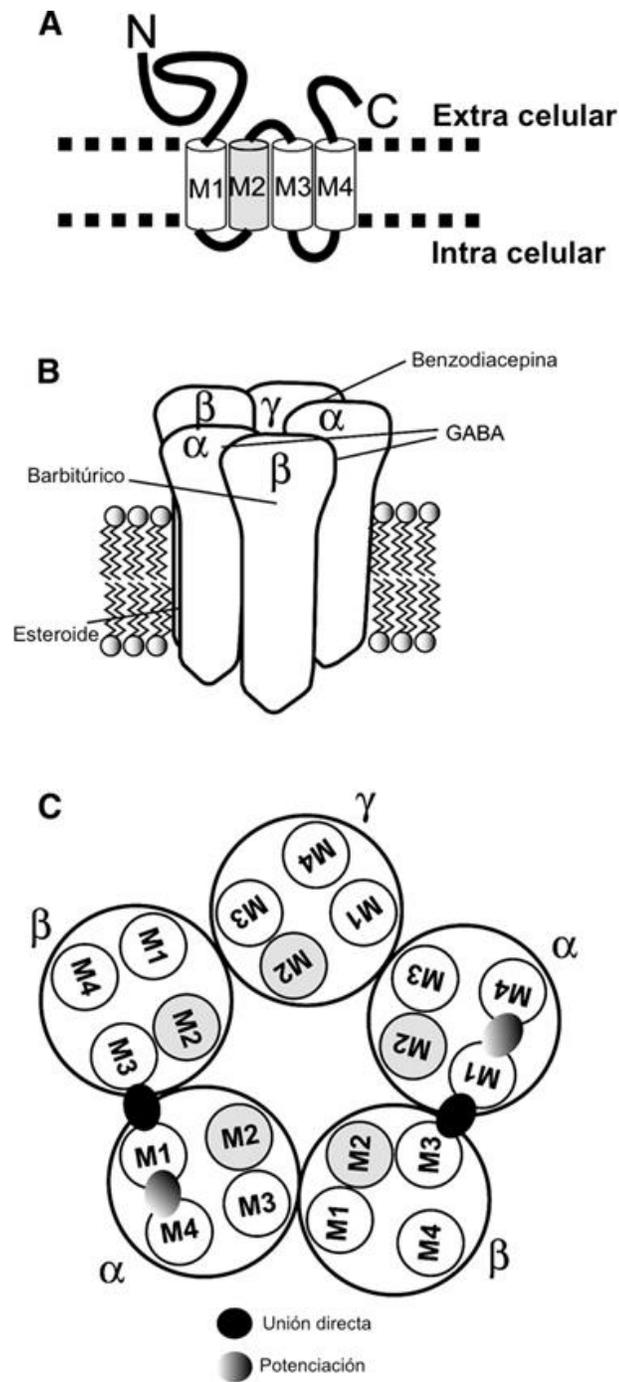


Figura 7. Esquema del receptor GABA_A y sitios putativos de unión. (A) Una única subunidad del receptor GABA_A resaltando la topología. M1-M4 representan dominios transmembrana. El dominio transmembrana M2 (gris) forma una parte importante del poro del canal de cloro. (B) Estructura pentamérica de un receptor GABA_A común. (C) Vista de abajo del receptor pentámerico mostrando los sitios propuestos de potenciación y unión directa a neuroesteroides, basado en mutagénesis dirigida al sitio (Hosie y col., 2006). Modificada de Akk y col. (2007).

Los receptores GABA_A están formados por 16 subunidades; estas subunidades son codificadas por genes separados, estas están clasificadas en 7 clases de subunidades distintas según su secuencia incluyendo seis, α (α_1 – α_6), cuatro β (β_1 – β_4), tres γ (γ_1 – γ_3 , dos variantes de splice alternativo; γ_{2short} , γ_{2long}), una δ , una ξ , y una subunidad θ (Whiting, 2003).

Las distintas combinaciones de las subunidades del receptor participan en diferentes procesos por lo cual los convierte en reguladores selectivos de la actividad neuronal (Whiting, 2003).

En la Figura 7 se muestran diferentes sitios de unión de GABA y drogas moduladoras, incluyendo neuroesteroides. Mutaciones de la subunidad β afectan la modulación de los barbitúricos, pero no ha sido identificado el sitio de unión. La indicación de que los esteroides actúan sobre el receptor GABA_A desde dentro de los dominios transmembrana se apoya en estudios farmacológicos y por los recientes estudios de mutagénesis dirigida al sitio (Akk y col., 2005; Hosie y col., 2006; Shu y col., 2004).

2.4.3.1 Sitios de unión de GABA_A y agonistas.

Los receptores GABA_A son activados por GABA y por análogos del GABA como el muscimol, un derivado natural del hongo alucinógeno *Amanita muscaria* y los análogos sintéticos como el tetrahydro isoxazol piridina (THIP), 3-amino propano sulfónico, e isoguvacina (Johnston, 1986). En el Cuadro 2, se muestran los ligandos que se unen al receptor GABA_A.

Cuadro 2. Ligandos a los Receptores GABA_A. Modificado de Macdonald y Olsen (1994).

Ligando de Receptores GABA _A .	
Agonistas Selectivos	Muscimol, GABA
Antagonistas Competitivos	Bicuculina
Antagonistas no competitivos	Picrotoxina, PTZ, TBPS
Bloqueador del canal iónico	Penicilina
Agonista benzodiazepina	Diazepam, clonazepam
Agonista inverso benzodiazepina	DMCM, βCCM
Antagonista benzodiazepina	Flumazenil
Agonista Barbitúrico	Pentobarbital, phenobarbital

El GABA se une a su receptor regulando el flujo de iones cloro. La curva respuesta de la concentración de GABA es sigmoide y con un valor de 2 en número de Hill por lo que indica que son por lo menos dos moléculas de GABA las que se unen a los receptores GABA_A para su activación (Hamill y col., 1983).

2.4.4 Receptores de membrana a GR y su interacción con los receptores GABA_A importancia en la memoria de largo plazo

La corticosterona actúa de manera dependiente de la concentración a través de su unión a dos receptores: receptor de mineralocorticoides (MRs) y receptor de glucocorticoides (GRs).

Hay evidencia que sugiere que los receptores GR se encuentran en todas las células del cuerpo (McEwen, 2007). La función principal de los GRs es estimular el depósito de glucógeno y regular la función inmune (Eberwine, 1999). La estructura de los GR membranales aún no ha sido descrita.

Estos cambios incrementan la energía disponible para el metabolismo celular y controlan el tiempo de reparación celular (Joels y col., 2007; Joëls y col., 2006; McEwen, 2007).

Los GRs en conjunto con los MRs regulan la homeostasis y los aspectos clave en las respuestas ante el estrés como lucha o huida.

La corticosterona activa señales de transducción por medio de los receptores de membrana MRmss y GRmss, los cuales regulan sistemas de segundos mensajeros, que pueden tener efectos directos sobre proteínas de membrana, incluyendo canales iónicos que regulan el potencial de membrana (French-Mullen, 1995). Además estos receptores membranales pueden regular la transcripción de genes (Kino y col., 2005). Estos mecanismos de transducción podrían regular respuestas ante el estrés, incluyendo la formación de memorias traumáticas (Prager y Johnson, 2009).

También pueden actuar en la membrana, donde modulan rápidamente la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal a través de la modificación de la conductividad de canales iónicos específicos (Prager y Johnson, 2009).

Además de las funciones ya conocidas de los GRs y los MRs, se sabe que estos receptores alteran la plasticidad neuronal actuando de manera directa o indirecta a través de segundos mensajeros como las proteínas G, para modular diferentes mecanismos como la transcripción de genes (Maguire, 2014).

La transducción de señales a partir de los receptores de membrana (GRms y MRms) regulan los canales iónicos. En la Figura 8 podemos observar como la excitabilidad presináptica y la liberación vesicular (A) es regulada por MRmss; (B) La activación de la cascada de ERK $\frac{1}{2}$ por proteínas G incrementa la frecuencia de liberación de glutamato. En comparación, (C) los GRmss de manera postsináptica resulta en la síntesis de endocannabinoides y su liberación retrógrada; los endocannabinoides se unen a los receptores presinápticos CB1 acoplados a proteínas G inhibiendo la liberación de glutamato. De manera postsináptica los

GRmss acoplados a proteínas G inhiben los canales de calcio de tipo (D) L y N (E). Los GRmss inhiben a la PKC, reduciendo las corrientes de los canales de calcio. (G) Los GRmss inhiben de manera indirecta la activación de los receptores NMDA a través de la PKA. (H) Los GRmss se unen a los receptores GABA incrementando la hiperpolarización. (I) Los receptores MRmss acoplados proteínas G inhiben la activación de los canales de potasio (Prager y Johnson, 2009).

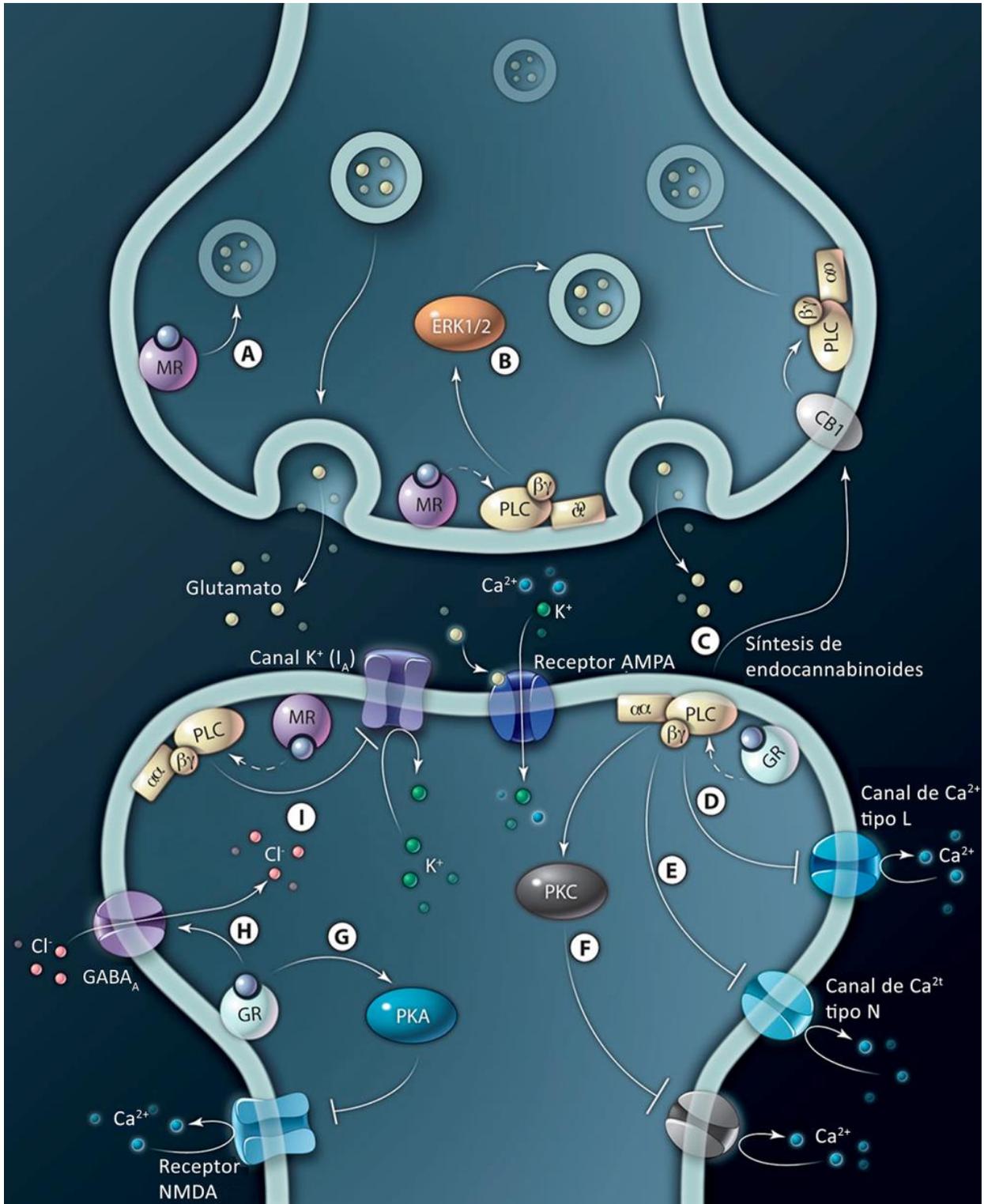


Figura 8. Mecanismo de transducción de señales no genómicas por medio de los receptores membranales de mineralocorticoides y glucocorticoides (MRmss y GRmss). Modificada de Prager y Johnson, (2009).

Además estos receptores podrían regular la plasticidad sináptica por medio de la alteración de la entrada de calcio en la sinapsis, que afectaría a la potenciación de largo plazo y aumentaría la transmisión sináptica de las neuronas (Maguire, 2014).

Estudios previos revelan que la corticosterona modula la conductividad iónica en menos de 10 minutos (Karst y col., 2005). Esta respuesta tiene que ser replicada con corticosterona conjugada a una proteína de membrana, como la proteína BSA (Bovine Serum Albumin). Esto por las propiedades de la BSA que es una proteína hidrofóbica que cuando esta conjugada con corticosterona previene la difusión a través de la membrana celular (de Kloet y col., 2008; Losel y Wehling, 2003; Lou y Chen, 1998).

La liberación de glutamato de las terminales pre-sinápticas depende de la activación de la maquinaria vesicular incluyendo ERK1/2. La cascada de señalización de ERK1/2 esta normalmente asociada con la transducción post-sináptica. ERK1/2 es activado por un gran número de receptores acoplados a proteínas G (Derkinderen y col., 2003), que pueden resultar en cambios en la plasticidad sináptica, en el aprendizaje y en la memoria (Sweatt, 2004).

Los GRms disminuyen la excitabilidad neuronal posiblemente a través de la reducción de la entrada de calcio a través de los canales iónicos dependientes de voltaje. En un estudio realizado por French-Mullen en 1995 encontró que los GRms inhiben de manera rápida y reversible los canales de calcio de tipo N- y L a través de una breve aplicación de cortisol (30 a 240 s y 1-100 μ M).

Existe evidencia de la regulación a través de los GRmss que a su vez también regulan los receptores GABA_A. Esta regulación también disminuye la excitabilidad neuronal post sináptica por medio de una hiper polarización (Di y col., 2005). Los GRmss reducen la despolarización y el flujo de calcio de los canales iónicos además de incrementar la actividad GABAérgica en PVN.

Aún existe muy poca información de cómo la administración de CORT:BSA por medio de los GRms resulta en la modulación de los receptores GABA_A.

Existe evidencia que sugiere que la activación de los MRmss y GRmss es controlada en parte por la concentración de corticosterona.

Experimentos usando concentraciones bajas de corticosterona (en un rango de 10 a 100 nM) muestran incrementos de la excitabilidad neuronal dependiente de MRs. Por otro lado experimentos que utilizan altas concentraciones de corticosterona (1 a 100 μM) muestran aparentemente un decremento en la excitabilidad neuronal dependiente de GRmss.

El efecto de la corticosterona en la excitabilidad neuronal determinada por una curva dosis respuesta con base a la activación de los receptores membranales. (Figura 9).

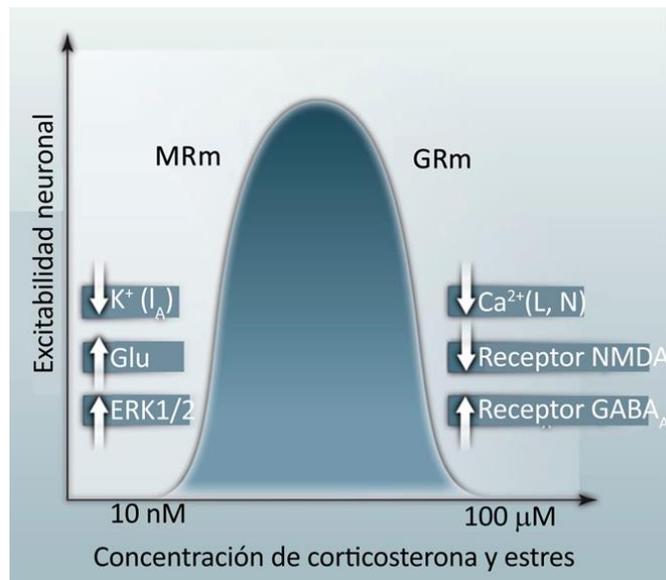


Figura 9. Estrés en la sinapsis: Modelo de la regulación de la corticosterona y excitabilidad neuronal. Los receptores membranales de mineralocorticoides (MRmss) potencian la excitabilidad incrementando la liberación de glutamato y reduciendo la conductividad del potasio: En contraste los receptores membranales de glucocorticoides (GRmss) disminuyen la excitabilidad neuronal por medio de la reducción de los flujos a través de los canales de calcio dependientes de voltaje y los receptores NMDA. También incrementa la conductividad de GABA_A por lo tanto promueve la inhibición. Modificada de Prager y Johnson (2009).

La consolidación de la memoria es potenciada cuando se administra la corticosterona y antagonistas de GR durante la adquisición de la tarea, pero es deteriorada cuando los mismos fármacos son utilizados durante la recuperación de la memoria almacenada o durante las tareas que requieren de la memoria de trabajo. Actualmente no hay estudios que revelen la interacción del GABA_A y los glucocorticoides *in vivo* en un modelo animal en una tarea conductual

3. JUSTIFICACIÓN

La memoria es un proceso neuronal plástico adaptativo muy complejo donde influyen muchos factores como los neurotransmisores (acetilcolina, GABA, serotonina, etc.). No se lleva acabo como un proceso independiente dentro de un organismo sino como un sistema donde participan diferentes estructuras cerebrales como la amígdala, el hipocampo y el estriado.

En experiencias aversivas los mamíferos inducen la liberación de glucocorticoides como la corticosterona en ratas (cortisol en humanos) que activan los receptores GR y otros sistemas como el colinérgico que en conjunto en el estriado facilitan la consolidación de la memoria. Esta facilitación de la consolidación de la memoria mediada por glucocorticoides, a su vez puede ser inducida por dos vías; la vía genómica la cual es una forma de respuesta lenta ya que involucra factores de transcripción y síntesis de *ново* de proteínas; la otra vía es por mecanismos de acción rápida a través de los GRms. Sin embargo se desconoce si dicha facilitación también es debida a la activación de los GRms y si existe interacción con otros receptores como los GABA_A que de manera independiente responden rápidamente ante estímulos cognitivos.

4. HIPÓTESIS

H1 La administración de CORT:BSA en el estriado anterodorsal facilitará la retención de la memoria de una tarea de evitación inhibitoria.

H2 La administración del agonista a receptores GABA_A muscimol en el estriado anterodorsal deteriorará la retención de la memoria de una tarea de evitación inhibitoria.

H3. El efecto de facilitación de la memoria provocado por la administración de la CORT:BSA se impedirá al administrar un antagonista de receptores GABA_A en el estriado anterodorsal.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Investigar si en el estriado los GRms en conjunto con los receptores GABA_A modulan la retención de la memoria de una tarea con contenido aversivo.

5.2 Específicos.

- Estimar el efecto dosis-respuesta de la administración de CORT:BSA sobre la consolidación de la memoria en ratas.
- Estimar el efecto dosis-respuesta del agonista a receptores GABA_A muscimol sobre la consolidación de la memoria.
- Investigar si existe una interacción entre la CORT:BSA y los receptores GABA_A en la consolidación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria.

6. METODOLOGÍA

Los experimentos se realizaron según los lineamientos del comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, para el uso de animales experimentales y fueron acordes con las normas estipuladas en la Guide for Care and Use of Laboratory Animals del NIH (National Research Council, 2011).

6.1 Materiales

- Cánulas (11 mm, núm.23)
- Tapones (11 mm)
- Tornillos pequeños, Internacional de Equipos Científicos S.A de C.V
- Tubo de acero inoxidable, Internacional de Equipos Científicos S.A de C.V, para la elaboración de las cánulas.
- Varilla de acero inoxidable (núm 23), Internacional de Equipos Científicos S.A de C.V.para la elaboración de los tapones de las cánulas.
- Aguja dental, Dimeba S.A de C.V. para la elaboración de los microinyectores.
- Jeringa Hamilton (10UI=, Hamilton Company.
- Tubo de polietileno (PE-20), Dimeba S.A de C.V. Para la elaboración de los microinyectores.

6.1.1 Reactivos

- Alcohol Absoluto (C_2H_6O), J.T Baker
- Corticosterone-BSA conjugate. Cusabio
- Muscimol. Sigma Aldrich
- Cemento dental, NicTone
- Atropina, Laboratorios Pisa S.A de C.V.
- Formaldehído (CH_2O), J.T. Baker.

- Pentobarbital sódico ($C_{11}H_{18}N_2NaO_3$), Sedalphorte; Saludo y Bienestar Animal, S.A de C.V.
- Solución Salina 0.9 %. Laboratorios Pisa S.A de C.V
- Violeta de cresilo ($C_{18}H_{15}N_3O_3$), Sigma Aldrich (St Louis Mo, USA).
- Xileno ($C_6H_7(CH_3)_2$), J.T. Baker.

6.1.2 Equipos

- Bomba de infusión lenta (WPI modelo sp2001), World Precision Instruments, Inc, U.S.A
- Criostato (CM 1850), Leica
- Estereotáxico, Stoelting, CO; Illinois.
- Estimulador Eléctrico (s48), Grass-Instrumentes Co.
- Unidad de Corriente constante (CCU-1^a), Grass-Instruments Co.
- Microscopio de luz

6.2 Material Biológico

Se utilizaron ratas macho *Wistar*, proporcionadas por el Instituto de Neurobiología con alimento y agua *ad libitum*, con un peso entre 250-350 gramos al momento de la cirugía. Las ratas se trasladaron al Bioterio general interno del laboratorio una semana antes de la cirugía con la finalidad de que se adaptaran a las nuevas condiciones ambientales. Las ratas se alojaron de manera individual en cajas habitación (47.5x26x20 cm) con alimento y agua *ad libitum*; con una temperatura controlada (24 ± 1 °C) y un ciclo de 12h luz /12 oscuridad (el encendido de la luz es a las 7 am).

6.3 Cámara de evitación inhibitoria

La cámara de condicionamiento se encuentra en un cuarto sono amortiguado y oscuro. Consiste en una caja con dos compartimientos del mismo tamaño separados por una puerta deslizable. En el primer compartimento llamado de seguridad está iluminado por luz incandescente de 10 W y tiene una rejilla metálica

con espacios de 16 mm. El otro compartimento es oscuro y las paredes laterales de acero inoxidable están en forma de V, las cuales llegan al piso del compartimento (justo a la mitad del compartimento) y cuentan con una distancia de 15 mm. Estas láminas son electrificadas por un estimulador de corriente constante (Coulbourn). La duración de la aplicación del estímulo fue de 1 segundo, las latencias de entrada y de retención se midieron automáticamente con la ayuda de un cronometro digital automático Scheider Electric S486.

6.4. Métodos

6.4.1 Cirugía

Se realizó un procedimiento quirúrgico a todas las ratas para la implantación de cánulas bilaterales en el estriado. Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg), previamente se les administró atropina (0.4 mg/ml) para evitar congestiones en las vías respiratorias. Después se afeitó la piel por encima del cráneo y se colocó e inmovilizó en el aparato estereotáxico. Una vez colocadas se les administró solución salina para evitar deshidratación, se aplicó anestesia local (piscaina s.c.), se hizo una incisión de 1.5 cm de largo en sentido anteroposterior sobre la línea media de la cabeza. Se levantó el tejido periósteo y se realizaron 2 orificios para introducir las cánulas (11 mm) y otro para colocar un tornillo que permitió una mejor adhesión del cemento dental. Las cánulas se implantaron en el estriado de acuerdo con las coordenadas (Estriado AP= 0 mm Bregma; ML= ± 3.2 ; DV= -4) tomadas del atlas de Paxinos y Watson (2005).

Las cánulas fueron sujetadas a la superficie del cráneo con cemento dental y tornillos, y se les colocó un tapón para mantener la vía permeable.

Al terminar el proceso quirúrgico se les inyectó 1 ml de solución isotónica para evitar deshidratación. Se permitió que las ratas se recuperaran de la intervención quirúrgica al menos 48 horas en el Bioterio interno del laboratorio.

6.4.2 Manipulación

Todas las ratas fueron manipuladas tres sesiones previas al día del entrenamiento en el mismo horario que se realizó la sesión de entrenamiento y prueba. La manipulación consiste en sacar a la rata de su caja, revisar que las cánulas y los tapones estén bien colocados. Al tercer día se colocó un falso inyector en cada una de las cánulas con la medida de la aguja empleada durante la infusión (12 mm).

6.4.3 Administración de fármacos

Los fármacos administrados para estos experimentos fueron comprados a Sigma Aldrich (St.Louis MO, USA) y CUSABIO; fueron disueltos en solución salina al 0.9%. La corticosterona conjugada con BSA en diferentes concentraciones (5,10, 20 ng/0.5 μ l) y el muscimol (5, 50 μ M/0.5 μ l) se administró tópicamente (microinyección) en el estriado (bilateral); inmediatamente después del entrenamiento con ayuda de una bomba de infusión lenta.

En el Experimento 3 se administró en conjunto ambos fármacos (ambos en un volumen de 0.5 μ l) aplicando primero el muscimol, 10 minutos posteriores a la microinyección de muscimol se administró la CORT:BSA.

Para realizar esto se conectó una jeringa Hamilton de 10 μ l a un inyector de 11 mm de longitud, fabricado con un tubo de aguja hipodérmica de acero inoxidable del número 30.

La infusión (0.5 μ l) se realizó durante 1 minuto y se dejó el inyector 1 minuto después para permitir una mejor difusión.

6.4.4 Tarea de evitación inhibitoria

Se utilizó la tarea de evitación inhibitoria para evaluar los efectos de los tratamientos sobre la consolidación de la memoria de largo plazo en ratas entrenadas en grupos independientes. La tarea consiste en una sesión de

entrenamiento y una sesión de prueba, en este estudio se realizó 48 horas después.

6.4.5 Sesión de entrenamiento

Las ratas fueron colocadas en el compartimento de seguridad; 10 segundos después de haber colocado a la rata, la puerta del segundo compartimento se abrió y le permitió el paso al compartimento de castigo. Una vez que la rata pasó por completo al compartimento de castigo la puerta se cerró y se le aplicó un choque eléctrico (0.6 o 0.45 mA) durante 1 segundo. Se analizó el tiempo que tardó en pasar al compartimento de castigo (latencia de entrada).

Después del choque se le administró a cada rata el fármaco correspondiente. Finalmente se colocó en su caja para ser devuelta al estante, donde permaneció una hora después de haber entrenado a la última rata del grupo.

Al terminar el entrenamiento de cada individuo se limpió la cámara con una solución de alcohol al 50% para eliminar cualquier residuo u olor que pudiera alterar la respuesta de la siguiente rata.

6.4.5 Sesión de prueba

La sesión de prueba se realizó 48 horas después de la sesión de entrenamiento, en la cual se evaluó la retención de la experiencia aversiva. La sesión de prueba se realizó de la misma manera que la sesión de entrenamiento, únicamente con la diferencia de que cuando la rata pasó al compartimento de castigo, no se le aplicó el choque eléctrico. Se midió el tiempo que la rata tardó en pasar al compartimento de castigo (latencia de retención). Se tomó como corte arbitrario 600 segundos.

6.4.6 Histología

Con el propósito de verificar que las cánulas y los fármacos llegaron a la estructura correcta en el cerebro se realizó un análisis histológico. Las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital sódico y perfundidas por vía intracardiaca con solución salina isotónica seguido por formaldehído al 10%. Cuando la perfusión fue terminada se extrajo el cerebro y se colocó en un frasco con una solución de formaldehído al 4% en donde permaneció por un periodo de 6 días para posteriormente realizar cortes de 50 μm de espesor en el criostato y teñirlos con la técnica de Nissl. Para el análisis estadístico, solo fueron tomadas en cuenta los datos de las ratas cuyas cánulas se localizaron en la región del estriado deseada y que se tuviera la certeza de haber recibido el fármaco.

6.4.7 Diseño experimental

6.4.7.1 Análisis estadístico

La latencia de adquisición se utiliza como indicador del estado motor y motivacional de las ratas, esta variable se mide en segundos y mide la cantidad de segundos que tarda el individuo de pasar de un compartimento a otro en la sesión de entrenamiento. La latencia de retención es el tiempo que tardo en cruzar la rata del compartimento de seguridad al de castigo, pero esta vez sin recibir el choque, dándoles un máximo de 600 segundos para hacerlo, al llegar a este tiempo se da por finalizada la sesión de prueba y el animal se regresa a su caja.

Se utilizó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal Wallis para ambas latencias con la finalidad de determinar diferencias significativas ($p < 0.05$) en los grupos, esto debido a que las variable de latencia de retención y de adquisición no siguen una distribución normal porque se utilizan cortes arbitrarios de 60 segundos en la latencia de adquisición y 600 segundos en la latencia de retención. Las comparaciones entre pares de grupos se hicieron con la prueba de U de Mann-Whitney.

La elaboración de gráficas de resultados así como el procesamiento de datos para el análisis estadístico se hizo utilizando el programa computacional Sigma Plot versión 12.

En todos los experimentos planteados a continuación se formaron grupos de ratas con una n de al menos 8 ratas.

Experimento 1. Curva dosis-respuesta CORT:BSA. Para determinar la dosis de CORT:BSA que tiene un efecto de facilitación de la memoria, se estudiaron cuatro grupos independientes de ratas que recibieron las dosis de 5, 10 o 20 ng/0.5 μ l y un grupo control que recibió el vehículo de la CORT:BSA. Los tratamientos se administraron inmediatamente después del entrenamiento. Las ratas, en este experimento se entrenaron con una intensidad de choque de 0.45 mA con el objetivo de que la memoria derivada de la experiencia pudiese ser sujeta a una facilitación observable; el uso de choques de mayor intensidad genera un efecto de retención ubicado en el máximo de la escala que no es sujeto de mejorarse con tratamientos, pues la sola experiencia es suficiente para generar una retención sólida (Prado-Alcalá y col., 2006).

Experimento 2. Curva dosis-respuesta de muscimol. Se realizó una curva dosis respuesta para determinar la dosis de muscimol que produce efecto de deterioro en la consolidación de la memoria. Se estudiaron tres grupos independientes de ratas que recibieron las dosis de 5 o 50 μ M/0.5 μ l y un grupo control que recibió el vehículo del muscimol. Los tratamientos se administraron inmediatamente después de la sesión de entrenamiento. El entrenamiento de las ratas se realizó utilizando una intensidad de choque de 0.6 mA, con la finalidad de generar una traza de memoria sólida, que al administrar tratamientos potencialmente amnésicos se pudiera observar el efecto de deterioro en la memoria. La retención de la memoria se midió 48 horas después de la sesión de entrenamiento.

Experimento 3. Interacción del GABA con la CORT:BSA: Con la finalidad de analizar la interacción del GABA con la CORT:BSA, de los experimentos 1 y 2 se tomaron en cuenta las dosis efectivas de los fármacos que tuvieron efectos sobre la

consolidación de la memoria. Se formaron grupos independientes de ratas como se describe en el Cuadro 3, para someter a la prueba experimental la hipótesis de que los receptores GABA_A interactúan con los receptores GRms en la modulación de la memoria. En este Experimento los grupos de ratas se entrenaron con una intensidad de choque de 0.45 como la que se utilizó en el Experimento 1. Con el objetivo de observar los cambios en la retención derivados de los fármacos, ya sea tanto efectos de facilitación como de deterioro.

En resumen, al administrar CORT:BSA en ausencia de muscimol, se esperaba mejora en la consolidación de la memoria. Por el contrario, al bloquear los receptores GABA_A con muscimol, se esperaba deterioro. Cuando se administró CORT:BSA en presencia de muscimol se esperaba que el efecto de mejora en la retención no se produjera ya que es necesario que los receptores GABA_A estén libres para que en conjunto con la activación de los GRmss, se produzca la facilitación de la memoria.

La CORT:BSA produce una mejora en la retención de la memoria por medio de los receptores membranales GRmss que interactúan con los receptores GABA_A, entonces el muscimol al bloquear a los receptores GABA_A no permite la mejora en la retención.

Cuadro 3. Formación de grupos para la administración de los tratamientos

	Fármaco administrado	Fármaco administrado
Grupo 1	Vehículo de CORT:BSA	Vehículo de Muscimol
Grupo 2	CORT:BSA	Vehículo de Muscimol
Grupo 3	Vehículo de CORT:BSA	Muscimol
Grupo 4	CORT:BSA	Muscimol

7 RESULTADOS.

7.1 Verificación Histológica

Por medio de la realización de cortes coronales del cerebro de la rata (Figura 10) con la ayuda de un criostato, se verificó la ubicación de las puntas de las cánulas que tenían como blanco el estriado anterodorsal para comprobar que los fármacos utilizados en cada experimento hubieran llegado a la estructura cerebral deseada.

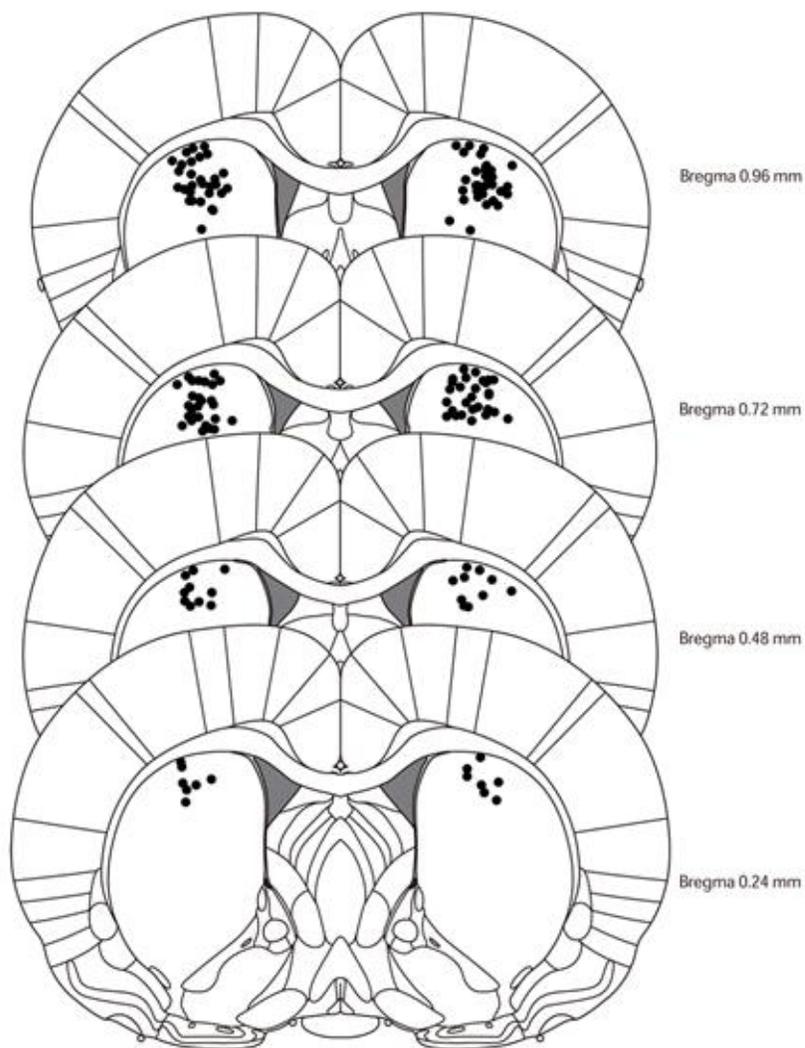


Figura 10. Diagrama de cortes coronales del cerebro de la rata que muestra la ubicación de las puntas de las cánulas para los sujetos que tenían como blanco el estriado anterodorsal, de acuerdo con las coordenadas (Estriado AP= 0 mm Bregma; ML= ± 3.2 ; DV= -4) presentadas en la sección de cirugía.

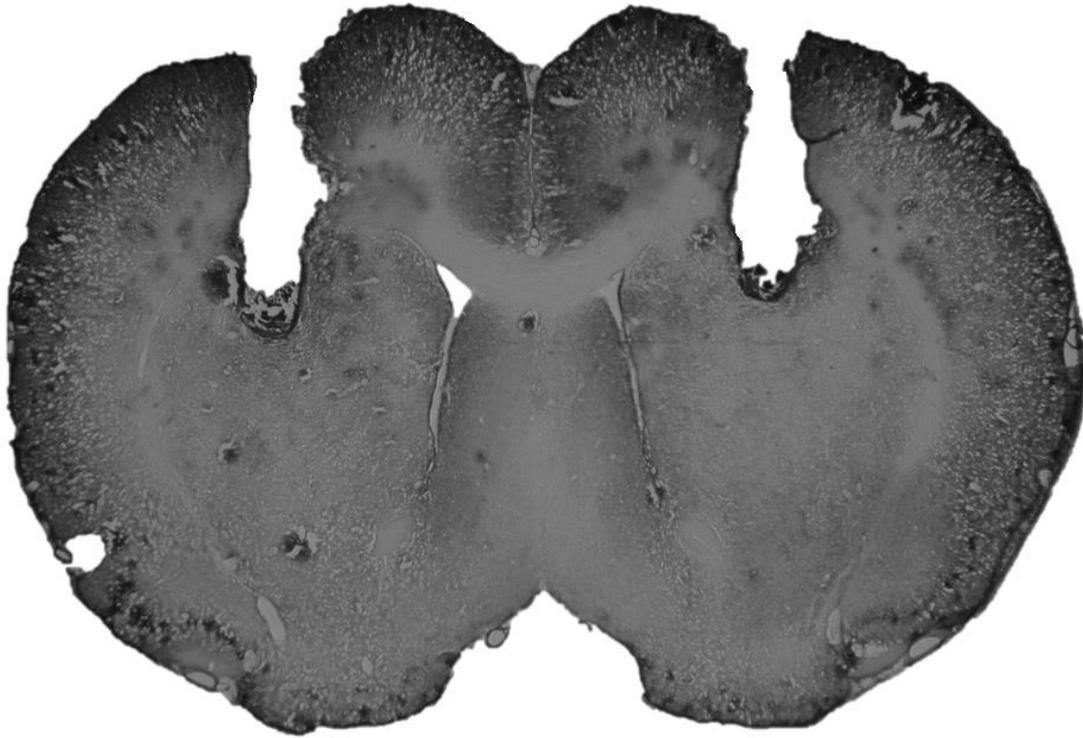


Figura 11. Corte coronal de cerebro de rata de 50 μm teñido por técnica de Nissl. En el que se muestra el trayecto de las cánulas implantadas en el estriado anterodorsal.

7.2 Experimento 1. Efecto de la CORT:BSA sobre la consolidación de la memoria.

Se analizaron las latencias de adquisición y de retención de cuatro grupos independientes de ratas con diferentes dosis (5, 10 o 20 ng/0.5 μl) de CORT:BSA y un grupo control que recibió vehículo (Figura 12). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las latencias de adquisición en ninguno de los grupos ($H= 2.110$, $p=.05499$) por lo que todos los sujetos presentan la misma actividad motora antes de recibir el tratamiento.

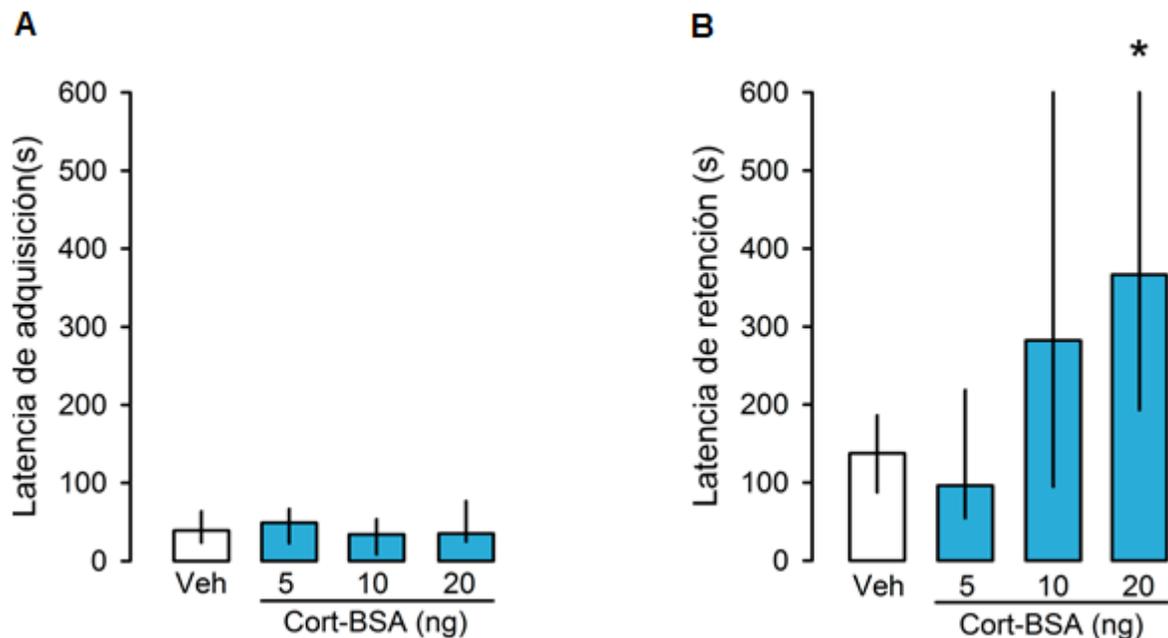


Figura 12. Medianas y rangos intercuantiles de los diferentes grupos. A. Latencia de adquisición. B. Latencia de de grupos independientes de ratas que inmediatamente después del entrenamiento recibieron la administración en el estriado de vehículo (n=10) o CORT: BSA en las dosis de 5 (n=10), 10 (n=11) o 20 (n=11) ng. El * representa diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo vehículo $p < 0.05$.

En las latencias de retención, encontramos que los grupos tuvieron diferencias significativas ($H=7.990$, $p= .0462$). Posteriormente, con la prueba de U de Mann-Whitney encontramos que el grupo que recibió la dosis de 20 ng de CORT:BSA tuvo una retención significativamente mayor que el grupo que recibió el vehículo ($U=14$, $p=0.0101$). Al estar unida a la BSA (CORT:BSA) esta impide el paso de la corticosterona al interior de la célula por lo que sugiere que el efecto facilitador de la corticosterona puede ser mediado por los GRms.

7.3 Experimento 2. Efecto del muscimol sobre la consolidación de la memoria

Se formaron tres grupos independientes de ratas que recibieron diferentes dosis de muscimol (5 μ M, 50 μ M/.5 μ L) y un grupo control que recibió el vehículo, inmediatamente después del entrenamiento (Figura 13). Se analizaron las latencias

de adquisición y retención por medio de la prueba de Kruskal-Wallis. No existieron diferencias estadísticamente significativas ($H= 1.282$, $p= 0.5267$) en la latencia de adquisición por lo que todos los sujetos presentaron la misma actividad motora

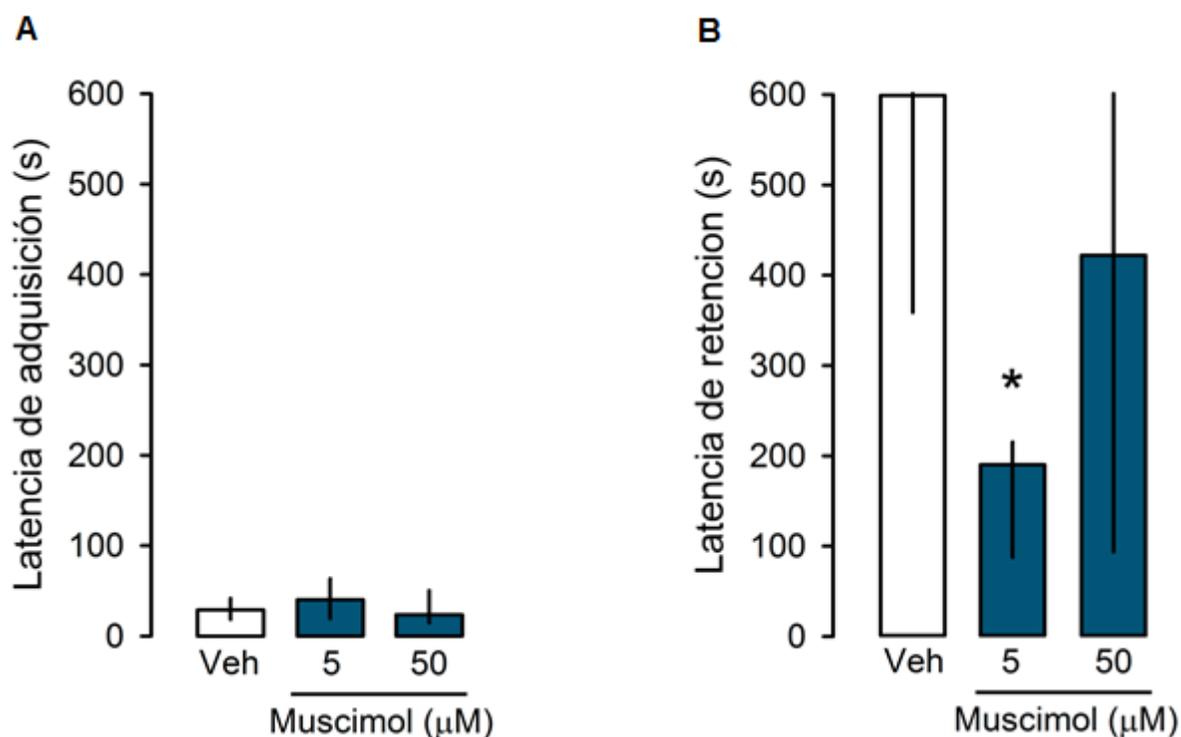


Figura 13. Medianas y rangos intercuartilares de los diferentes grupos. A. Latencia de adquisición. B. Latencia de retención de ratas que inmediatamente después del entrenamiento recibieron la administración en el estriado de vehículo ($n=12$), muscimol dosis de 5 ($n=12$) o 50 μM ($n=13$).

Al analizar las latencias de retención encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($H= 11.39$, $p=.0034$). Con la finalidad de conocer entre que grupos existían las diferencias realizamos una prueba de U de Mann-Whitney y encontramos que el grupo que recibió la dosis de 5 μM de muscimol es significativamente diferente al resto de los grupos ($U=20$, $p=0.0016$). La dosis más baja de muscimol (5 μM) que se utilizó en este experimento produjo deterioro en la consolidación de la memoria.

7.4 Experimento 3. Posible interacción de los receptores GABA_A en la consolidación de memoria.

Para comprobar la hipótesis de que los receptores GABA_A interaccionan con los receptores GRMs en la modulación de la memoria se analizaron las latencias de adquisición y de retención de cuatro grupos independientes de ratas (Figura 14), se tomaron en cuenta las dosis efectivas de los fármacos que tuvieron efectos sobre la memoria en los experimentos 1 y 2. La combinación de los fármacos utilizados en este experimento se indica en el Cuadro 3. No hay diferencias estadísticamente significativas ($H=3.862$, $p=0.2768$) en las latencias de adquisición en ninguno de los grupos, por lo que todos los sujetos presentaron la misma actividad motora previa al tratamiento.

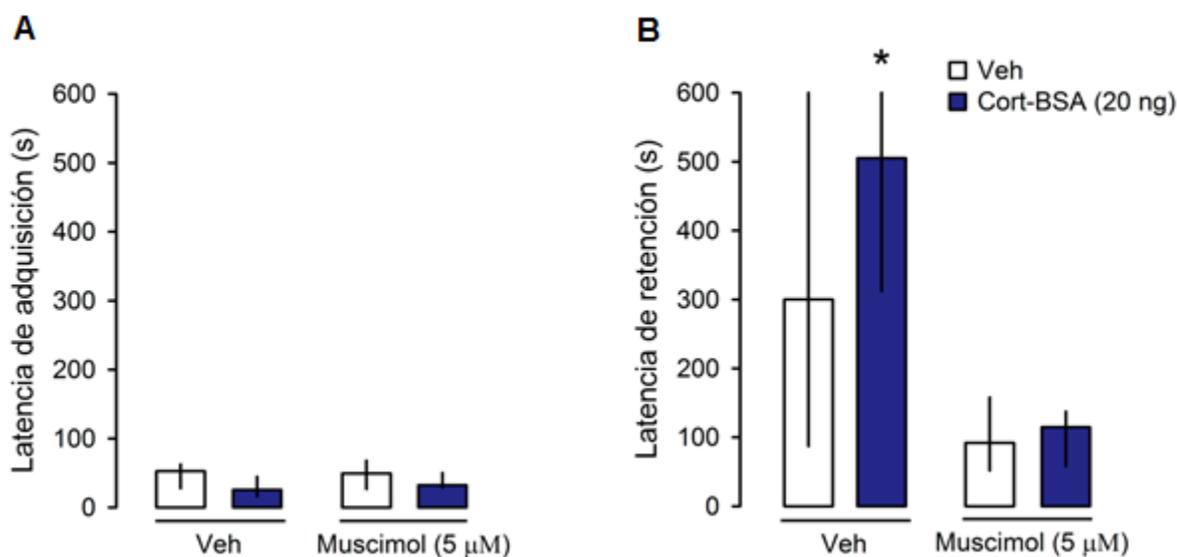


Figura 14. Medianas y rangos intercuartilares de los diferentes grupos. A. Latencia de adquisición. B. Latencia de retención de ratas que inmediatamente después del entrenamiento recibieron la administración en el estriado de vehículo de muscimol o muscimol (5 μM) y 10 minutos después vehículo de CORT:BSA o CORT:BSA (20 ng). Vehículo-muscimol y vehículo de CORT:BSA (n= 8), CORT:BSA y vehículo muscimol (n=8), Vehículo CORT:BSA y muscimol (n=7); y CORT:BSA y muscimol (n=8).

En la sesión de prueba se analizó la latencia de ($H= 13.11$, $p= .0044$). El primer grupo fue el grupo control en el cual se administró el vehículo de ambos fármacos (CORT:BSA y Muscimol). La latencia de retención de este grupo es más alta que la presentada en los grupos control de los experimentos anteriores. En el segundo grupo se administró el vehículo del muscimol con la CORT:BSA; existe una diferencia estadísticamente significativa ($U= 26$, $p=0.3435$) con respecto al grupo control; el efecto facilitador de la CORT:BSA se mantuvo al igual que en el Experimento 1.

En el tercer y cuarto grupo se administró muscimol en combinación con el vehículo de CORT:BSA y CORT:BSA respectivamente. El tercer grupo muestra que el efecto de deterioro en la consolidación de la memoria por la administración del muscimol en la dosis de $5 \mu\text{M}$ no se afectó por el vehículo de la CORT:BSA ($U= 15$, $p= 0.1466$). Por último, en el cuarto grupo la latencia de retención es significativamente menor ($U=18$, $p=0.1550$) en comparación al grupo control y al grupo al cual se le administró CORT:BSA con vehículo de muscimol; encontramos que el efecto facilitador de la CORT:BSA es bloqueado cuando se administra 10 minutos antes el muscimol, que provoca de igual manera un deterioro en la consolidación de la memoria aun con la administración de CORT:BSA.

8. DISCUSIÓN

Los efectos de los glucocorticoides en los procesos de memoria han sido atribuidos al mecanismo clásico de regulación genómica a través de factores de transcripción (Makara y Haller, 2001). Descubrimientos recientes en neuroendocrinología sugieren que los glucocorticoides pueden regular rápidamente la actividad neuronal por medio de un mecanismo no genómico vía la activación de receptores membranales (Borski, 2000; Falkenstein y col., 2000b).

Los mecanismos moleculares que regulan los efectos no genómicos de los glucocorticoides han sido clasificados en dos maneras según la clasificación de Mannheim. (A) Efectos directos, son donde los glucocorticoides actúan por sí mismos, y (B) efectos indirectos donde los glucocorticoides necesitan de un agonista para generar una respuesta rápida (Falkenstein y col., 2000a).

Los mecanismos no genómicos afectan el funcionamiento de la célula en una gran cantidad de tejidos y órganos por medio de una amplia gama de procesos intracelulares. La de acción de los glucocorticoides tanto por las vías genómicas como no genómicas no son mecanismos del todo independientes sino que funcionan muchas veces en tándem. Los mecanismos no genómicos activan de manera secundaria la síntesis de proteínas y factores de transcripción (Haller y col., 2008).

La corticosterona unida covalentemente a una proteína como la BSA ha sido ampliamente usada para evaluar efectos de los glucocorticoides en procesos cognitivos por medio de la activación o interacción de los receptores de membrana y no por la vía genómica (Haller y col., 2008).

En el Experimento 1 se utilizó la CORT:BSA que observamos que generó una facilitación en la consolidación de la memoria de manera dosis dependiente en el estriado, a mayor concentración de CORT se obtuvo una mayor latencia de retención; la CORT:BSA no puede entrar a la célula debido a que está conjugada con la molécula hidrófoba de BSA que impide la libre difusión de CORT en la

célula, por lo que sugiere que la mejora en la consolidación de la memoria se está llevando a cabo por medio de las vías rápidas de señalización, es decir por medio de las interacciones de los receptores membranales y no por la vía genómica.

En el Experimento 2 se utilizó el muscimol que es ampliamente utilizado en micro inyecciones para estudios conductuales donde se requiere de la inactivación reversible de áreas específicas del cerebro. El muscimol solo inactiva la actividad de las neuronas locales. Según estudios una inyección de 0.5 μ l tiene una difusión máxima de 1.75 mm² del sitio de inyección (Edeline y col., 2002). Los efectos producidos por el muscimol son observables desde los primeros minutos hasta horas posteriores de la inyección, esto permite su uso para el estudio de efectos en la conducta (Edeline y col., 2002).

Existen estudios que indican que el muscimol en pequeñas concentraciones funciona como un amplio y potente agonista a los receptores GABA_A (Johnston y col., 1968).

El muscimol es utilizado ampliamente como agonista selectivo de GABA_A, sin embargo tiene un efecto más potente como agonista parcial de los GABA_C. Por ello la interpretación de los resultados de los efectos del muscimol con base en la participación de los GABA_A en tejidos completos es parcial a menos que los efectos del muscimol sean completamente bloqueados por el antagonista bicuculina y no responda a TPMPA (Antagonista a GABA_C) (Johnston, 2014).

La afinidad que tienen diferentes fármacos cuyo blanco son los receptores GABA_A cambia según la conformación de los receptores, es decir según el tipo y la combinación de las subunidades que lo integran. La acción del muscimol sobre las diferentes combinaciones de subunidades de los receptores GABA_A es relativamente uniforme (Ebert y col., 1997) excepto por la combinación de los receptores $\alpha 4\beta 3\delta$ que son considerados como receptores GABA extrasinápticos. (Mortensen y col., 2010; Storustovu y Ebert, 2006). El muscimol actúa aparentemente como un súper agonista de estos receptores aumentando su

eficacia comparado con el propio GABA, 120-140 % de la máxima eficacia de GABA (Mortensen y col., 2010; Storustovu y Ebert, 2006).

Al contrario del efecto que otros fármacos, el muscimol no genera un mayor efecto amnésico conforme la concentración aumenta, como en este estudio, encontramos que la concentración de 5 μM es la que tiene mayor efecto de deterioro de la memoria, mientras que la dosis de mayor concentración 50 μM no produce deterioro en la consolidación a mayor concentración.

Los efectos de los agonistas son altamente dependientes de las concentraciones usadas así como las concentraciones endógenas de GABA. A concentraciones distintas, diferentes poblaciones de receptores pueden contribuir a que diferentes redes neuronales sean afectadas (Nasrallah y col., 2009).

En un estudio realizado por Maria D. Majewska y colaboradores midieron el efecto de los glucocorticoides en los receptores GABA_A en ratas adrenalectomizadas utilizando el agonista muscimol. Utilizaron cerebros de ratas adrenalectomizadas, dos semanas posteriores a la cirugía los cuales fueron disecados en diferentes regiones.

En este estudio se probó la hipótesis de que la unión del agonista GABA en ratas adrenalectomizadas está directamente relacionado con los niveles reducidos de glucocorticoides circulantes (Majewska y col., 1985).

Los glucocorticoides modulan directamente la unión del agonista GABA en membranas de cerebro de rata (Majewska y col., 1985). Las concentraciones fisiológicas de los glucocorticoides potencian la acción del agonista de GABA a sus receptores en diversas regiones como la corteza, hipocampo, tálamo o cerebelo puede explicar los rápidos efectos inhibitorios de los glucocorticoides sobre la descarga neuronal en el SNC.

La evidencia sugiere que los glucocorticoides actúan directamente a nivel membranal alterando la afinidad de los receptores GABA_A . Esto explica en parte

sus propiedades anestésicas, sedativas o anticonvulsiva de ciertos esteroides (Halsey y Wardley-Smith, 1983).

En el Experimento 3 se formaron 4 grupos independientes de ratas a los cuales se les administro una combinación de fármacos o vehículo como lo indica el cuadro 1. En el grupo control donde se utilizó vehículo/vehículo presento una latencia de retención más alta que los grupos control de los experimentos anteriores; esto puede explicarse debido a que los animales estuvieron sometidos a mayor estrés dado que en este experimento la administración de los fármacos fue en dos inyecciones con un tiempo de separación de 10 minutos entre cada inyección. En los grupos donde la combinación fue vehículo/CORT:BSA o vehículo/Muscimol las dosis efectivas de ambos fármacos siguieron generando los mismos efectos de facilitación en la consolidación de la memoria o de deterioro.

En el cuarto grupo se utilizaron las dosis efectivas de ambos fármacos para la comprobación de hipótesis; si existe o no la interacción entre los receptores GR_ms y los receptores GABA_A. Los resultados indican una clara regulación por parte de los GABA_A en la consolidación de la memoria. La facilitación por la CORT:BSA se ve inhibida por la acción del agonista GABA_A.

Los glucocorticoides han sido ampliamente usados como supresores de inflamación (en asma, artritis reumatoide y enfermedades autoinmunes) y respuestas inmunes (Barnes, 1998).

Generalmente se cree que los mecanismos genéticos son responsables de la mayoría o todos los efectos terapéuticos de los glucocorticoides (Beato M, 1995). Infortunadamente las terapias con glucocorticoides tienen una gran cantidad de efectos secundarios como atrofia de la piel, disminución de la cicatrización de heridas, osteoporosis, atrofia muscular, miopatía, glaucoma, la hipertensión, la diabetes mellitus, y agravar problemas psiquiátricos existentes, puede causar cambios de humor, euforia, depresión, psicosis, y los intentos de suicidio (Schacke y col., 2002).

Una manera de optimizar el uso terapéutico de los glucocorticoides podría ser el desarrollo de nuevos fármacos que afecten selectivamente los mecanismos de acción no genómicos de los glucocorticoides (Song y Buttgereit, 2006). Algunos estudios incluso sugieren que los mecanismos no genómicos pueden ser más importantes para la terapia que los genómicos (Liu y col., 2005). La evidencia indica que los mecanismos no genómicos pueden ser también importantes para el tratamiento de desórdenes psicológicos (Lee y col., 2007; Rao y col., 2006).

Estudios sugieren que las respuestas rápidas por efectos no genómicos de los glucocorticoides afectan la conducta. En algunos casos la respuesta conductual se desarrolla rápidamente y el tiempo de retardo del efecto de los glucocorticoides esta debajo de 10 minutos. (Makara y Haller, 2001). Algunos ejemplos son la potenciación de la respuesta de lordosis en ratas (5 min; Kubli-Garfias, 1990), y el aumento de la perca de salto de los gorriones coronados blancos (Breuner y col., 1998).

La memoria fue afectada por los glucocorticoides en ratas dentro de 30 minutos, este efecto no pudo ser bloqueado por la inhibición de la síntesis de proteínas (Sajadi A. A y col., 2006). Estos hallazgos sugieren que los glucocorticoides afectan de manera no genómica en la memoria, reproducción y agresión. Por lo cual son importantes los estudios conductuales que abordan los mecanismos no genómicos de los glucocorticoides.

9. CONCLUSIÓN

Encontramos que la dosis de 5 μ M de muscimol causa un deterioro en la consolidación de la memoria y la administración de CORT:BSA (20 ng) facilita la retención de la memoria. Esta facilitación es bloqueada con la administración previa del agonista muscimol por lo que sugiere que la modulación de la memoria se da por medio de las vías rápidas de señalización a través de los GRms y que los glucocorticoides interactúan con el sistema GABAérgico estriatal en la consolidación de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria.

REFERENCIAS

Akk G, Shu HJ, Wang C, Steinbach JH, Zorumski CF, Covey DF, Mennerick S. Neurosteroid access to the GABAA receptor. *J Neurosci.* **2005**;25:11605-11613.

Akk G, Covey DF, Evers AS, Steinbach JH, Zorumski CF, Mennerick S. Mechanisms of neurosteroid interactions with GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther.* **2007**;116:35-57.

Balleine BW, Delgado MR, Hikosaka O. The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. *J Neurosci.* **2007**;27:8161-8165.

Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science.* **1998**;94:557-572.

Bayley PJ, Squire LR. The neuroanatomy and neuropsychology of declarative and nondeclarative memory. En: Bontempi B, Silva A, Christen Y, eds. *Memories: Molecules and circuits*: Springer; **2007**:1.

Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev.* **2004**;84:835-867.

Borski RJ. Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends Endocrinol Metab.* **2000**;11:427-436.

Breuner C.W., Greenberg A.L., Wingfield J.C. Noninvasive corticosterone treatment rapidly increases activity in Gambel's white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **1998**;111:386-394

Camarasa J. Metodología experimental para la evaluación de déficits cognitivos. En: Beas C, Zárata M, Ureña-Guerrero E, Pallàs-Lliberia M, Camins A, eds. *Tópicos de actualización en neurobiología. Procesos cognoscitivos y mecanismos de neurodegeneración*. Guadalajara: Universidad de Guadalajara; **2008**:312.

de Kloet ER, Karst H, Joëls M. Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Front Neuroendocrinol.* **2008**;29:268-272.

Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslin H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA. Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci.* **2003**;23:2371-2382.

Di S, Malcher-Lopes R, Marcheselli VL, Bazan NG, Tasker JG. Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and gamma-aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *Endocrinology*. **2005**;146:4292-4301.

Díaz-Trujillo A, Contreras J, Medina AC, Silveyra-Leon GA, Antaramian A, Quirarte GL, Prado-Alcalá RA. Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiol Learn Mem*. **2009**;91:310-314.

Dudai Y. Molecular bases of long-term memories: A question of persistence. *Curr Opin Neurobiol*. **2002**;12:211-216.

Dudai Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol*. **2004**;55:51-86.

Ebert B, Thompson SA, Saounatsou K, McKernan R, Krogsgaard-Larsen P, Wafford KA. Differences in Agonist/Antagonist Binding Affinity and Receptor Transduction Using Recombinant Human γ -Aminobutyric Acid Type A Receptors. *Molecular Pharmacology*. **1997**;52:1150-1156.

Eberwine J. Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptors as Transcription Factors. En: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, eds. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; **1999**.

Edeline JM, Hars B, Hennevin E, Cotillon N. Muscimol diffusion after intracerebral microinjections: a reevaluation based on electrophysiological and autoradiographic quantifications. *Neurobiol Learn Mem*. **2002**;78:100-124.

Falkenstein E, Norman AW, Wehling M. Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **2000a**;85:2072-2075.

Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*. **2000b**;52:513-556.

French-Mullen JM. Cortisol inhibition of calcium currents in guinea pig hippocampal CA1 neurons via G-protein-coupled activation of protein kinase C. *J Neurosci*. **1995**;15:903-911.

Flexner LB, Goodman RH. Studies on memory: inhibitors of protein synthesis also inhibit catecholamine synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1975**;72:4660-4663.

Gold PE. Coordination of multiple memory systems. *Neurobiol Learn Mem*. **2004**;82:230-242.

Halsey MJ, Wardley-Smith B. Non-anesthetic steroids ameliorate the high pressure neurological syndrome in rats. *Neuropharmacology*. **1983**;22:103-108.

Hall JE. Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica. 12th edicion. Barcelona, España: Elsevier España, S.L., **2011**.

Haller J, Mikics E, Makara GB. The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Front Neuroendocrinol*. **2008**;29:273-291.

Hamill OP, Bormann J, Sakmann B. Activation of multiple-conductance state chloride channels in spinal neurones by glycine and GABA. *Nature*. **1983**;305:805-808.

Hilgard ER, Bower GH. Teorías del aprendizaje. 10^{ma} edicion. México: Trillas, **1987**:12-26, 69-90.

Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM, Smart TG. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*. **2006**;444:486-489.

Introini-Collison IB, Castellano C, McGaugh JL. Interaction of GABAergic and beta-noradrenergic drugs in the regulation of memory storage. *Behav Neural Biol*. **1994**;61:150-155.

Joels M, Karst H, Krugers HJ, Lucassen PJ. Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Front Neuroendocrinol*. **2007**;28:72-96.

Joëls M, Pu ZW, Wiegert O, Oitzl MS, Krugers HJ. Learning under stress: How does it work? *Trends Cogn Sci*. **2006**;10:152-158.

Joëls M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci*. **2009**;10:459-466.

Johnston GA, Curtis DR, De Groat WC, Duggan AW. Central actions of ibotenic acid and muscimol. *Biochem Pharmacol*. **1968**;17:2488-2489.

Johnston GA, Chebib M, Hanrahan JR, Mewett KN. Neurochemicals for the investigation of GABA(C) receptors. *Neurochem Res.* **2010**;35:1970-1977.

Johnston GA. Muscimol as an ionotropic GABA receptor agonist. *Neurochem Res.* **2014**;39:1942-1947.

Kandel ER, Kupfermann I, Iversen S. Learning and memory. En: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds. *Principles of neural science.* 4th ed. New York: McGraw Hill; **2000**:1227-1246.

Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schutz G, Joëls M. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2005**;102:19204-19207.

Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci.* **2002**;3:453-462.

Kimble GA. Hilgard and Marquis' *Conditioning and Learning.* New York: Appleton-Century-Crofts, **1961**:570

Kino T, Tiulpakov A, Ichijo T, Chheng L, Kozasa T, Chrousos GP. G protein beta interacts with the glucocorticoid receptor and suppresses its transcriptional activity in the nucleus. *The Journal of Cell Biology.* **2005**;169:885-896.

Kronenberg H, Melmed S, Larsen P, Polonsky K. Principles of endocrinology. En: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, eds. *Williams textbook of endocrinology.* 10th ed. United States: Philadelphia : Saunders; **2003**:1927.

Kubli-Garfias C. Chemical structure of corticosteroids and its relationship with their acute induction of lordosis in the female rat. *Horm. Behav.* **1990**;24:443–449.

LaBar KS, Cabeza R. Cognitive neuroscience of emotional memory. *Nat Rev Neurosci.* **2006**;7:54-64.

Lechner HA, Squire LR, Byrne JH. 100 years of consolidation - Remembering Muller and Pilzecker. *Learn Mem.* **1999**;6:77-87.

LeDoux JE. Emotional memory systems in the brain. *Behav Brain Res.* **1993**;58:69-79.

Lee HJ, Rao JS, Ertley RN, Chang L, Rapoport SI, Bazinet RP. Chronic fluoxetine increases cytosolic phospholipase A(2) activity and arachidonic acid turnover in brain phospholipids of the unanesthetized rat. *Psychopharmacology.* **2007**;190:103-115.

Liu L, Wang YX, Zhou J, Long F, Sun HW, Liu Y, Chen YZ, Jiang CL. Rapid non-genomic inhibitory effects of glucocorticoids on human neutrophil degranulation. *Inflammation Research*. **2005**;54:37-41.

Losel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. **2003**;4:46-56.

Lou SJ, Chen YZ. The rapid inhibitory effect of glucocorticoid on cytosolic free Ca²⁺ increment induced by high extracellular K⁺ and its underlying mechanism in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **1998**;244:403-407.

Macdonald RL, Olsen RW. GABA_A receptor channels. *Annul Rev Neurosci*. **1994**;17:569-602.

Maguire J. Stress-induced plasticity of GABAergic inhibition. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. **2014**;8:157.

Majewska MD, Bisslerbe JC, Eskay RL. Glucocorticoids are modulators of GABA_A receptors in brain. *Brain Res*. **1985**;339:178-182.

Makara G, Haller J. Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system Evidence, mechanisms and implications. *Prog Neurobiol*. **2001**;65:367-390.

McDonald RJ, Devan BD, Hong NS. Multiple memory systems: the power of interactions. *Neurobiol Learn Mem*. **2004**;82:333-346.

McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*. **2007**;87:873-904.

Medina AC, Charles JR, Espinoza-González V, Sánchez-Resendis O, Prado-Alcalá RA, Roozendaal B, Quirarte GL. Glucocorticoid administration into the dorsal striatum facilitates memory consolidation of inhibitory avoidance training but not of the context or footshock components. *Learn Mem*. **2007**;14:673-677.

Morgado I. Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Rev Neurol*. **2005**;40:289-297.

Morsink MC, Steenbergen PJ, Vos JB, Karst H, Joels M, De Kloet ER, Datson NA. Acute activation of hippocampal glucocorticoid receptors results in different waves of gene expression throughout time. *J Neuroendocrinol*. **2006**;18:239-252.

Mortensen M, Ebert B, Wafford K, Smart TG. Distinct activities of GABA agonists at synaptic- and extrasynaptic-type GABA_A receptors. *The Journal of Physiology*. **2010**;588:1251-1268.

Nasrallah FA, Griffin JL, Balcar VJ, Rae C. Understanding your inhibitions: effects of GABA and GABAA receptor modulation on brain cortical metabolism. *J Neurochem.* **2009**;108:57-71.

National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edicion. Washington DC: National Academy of Sciences, **2011**.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th edicion. San Diego: Academic Press, **2005**.

Poldrack RA, Packard MG. Competition among multiple memory systems: Converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia.* **2003**;41:245-251.

Prado-Alcalá RA, Cobos-Zapíaín G, Salado-Castillo R, Quiroz Molina CR, Garin-Aguilar ME, Díaz A, Díaz del Guante MA, Medina AC, Martínez I, Quirarte G. El aprendizaje incrementado protege a la memoria contra tratamientos amnésicos. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta.* **2006**;32:203-218.

Prager EM, Johnson LR. Stress at the synapse: signal transduction mechanisms of adrenal steroids at neuronal membranes. *Science signaling.* **2009**;2:re5.

Qian H, Ripps H. Focus on Molecules: The GABA(C) Receptor. *Experimental eye research.* **2009**;88:1002-1003.

Quirarte G. L, Roozendaal B, McGaugh J. L. Glucocorticoid receptor antagonist infused into the basolateral amygdala inhibits the memory-enhancing effects of the noradrenergic agonist infused clenbuterol. *Society for Neuroscience* **1997**;27:1314

Rao JS, Ertley RN, Lee HJ, Rapoport SI, Bazinet RP. Chronic fluoxetine upregulates activity, protein and mRNA levels of cytosolic phospholipase A2 in rat frontal cortex. *The Pharmacogenomics Journal.* **2006**;6:413-420.

Roth TL, Sweatt JD. Rhythms of memory. *Nat Neurosci.* **2008**;11:993-994.

Sánchez-Navarro J, Román F. Amígdala, corteza prefrontal y especialización hemisférica en la experiencia y expresion emocional. *Anales de Psicología.* **2004**;20:223-240.

Sajadi A. A, Samaei S. A, Rashidy-Pour A. Intra-hippocampal microinjections of anisomycin did not block glucocorticoid-induced impairment of memory retrieval in rats: An evidence for non-genomic effects pf glucocorticoids. *Behaviuoral Brain Research* **2006**;13:158-162

Schacke H, Docke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther.* **2002**;96:23-43.

Sharma AC, Kulkarni SK. Evidence for GABA-BZ receptor modulation in short-term memory passive avoidance task paradigm in mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* **1990**;12:175-180.

Shu HJ, Eisenman LN, Jinadasa D, Covey DF, Zorumski CF, Mennerick S. Slow actions of neuroactive steroids at GABAA receptors. *J Neurosci.* **2004**;24:6667-6675.

Siller C. Efectos de la administración de corticosterona en el estriado sobre la selección de una estrategia de aprendizaje en el laberinto de tolman.(Tesis de Maestria, Universidad Nacional Autonoma de México, Querétaro, Juriquilla.) **2012**.

Skilbeck KJ, Johnston GA, Hinton T. Stress and GABA receptors. *J Neurochem.* **2010**;112:1115-1130.

Slotnick BM, Jarvik ME. Deficits in passive avoidance and fear conditioning in mice with septal lesions. *Science.* **1966**;154:1207-1208.

Snell RS. *Clinical neuroanatomy.* Lippincott Williams & Wilkins, **2010**.

Song IH, Buttgerit F. Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. *Mol Cell Endocrinol.* **2006**;246:142-146.

Storustovu SI, Ebert B. Pharmacological characterization of agonists at delta-containing GABAA receptors: Functional selectivity for extrasynaptic receptors is dependent on the absence of gamma2. *J Pharmacol Exp Ther.* **2006**;316:1351-1359.

Sweatt JD. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol.* **2004**;14:311-317.

Thompson RF, Kim JJ. Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1996**;93:13438-13444.

Voorn P, Vanderschuren L, Groenewegen HJ, Robbins TW, Pennartz CMA. Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences.* **2004**;27:468-474.

White NM, McDonald RJ. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem.* **2002**;77:125-184.

White NM. Multiple memory systems in the brain: Cooperation and competition. En: Byrne JH, ed. Concise learning and memory: The editor's selection. San Diego, CA: Academic Press; **2008**:28-60.

Whiting PJ. GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? Drug Discov Today. **2003**;8:445-450.

Zheng G, Zhang X, Chen Y, Zhang Y, Luo W, Chen J. Evidence for a role of GABAA receptor in the acute restraint stress-induced enhancement of spatial memory. Brain Res. **2007**;1181:61-73.