



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Efectos del estrés agudo en la consolidación de la memoria espacial y la acetilación de la histona 3 en el cerebro**

**Ginna Paola Urueña Méndez**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias humanas

Departamento de psicología

Bogotá D.C., Colombia

2016

# **Efectos del estrés agudo en la consolidación de la memoria espacial y la acetilación de la histona 3 en el cerebro**

**Ginna Paola Urueña Méndez**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magíster en Psicología**

Directora:

Marisol Lamprea Rodríguez, MSc, PhD.

Línea de Investigación:

Efectos del estrés sobre el aprendizaje con el uso de modelos experimentales

Grupo de Investigación:

Neurofisiología comportamental

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias humanas

Departamento de psicología

Bogotá D.C., Colombia

2016

*Science never solves a problem without creating ten more.*

*George Bernard Shaw*

## **Agradecimientos**

Quisiera dedicar esta tesis a mi familia. A mis papás por su infinito amor y su apoyo incondicional. A mi hermana por sus palabras de ánimo siempre y a Juli, mi sobrino, porque aunque no entiende exactamente qué es una tesis siempre estuvo dispuesto a ayudar. A ellos, mi tesoro y mi corazón.

Asimismo quiero agradecerle a mi supervisora, la profesora Marisol Lamprea por su confianza, por por todo su apoyo, tanto a nivel académico como personal, por su paciencia, por su disposición a ayudar, por su dirección en los experimentos realizados y por todo lo que me ha enseñado desde que ingrese a su práctica.

Igualmente quiero agradecerle al profesor Alejandro Múnera por sus explicaciones, por su tiempo y por su ayuda.

Le agradezco especialmente a Viviana Vargas por todo lo que me ha permitido aprender de ella y de su trabajo, por su disposición para responder a mis inquietudes, y por sus contribuciones en el desarrollo del presente estudio.

Asimismo le agradezco a mis compañeros del grupo de Neurofisiología Comportamental y a mis compañeros del Laboratorio de Aprendizaje y Comportamiento Animal por las discusiones sobre este y otros experimentos.

Quisiera agradecer a mis profesores de la Universidad Nacional de Colombia quienes me inculcaron el amor por la investigación.

Y finalmente a la Universidad Nacional de Colombia que financió el presente estudio a través de la convocatoria del Programa Nacional de Proyectos para el Fortalecimiento de la Investigación, la Creación y la Innovación en Posgrados.

## Resumen

La consolidación de la memoria a largo plazo involucra cambios en la expresión génica; un proceso que puede ser afectado por mecanismos epigenéticos como la acetilación de las histonas. Se ha evidenciado que el estrés puede afectar la consolidación de la memoria, y recientemente se ha sugerido que el estrés puede afectar la acetilación de dichas proteínas. Sin embargo, no se ha evaluado si los efectos del estrés agudo sobre la consolidación de la memoria se asocian con cambios en la acetilación de las histonas, y tampoco se ha evaluado si estresores o tareas alternativas a los reportados previamente afectan dicha acetilación. En el presente estudio se evaluó el efecto del estrés agudo sobre la consolidación de la memoria y su relación con la acetilación de la histona 3 en la lisina 14 (H3K14ac), un marcador epigenético asociado a la actividad transcripcional; y se evaluó el efecto del estrés por restricción motora, así como el efecto del entrenamiento en el laberinto de Barnes sobre el mismo marcador. Para ello se realizaron dos experimentos. En el experimento 1, un grupo de ratas Wistar fue entrenado en la tarea espacial e inmediatamente después, la mitad de los animales fue sometida a estrés por restricción motora. 24h más tarde se realizó una prueba de recobro y se observó que los animales con estrés tuvieron un mejor desempeño en los indicadores de memoria. En el experimento 2, se evaluó el nivel de H3K14ac en distintos grupos de ratas. Al evaluar el efecto del estrés por restricción de movimientos se observó una reducción global en CA1 y el giro dentado (DG); pero una hiperacetilación en el núcleo basolateral de la amígdala (BLA). Al evaluar el efecto del entrenamiento en la tarea de Barnes se observó una reducción global en CA1 pero no se observaron cambios en otras regiones, sugiriendo que los cambios en DG y BLA son específicos del estresor. Y finalmente, al evaluar el efecto del estrés administrado durante la consolidación de la memoria se observó que la reducción en CA1 fue significativamente mayor en comparación con el grupo entrenado sin exposición al estrés y se observaron los cambios particulares inducidos por el estresor. Los resultados sugieren una posible modulación del núcleo basolateral de la amígdala sobre los efectos del estrés y los efectos del aprendizaje. En este estudio se reportó por primera vez que el estrés por restricción motora, así como el entrenamiento en el laberinto de Barnes afectan el estado de la cromatina a través de modificaciones epigenéticas en las histonas, se reportó por primera vez que los efectos del estrés agudo sobre la consolidación de la memoria se asocian con cambios epigenéticos en dichas proteínas y se reportó por primera vez una hiperacetilación en el núcleo basolateral de la amígdala en respuesta al estrés agudo.

**Palabras clave:** Consolidación, memoria espacial, estrés agudo, acetilación de histonas

## Abstract

Long-term memory consolidation involves changes in gene expression; a process affected by epigenetic mechanisms such as histone acetylation. It has been shown that stress can affect the memory consolidation; and it has recently been suggested that stress may affect the acetylation of these proteins. However it has not been assessed whether the effects of acute stress on memory consolidation are associated with changes in histone acetylation, and it has not been evaluated whether other stressors or tasks (alternatives to those previously reported) affect the acetylation of these proteins. In the present study the effect of acute stress on memory consolidation and its relationship with the acetylation of histone 3 at lysine 14 (H3K14ac), an epigenetic marker associated with transcriptional activity was assessed; also the effect of restraint stress and the training in the Barnes Maze on the same marker was evaluated. Two experiments were performed. In Experiment 1 a group of Wistar rats was trained in the spatial task and immediately thereafter, half of the animals were subjected to restraint stress. 24h later a retrieval test was performed and it was found that stressed animals performed better on memory indicators. In experiment 2, H3K14ac level was evaluated in different groups of rats. In evaluating the effect of restraint stress H3K14ac an overall reduction in CA1 and dentate gyrus (DG) was observed; but hyperacetylation in the basolateral nucleus of the amygdala (BLA) was seen. In assessing the effect of training on the Barnes maze an overall reduction was observed in CA1 but no changes were observed in other regions, suggesting that changes in DG and BLA are specific to the stressor. And finally, when assessing the effect of stress administered during memory consolidation it was observed that the reduction in CA1 was significantly higher compared to the trained group without exposure to stress; and the stressor particular changes were observed. The results suggest a possible modulation of BLA on the effects of stress and the effects of learning. In this study it was reported for the first time that acute restraint and training in the Barnes maze affect the state of chromatin by epigenetic modifications in histones; it was reported for the first time that the effects of acute stress on memory consolidation are associated with epigenetic changes in these proteins and it was reported for the first time an hyperacetylation in the basolateral nucleus of the amygdala in response to acute stress.

**Keywords:** Consolidation, spatial memory, acute stress, histone acetylation

# Contenido

**Pág.**

**Resumen.....IX**

**Lista de figuras..... XIII**

**Lista de abreviaturas ..... XVI**

**Introducción ..... 1**

Aprendizaje y memoria..... 1

    Tipos de aprendizaje ..... 2

    Tipos de memoria ..... 3

    Aprendizaje y memoria espacial..... 6

        Hipocampo, aprendizaje y memoria espacial ..... 8

Fases de la memoria ..... 10

    Consolidación de la memoria ..... 11

        Mecanismos moleculares en la consolidación de la memoria ..... 12

Regulación epigenética de la memoria ..... 14

    Modificaciones postraduccionales en las histonas ..... 16

    Acetilación de histonas y consolidación de la memoria..... 18

Estrés..... 21

    Inducción experimental de estrés ..... 22

    Respuesta fisiológica de estrés ..... 23

    Efectos del estrés en la memoria a largo plazo..... 27

        Estrés agudo y consolidación de la memoria ..... 30

    Estrés agudo y acetilación de histonas ..... 32

    Efectos del estrés agudo en la consolidación de la memoria espacial y H3K14ac .... 34

**1. Justificación..... 35**

**2. Objetivos..... 38**

    2.1 Objetivo general ..... 38

    2.2 Objetivos específicos ..... 38

---

<b>3. Hipótesis .....</b>	<b>39</b>
<b>4. Método .....</b>	<b>40</b>
4.1 Sujetos .....	40
4.2 Materiales y equipos .....	40
4.3 Procedimientos .....	43
4.3.1 Entrenamiento y evaluación de la memoria en el laberinto de Barnes.....	43
4.3.2 Inducción experimental de estrés por restricción motora .....	45
4.3.2 Inmunohistoquímica para H3K14ac .....	46
4.4 Consideraciones éticas.....	47
4.5 Tipo de investigación y diseño .....	48
4.6 Análisis estadístico .....	52
<b>5. Resultados.....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
5.1 Efectos del estrés sobre la consolidación de la memoria espacial .....	54
5.1.2. Adquisición.....	54
5.1.3. Prueba .....	58
5.2 Efecto del estrés, la adquisición y el estrés en la consolidación sobre H3K14 ..	62
5.2.1. Adquisición.....	62
5.2.2. Análisis del nivel de H3K14ac por inmunohistoquímica .....	66
5.2.3. Análisis adicional del nivel de H3K14ac a las 24h post-entrenamiento.	74

## **6. Discusión y Conclusiones**

### **Curriculum vitae**

### **Bibliografía**

### **Anexos**



## Lista de figuras

### Pág.

<b>Figura 1:</b>	Formación hipocampal en el cerebro de una rata.....	8
<b>Figura 2:</b>	Mecanismos moleculares implicados en la consolidación de la memoria. <b>¡Error!</b>	
<b>Marcador no definido.</b>		
<b>Figura 3:</b>	Modificaciones postraduccionales en las proteínas histonas <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	7
<b>Figura 4:</b>	Sistemas de respuesta al estrés .....	25
<b>Figura 5:</b>	Laberinto circular de Barnes.. .....	42
<b>Figura 6:</b>	Procedimiento de inducción de estrés agudo por restricción de motora. ....	45
<b>Tabla 1:</b>	Diseño experimental. Efectos del estrés sobre la consolidación de la memoria. .	49
<b>Figura 7:</b>	Procedimiento general.Efectos del estrés sobre la consolidación de la memoria. <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
<b>Tabla 2:</b>	Diseño experimental para la evaluación de los niveles de H3K14ac.....	50
<b>Figura 8:</b>	Procedimiento general para la evaluación de los niveles de H3K14ac.....	50
<b>Figura 9:</b>	División virtual por secciones del laberinto de Barnes .....	52
<b>Figura 10:</b>	Variables principales durante adquisición para los grupos comportamentales ....	57
<b>Figura 11:</b>	Otras variables durante adquisición para los grupos comportamentales.....	58
<b>Figura 12:</b>	Variables primarias evaluadas durante la prueba de retención .....	60
<b>Figura 13:</b>	Porcentaje de exploración por agujero durante la prueba de retención.....	62
<b>Figura 14:</b>	Porcentaje de exploración por sector durante la prueba de retención. ....	63
<b>Figura 15:</b>	Variables principales durante adquisición para grupos de inmunohistoquímica .	64
<b>Figura 16:</b>	Otras variables durante adquisición para grupos de inmunohistoquímica .....	65
<b>Figura 17:</b>	Células positivas para H3K14ac en el área CA1 del hipocampo. ....	67
<b>Figura 18:</b>	Células positivas para H3K14ac en el área CA2 del hipocampo. ....	68
<b>Figura 19:</b>	Células positivas para H3K14ac en el área CA3 del hipocampo.. .....	69
<b>Figura 20:</b>	Células positivas para H3K14ac en el DG .....	71
<b>Figura 21:</b>	Células positivas para H3K14ac en BLA.....	72
<b>Figura 22:</b>	Células positivas para H3K14ac en CeA. ....	73

---

<b>Figura 23:</b>	Células positivas para H3K14ac a las 2h y a las 24h después del entrenamiento en los grupos con adquisición y con estrés inmediatamente después de la adquisición. ....	75
-------------------	---	----

## Lista de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
CA	Cornu Ammonis
DG	Giro Dentado
BLA	Núcleo Basolateral de la Amígdala
CeA	Núcleo central de la Amígdala
AMPA	Ácido propionico de alfa amino 3 hidroxil 5 metil 4 isoxazol
NMDA	N-metil-D-aspartato
CaMKII	Proteína calcio/calmodulina
PKA	Proteína quinasa activada por adenilato ciclasa
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
ERK 1/2	Proteína quinasa regulada por la señal extracelular
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
CBP	Proteína de unión a CREB
<i>IEGs</i>	Genes de inducción temprana
<i>C-Jun</i>	Oncogen homólogo de v-jun
<i>C-Fos</i>	Oncogen homólogo del osteosarcoma viral murino FBJ
<i>Zif268</i>	Gen de respuesta de crecimiento temprano 1
<i>Bdnf</i>	Gen para el factor neurotrófico derivado del cerebro
<i>Arc</i>	Gen para la proteína del citoesqueleto regulada por actividad
DNMT	AND metil-transferasa
H	Proteína histona

---

K	Lisina
A	Arginina
S	Serina
HMT	Histona metil-transferasa
HDM	Histona demetilasa
HAT	Histona acetil-transferasa
HDAC	Desacetilasa de histonas
P300	Proteína p300 asociada a E1A
PCAF	Factor asociado a p300/CBP
ac	Acetilación
TSA	Tricostatina A
NaB	Butirato de Sodio
SAHA	Acido hidroxámico suberoilánilida
SAM	Sistema simpático adrenomedular
HHS	Eje Hipotalámico-Hipofisario-Suprarrenal
PVN	Núcleo Paraventricular Hipotálamo
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
AVP	Arginina vasopresina
ACTH	Hormona corticotropina
GR	Receptor de Glucocorticoides
MR	Receptor de Mineralocorticoides
GRE	Elemento de respuesta a Glucocorticoides
Adq	Adquisición
Est	Estrés
PR	Prueba de recobro

# **Introducción**

## **Aprendizaje y memoria**

El aprendizaje es un proceso continuo que se define como un cambio relativamente duradero en los mecanismos de la conducta como resultado de la experiencia previa con estímulos y/o respuestas específicos (Domjan, 2010). Este proceso se evidencia a través de un cambio conductual; sin embargo no todo cambio conductual es consecuencia del aprendizaje. Para que un cambio conductual se considere consecuencia del aprendizaje se debe comprobar que: 1) el cambio conductual no obedece a las transformaciones fisiológicas sucesivas que ocurren en el individuo con el paso del tiempo, desde su concepción hasta su adultez (maduración); 2) el cambio conductual no es consecuencia de una incapacidad muscular para responder a la estimulación (fatiga) y 3) el cambio conductual no es consecuencia de una disminución en la sensibilidad de un órgano sensorial (adaptación sensorial).

Que el aprendizaje pueda manifestarse posteriormente como un cambio conductual supone que los individuos retienen información sobre los estímulos y/o respuestas previamente experimentados (Rosenzweig & Leiman, 1992); a esa capacidad que tienen los individuos para codificar, almacenar, retener y recobrar información previamente experimentada se le denomina memoria (Kandel, Schwartz & Jessell, 2001; Sweatt, 2010).

De acuerdo con Aguado (2001) el aprendizaje y la memoria pueden ser vistos como dos procesos interdependientes a través de los cuales los individuos organizan, manejan y elaboran la información relevante de su medio, pues para que la memoria de una información se establezca es necesario que esa información sea previamente adquirida a través de un proceso de aprendizaje y para que el aprendizaje se manifieste es necesario que se forme una memoria sobre los estímulos y/o respuestas experimentados.

## Tipos de Aprendizaje

Tradicionalmente el aprendizaje se ha clasificado en dos categorías generales: el aprendizaje no asociativo y el aprendizaje asociativo. El aprendizaje no asociativo es la forma más simple de aprendizaje y depende de la exposición repetida a un estímulo o una serie de estímulos no relacionados. Dentro de los tipos de aprendizaje no asociativo se incluyen el efecto de sensibilización o el aumento en la tendencia a responder por la presentación reiterada del estímulo y el efecto de habituación o la disminución en la tendencia a responder por la estimulación repetida (Kandel, et al., 2001).

A diferencia de la disminución en la tendencia a responder generada por la adaptación sensorial o la fatiga, aquella generada por el aprendizaje no asociativo es específica del estímulo y es específica de la respuesta; pues aunque el individuo deja de responder a un estímulo particular, puede responder a otros estímulos de la misma clase; y aunque deja de responder con un aspecto de su conducta (e.g. respuesta de orientación) es capaz de responder con otro aspecto de la misma (e.g. respuesta auditiva) (Domjan, 2010).

Por su parte, el aprendizaje asociativo es una forma más compleja de aprendizaje y depende de la exposición repetida a la relación entre dos estímulos o a la relación entre una respuesta y sus consecuencias; para que dicha relación sea establecida es necesario que los estímulos o la respuesta y sus consecuencias sean contiguos en el tiempo y que exista validez predictiva entre ellos (Kandel, et al., 2001). Las formas más estudiadas de aprendizaje asociativo son el condicionamiento clásico y el condicionamiento operante. En el condicionamiento clásico los animales aprenden la relación entre dos estímulos, uno de ellos es necesario, biológicamente relevante y promueve una respuesta refleja; este estímulo se denomina estímulo incondicional o EI y la respuesta que promueve se denomina respuesta incondicional o RI. El segundo estímulo implicado, en principio es biológicamente neutro y antes de su presentación conjunta con el EI no promueve una respuesta biológicamente relevante; este estímulo se denomina estímulo condicional o EC. Luego del emparejamiento repetido entre el EC y el EI, el EC adquiere la propiedad de provocar una respuesta biológicamente relevante o RC que puede ser similar o no a la RI (Domjan, 2010).

En el condicionamiento operante los animales aprenden la relación entre una respuesta operante y una consecuencia; esa respuesta operante es definida no como un patrón particular de acciones motoras sino como un conjunto de respuestas de una misma clase que tienen un efecto particular en el ambiente (Gluck, Mercado, & Myers, 2008). En función de las consecuencias, la probabilidad de emisión futura de la respuesta operante se modifica, de modo que si la respuesta conduce a una consecuencia apetitiva para el animal, la emisión futura esa respuesta se hace más probable (refuerzo), pero si la respuesta conduce a una consecuencia que genera aversión, la emisión futura de esa respuesta se hace menos probable (castigo). El condicionamiento operante puede incluir un estímulo discriminativo que le indica al individuo la vigencia de la situación operante, es decir la disponibilidad o no de una consecuencia determinada dependiente de la emisión de la respuesta (Domjan, 2010).

## **Tipos de memoria**

La memoria se ha clasificado principalmente con base en dos criterios, el primer criterio corresponde al tiempo durante el cual la información adquirida es retenida y susceptible de ser recobrada, así como a la cantidad de información que se puede retener y el segundo criterio corresponde al tipo de información almacenada (Baddeley, 2004).

Con base en el criterio temporal, la memoria se ha clasificado en memoria de trabajo o a corto plazo y en memoria a largo plazo. La memoria a corto plazo se define como la capacidad para retener temporalmente, en un rango de segundos a minutos, una cantidad limitada de la información recientemente percibida (i.e. 7 más o menos 2 ítems) (Atkinson & Shiffrin, 1968); esta forma de memoria depende del repaso activo y de los procesos atencionales, pues es fácilmente afectada por la adquisición de nueva información o por la exposición a distractores (Gluck, et al., 2008). Por su parte, la memoria a largo plazo se define como la capacidad para retener durante periodos prolongados de tiempo, en un rango de días a meses o años, grandes cantidades de información independientemente del momento de adquisición de la misma (Sternberg, 2012).

Según el tipo de información almacenada la memoria puede clasificarse como memoria no declarativa o implícita y memoria declarativa (Soriano, Guillazo, Redolar, Torras, & Vale, 2007). La memoria no declarativa o implícita se refiere a la adquisición, el almacenamiento, la retención y el recobro no consciente del saber procedimental (i.e. Saber cómo), el cual incluye la habilidad para responder adecuadamente a los estímulos a través de la práctica, como resultado del condicionamiento clásico simple o del aprendizaje de hábitos y la habilidad para detectar o identificar objetos como resultado de su presentación reciente; lo que se conoce como efecto de facilitación (Milner, Squire & Kandel, 1998). Este tipo de memoria se caracteriza por ser filogenéticamente primitiva, inconsciente, general, abstracta, de acceso directo y rápido, automática, basada en las características perceptuales de los objetos, independiente del contexto, inflexible, temporalmente persistente y altamente conservada en los cuadros clínicos de amnesia (Rovee-Collier, Hayne & Colombo, 2001).

Por su parte, la memoria declarativa se refiere a la adquisición, el almacenamiento, la retención y el recobro consciente del saber sobre hechos, eventos y episodios, o en otras palabras al conocimiento sobre el mundo, personas, lugares o cosas y su significado (i.e., Saber qué) (Reber, 2008). Este tipo de memoria se caracteriza por ser filogenéticamente más reciente, consciente, altamente específica, concreta, de acceso indirecto y lento, controlada, basada en las características conceptuales de los eventos, dependiente del contexto, flexible, limitada en el tiempo y altamente afectada en los cuadros clínicos de amnesia (Rovee-Collier, et al., 2001).

La memoria declarativa a su vez se clasifica en memoria semántica y en memoria episódica. La memoria semántica se refiere al conocimiento organizado sobre hechos, conceptos, palabras y otros símbolos verbales; su significado, las relaciones entre ellos y las reglas y algoritmos para su manipulación (Tulving, 1972). Este tipo de memoria puede ser recobrada sin hacer referencia a las circunstancias particulares en las cuales fue adquirida, pues generalmente ello sucede en diferentes momentos y en múltiples contextos (Kellogg, 2003). Este tipo de memoria también es menos susceptible a la transformación y a la pérdida de información en comparación con la memoria episódica (Eichenbaum, 2011).



La memoria episódica se refiere a al conocimiento sobre eventos específicos experimentados por el individuo en un un contexto espacio-temporal delimitado (Squire, 2004). De acuerdo con Tulving (1993) dos características de este tipo de memoria son la sensación subjetiva del paso del tiempo y la conciencia auto-noética o autoconciencia; es decir el autoreconocerse como el agente que experimentó el evento.

Dada la definición de memoria episódica, Tulving (1993) y otros han argumentado que esta forma de memoria sería exclusivamente humana; sin embargo, los psicólogos comparativos quienes estudian las relaciones evolutivas entre los diferentes tipos de memoria en distintas especies, han sugerido que los animales no humanos pueden formar memorias de naturaleza episódica (Crystal, 2010; Morris, 2001); pero, como en el estudio la memoria episódica con humanos se acude al reporte verbal para asegurar que hay conciencia del evento y en los animales no humanos no hay marcadores lingüísticos de conciencia; con excepción de algunos simios entrenados (Schwartz, Colon, Sanchez, Rodriguez & Evans, 2002), la memoria de tipo episódica en especies diferentes a la humana suele ser subestimada (Martinez, Thompson & Sikorsi, 2007), razón por la cual se ha propuesto acudir a criterios de evaluación diferentes al reporte verbal en estas especies.

De acuerdo con Clayton, Bussey y Dickinson (2003) para evaluar la existencia de una memoria de naturaleza episódica en animales no humanos, uno de los criterios fundamentales es que el comportamiento del animal refleje que recuerda el evento, así como dónde y cuándo tuvo lugar. Por ejemplo, estudios con la chara californiana (*Aphelocoma californica*) han mostrado que estas aves son capaces de recordar el tipo de alimento almacenado (i.e., gusanos o nueces), el lugar de almacenamiento y el momento de almacenamiento, pues si los investigadores les permitían buscar 4 horas después de mostrarles la ubicación de los alimentos, los animales buscaban el alimento preferido pero perecedero (i.e., gusanos), pero si les permitían buscar a los 5 días, los animales cambiaban su elección y buscaban el alimento no preferido pero no perecedero, mostrando que exhibían algún tipo de registro temporal (Clayton & Dickinson, 1999). Con este criterio operacional se ha demostrado la existencia de una memoria de naturaleza episódica en otras especies de aves (Clayton, Yu & Dickinson, 2001), en primates no humanos (Morris, 2001) y en roedores (Babb, & Crystal, 2005; Bird, Roberts, Abroms, Kit

& Crupi, 2003; Olton, 1977); utilizando tareas de búsqueda alimenticia, reconocimiento de objetos y aprendizaje espacial (Eichenbaum & Fortin, 2005).

## **Aprendizaje y memoria espacial**

La ubicación en el espacio es está implicada en la mayoría de los repertorios conductuales, por ejemplo en la conducta de forrajeo, la conducta de escape, la identificación y establecimiento del territorio, entre otras (Capaldi, Robinson & Fahrbach, 1999). Para ubicarse exitosamente en el espacio los animales deben aprender información sobre los arreglos de objetos y las rutas específicas de los lugares a los que han estado expuestos (aprendizaje espacial) (Carrillo-Mora, Giordano & Santamaría, 2009); así como codificar, almacenar, retener y recobrar información sobre los mismos (memoria espacial).

El aprendizaje y la memoria espacial son considerados de naturaleza episódica en tanto implican información relacionada con la experiencia particular del individuo en un contexto espacio-temporal específico. Históricamente su estudio ha estado guiado por el interés de comprender qué características del ambiente proporcionan información posicional relevante para los animales, cómo los animales almacenan esa información y qué circuitos neuronales específicos participan en ese almacenamiento. Asimismo, se ha buscado comprender cómo las diferentes presiones de selección han dado lugar a la aparición convergente de estructuras particularmente implicadas en el procesamiento espacial (e.g. el hipocampo de los mamíferos, el “hipocampo” aviar, y los cuerpos pedunculados en los insectos) (Capaldi & Fahrbach, 1999; Jacobs, 2003).

La información sobre el aprendizaje y la memoria espacial ha sido obtenida utilizando un conjunto reducido de tareas entre las cuales se incluyen la respuesta de desplazamiento en ambientes familiares y no familiares, la recuperación de comida previamente escondida y la navegación en laberintos como el laberinto radial, el laberinto acuático de Morris y el laberinto de Barnes; con el uso de estas tareas se han descrito dos tipos de navegación y distintas estrategias usadas por los individuos para ubicar objetivos en el espacio (Capaldi & Fahrbach, 1999; Morris, 2001).

El primer tipo de navegación descrita se denomina egocéntrica y se refiere al uso de la información proporcionada por las claves corporales; en este tipo de navegación el individuo es el punto de referencia y en esta medida las posiciones de los objetos que lo rodean se definen con relación directa a su posición en el espacio. El segundo tipo de navegación descrita se conoce como navegación aloécéntrica y se refiere al uso de claves extra corporales. Cuando se usa este tipo de navegación el individuo memoriza la localización de un objetivo con base en su posición respecto a puntos de referencia distantes o cercanos; es decir, establece la localización de un objetivo particular con base en un sistema de coordenadas independiente de sí mismo (Redish, 1999).

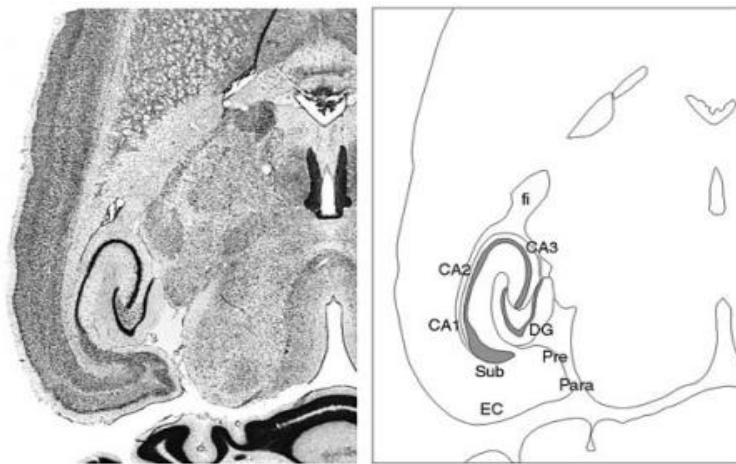
De la misma manera que se han reportado dos tipos de navegación, también se han descrito cinco estrategias de navegación usadas por los individuos para ubicar objetivos en el espacio. La primera estrategia se denomina navegación aleatoria y como su nombre lo indica se refiere a la búsqueda aleatoria de un objetivo, esta estrategia es usada principalmente cuando el individuo no conoce la localización del objetivo. La segunda estrategia se denomina navegación táctica y se caracteriza porque el individuo encuentra una pista del objetivo y se dirige siempre hacia a ella; este tipo de estrategia se suele presentar cuando las características del objetivo son visibles. La tercera estrategia de navegación se denomina navegación práxica y se refiere a la ejecución de un programa motor constante; esta estrategia sólo es útil para el individuo si siempre parte de la misma posición y orientación. La cuarta estrategia de navegación se denomina navegación de ruta y se caracteriza por que el individuo sigue una secuencia fija de sub-objetivos para alcanzar una meta. Finalmente, la quinta estrategia de navegación se denomina navegación de lugar y se caracteriza por que el individuo aprende a ubicar la localización del objetivo con base en un conjunto de claves espaciales, y exhibe una preferencia por la exploración del objetivo y las regiones cercanas al mismo (Barnes, 1979; Redish, 1999).

Aunque los individuos utilizan una combinación de las anteriores estrategias para ubicarse en el espacio (Burgess, 2006), algunos investigadores sugieren que sólo la navegación aloécéntrica y el uso de una estrategia de lugar serían evidencia del establecimiento de una memoria espacial (Chamizo, 1990).

## Hipocampo, aprendizaje y memoria espacial

El hipocampo (también llamado Cornu Ammonis, CA) es una estructura compacta, alargada y curvada localizada debajo de la neocorteza en la superficie medial basal de los lóbulos temporales. Esta estructura hace parte de un sistema cerebral funcional conocido como la formación hipocampal, el cual incluye al giro dentado, al subículo y a la corteza entorrinal (Figura1). El hipocampo se divide en tres áreas CA1, CA2 y CA3. La región CA1 es adyacente al subículo, la región CA2 es un pequeño límite entre CA1 y CA3; y la región CA3 es adyacente a la fimbria/fornix y al plexo coroideo (Taupin, 2007).

Los principales aferentes del hipocampo provienen de la corteza entorrinal; las neuronas de la corteza entorrinal proyectan sus axones a las neuronas del giro dentado, lo que se conoce como la vía perforante; asimismo, las neuronas del giro dentado proyectan sus axones (fibras musgosas) a las neuronas piramidales del área CA3; estas neuronas a su vez envían proyecciones (Colaterales de shaffer) al área CA1, la cual envía proyecciones al núcleo basolateral de la amígdala y al subículo; y a través de este a otras áreas como la corteza entorrinal, los núcleos septales, el núcleo acumbens y el hipotálamo (Amaral & Lavenex, 2007).



**Figura 1.** Formación hipocampal en el cerebro de una rata. Derecha. Tinción de Nissl. Izquierda: Figura representativa. **Abreviaturas:** EC: corteza entorrinal; Sub: subículo; DG: Giro dentado. Adaptado de “Hippocampal Neuroanatomy” por D. Amaral y P. Lavenex, 2007. In *The Hippocampus Book*. (p.53). Copyright 2007 por Oxford University Press, Inc.

Diversas investigaciones han sugerido que el hipocampo participa en el procesamiento de la información espacial. Por ejemplo en 1977, Olton reportó que las lesiones en la formación hipocampal, pero no en otras áreas cerebrales de ratas entrenadas en el laberinto radial, generaron déficits en la ejecución espacial de los animales; pues en comparación con los animales control, los animales con lesión tendían a realizar un número mayor de elecciones incorrectas. Estudios más recientes en los que se han utilizado lesiones más localizadas, han revelado una relación entre la extensión de la lesión y los déficits en el aprendizaje y la memoria espacial; por ejemplo, Broadbent, Squire y Clark (2004), reportaron que los animales con lesiones restringidas al hipocampo, y de extensión mayor al 30%, exhiben déficits de memoria espacial en el laberinto acuático de Morris, pues en comparación con los animales control, estos animales pasan significativamente menos tiempo en la zona de entrenamiento así como en el cuadrante meta. Del mismo modo se ha observado que los animales con lesiones hipocampales necesitan más tiempo y recorrer mayores distancias para aprender la localización de una caja de escape, en comparación con los animales sin lesión (Ferbinteanu, Ray & McDonald, 2003; Fox, Fan, LeVasseur & Fadden, 1998).

En línea con los resultados anteriores, los estudios electrofisiológicos realizados en ratas, han indicado que en el hipocampo existen células especializadas en responder a la localización espacial de los animales (Foster & Knierim, 2012). Estas llamadas células de lugar, corresponden a complejos de células piramidales de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, caracterizadas por presentar áreas de disparo espacialmente limitadas y estables, es decir que su tasa de disparo aumenta sólo cuando el animal se encuentra en un lugar particular del espacio y no en otro (Poucet, Lenck-Santini, Paz-Villagran & Save; 2003). En el hipocampo también se han identificado células denominadas células de dirección de la cabeza, cuya tasa de disparo alcanza el máximo valor cuando la cabeza del animal está orientada en una dirección particular; del mismo modo se han identificado células en el hipocampo que aumentan su tasa de disparo sólo cuando los animales observan determinada localización en el espacio, estas últimas se denominan células de visión espacial (Rolls & Stringer, 2005).

Los estudios con humanos también han indicado que existe una relación entre el hipocampo y el conocimiento espacial, pues al comparar imágenes de resonancia magnética (MRI) de personas que utilizan rutas complejas de navegación y personas que utilizan rutas fijas de navegación se observa que las primeras exhiben mayores volúmenes de materia gris hipocampal (Maguire, Woollett & Spiers, 2006). De la misma manera, se ha encontrado que la actividad del hipocampo aumenta cuando las personas ejecutan tareas espaciales como imaginar rutas óptimas para llegar a sitios específicos (Kumaran & Maguire, 2005) o que las personas con lesiones hipocampales exhiben déficits para ejecutar tareas espaciales como la tarea virtual del laberinto de Morris (Astur, Taylor, Mamelak, Philpott & Sutherland, 2002). La confluencia de evidencia experimental indica que el hipocampo es una estructura fundamental para el aprendizaje y la memoria espacial.

## **Fases de la memoria**

Clásicamente se ha descrito que la memoria implica tres fases; una fase de adquisición, en la cual el individuo aprende la relación entre diversos estímulos o aprende a responder de manera particular ante dichas relaciones; una fase de consolidación, en la cual la información adquirida se estabiliza y almacena, y una fase de recuperación en la cual la información almacenada se activa y se ejecutan los comportamientos previamente aprendidos (Good, 2002). Mas recientemente se ha descrito una cuarta fase denominada reconsolidación, en la cual la información previamente adquirida al ser reactivada es susceptible de sufrir modificaciones (Wang & Morris, 2010).

Dada la interdependencia entre las distintas fases de la memoria, para intervenirlas de manera relativamente aislada a nivel experimental se ha establecido como criterio la administración de los tratamientos en puntos específicos del tiempo, así, para intervenir sobre la adquisición, los tratamientos deberían ser administrados antes del entrenamiento; para intervenir sobre la consolidación los tratamientos deberían ser administrados poco después del entrenamiento y para intervenir sobre la recuperación los tratamientos deberían ser administrados poco antes de la prueba de recobro (Abel & Lattal, 2001). Asimismo, para intervenir sobre la reconsolidación los tratamientos deberían ser administrados después de la prueba.

## Consolidación de la memoria

La idea de un proceso de estabilización de la memoria fue planteada formalmente por Müller y Pilzecker en 1900 (Dudai, 2004). En sus estudios pioneros con humanos estos autores encontraron que el recobro correcto del material verbal previamente aprendido era afectado si durante los primeros minutos post-adquisición se presentaban estímulos no relacionados (i.e. interferencia retroactiva). A partir de sus estudios sugirieron que después de la adquisición existe un intervalo de tiempo limitado durante el cual las asociaciones se refuerzan y se vuelven estables; a este proceso de estabilización lo denominaron consolidación (McGaugh, 2000).

Poco después, otros autores sugirieron la existencia de un proceso de consolidación con base en información clínica (Nadela & Moscovitch, 1997; Scoville & Milner, 1957). Estudiando pacientes con lesiones en la formación hipocampal encontraron que la memoria para la información adquirida poco antes de la lesión se veía severamente afectada, mientras que la memoria para la información remota no se veía comprometida (i.e. amnesia retrógrada gradual). En estos estudios se observó que las lesiones más focalizadas en el hipocampo se relacionaban con una amnesia retrógrada gradual menos severa en comparación con las lesiones extendidas a la corteza cerebral, pues los pacientes con lesiones en el hipocampo perdieron la memoria para los eventos que tuvieron lugar hasta 1 año antes de la lesión, pero los pacientes con lesiones corticales perdieron la memoria para los eventos que tuvieron lugar incluso 15 años antes de la lesión (Frankland, & Bontempi, 2005). Estas observaciones llevaron a los investigadores a sugerir la existencia de un tiempo en el cual la memoria de un evento sería estabilizada lenta y progresivamente pasando de estar almacenada en el hipocampo para ser almacenada a nivel cortical (Marr, 1970).

Las observaciones de Müller y Pilzecker así como las observaciones clínicas llevaron respectivamente a utilizar el término consolidación para referirse a dos procesos relacionados, el primer proceso (el cual será abordado en adelante) se denomina consolidación sináptica (o sólo consolidación), y se refiere a los cambios asociados con el remodelamiento al nivel de la sinapsis, los cuales tienen lugar en los primeros minutos u

horas después de la adquisición (Frankland, & Bontempi, 2005); mientras que el segundo proceso (que no se abordará), es denominado consolidación de sistemas y se refiere a reorganización lenta y progresiva de las regiones cerebrales que soportan a la memoria; desde esta de perspectiva se plantean modelos para explicar por qué con el paso del tiempo la información remota es menos susceptible a la disrupción (Dudai, 2004; Marr, 1970).

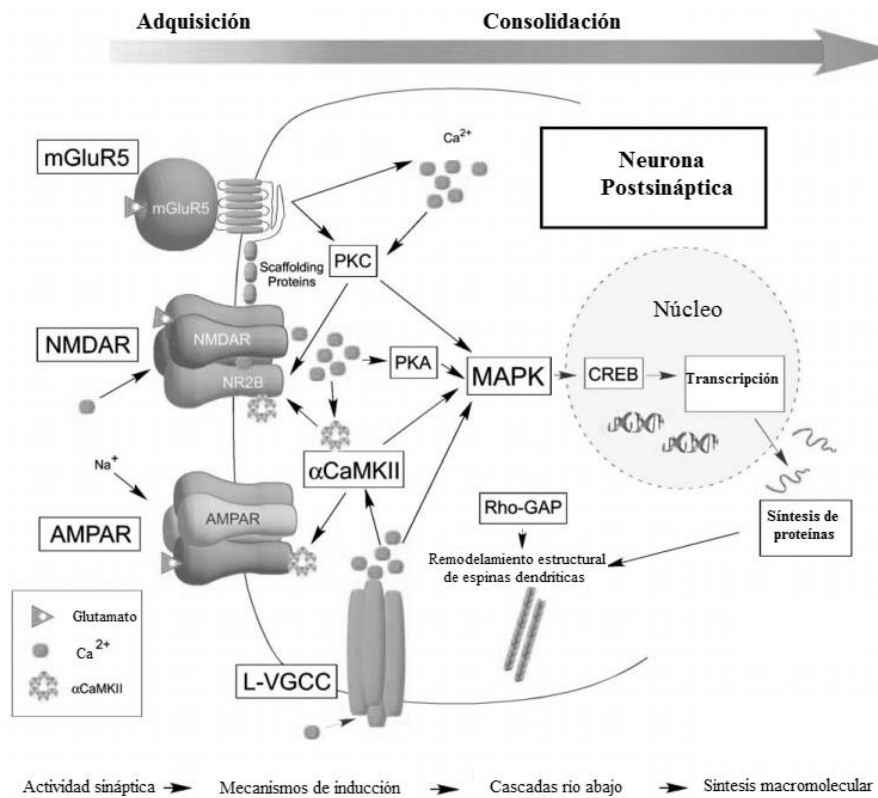
## **Mecanismos moleculares involucrados en la consolidación de la memoria**

Estudios recientes indican que durante las primeras horas después de la adquisición se desencadenan una serie de eventos moleculares que derivan en cambios duraderos en la efectividad de la transmisión sináptica; por ejemplo, cambios en la liberación de neurotransmisores, el anclaje de nuevos receptores de membrana, la formación de espinas dendríticas nuevas y la reorganización de espinas dendríticas preexistentes, los cuales son necesarios para la consolidación de la memoria (Lamprecht & LeDoux, 2004).

Aunque se desconocen todos los mecanismos que subyacen a dicho proceso de consolidación, utilizando herramientas farmacológicas, genéticas y de lesión, se ha identificado una vía de señalización esencial conservada filogenéticamente entre vertebrados e invertebrados (Gal-Ben-Ari, et al., 2012) (Figura2). Esta vía de señalización inicia con la liberación presináptica de glutamato, un neurotransmisor excitatorio que activa a los receptores postsinápticos tipo AMPA. Una vez se activan los receptores tipo AMPA, se incrementa el sodio intracelular, modificando el voltaje de la membrana celular y favoreciendo la separación del ion de magnesio que bloquea a los receptores tipo NMDA; si la liberación presináptica de glutamato se mantiene, dichos receptores tipo NMDA pueden ser activados (Johansen, Cain, Ostroff, & LeDoux, 2011; Shimizu, Tang & Rampon, 2000); y una vez se activan, se incrementa la concentración de calcio intracelular y se favorece la fosforilación de las proteínas quinasas (i.e proteínas que fosforilan a otras proteínas) como la proteína calcio/calmodulina (CaMK II), la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) o la proteína quinasa regulada por la señal extracelular (ERK 1/2) (Izquierdo, et al., 2006; Sweatt, 2004).



La activación de las proteínas quinasas a su vez promueve la activación de la proteína de unión al elemento de respuesta a adenosín monofosfato cíclico AMPc (CREB), y el consecuente reclutamiento de la proteína de unión a CREB (CBP) (Fleischmann, et al., 2003; Ma, Wang, Wu, Wei, & Lee; 1998). Este factor de transcripción a su vez recluta a otros factores de transcripción, favoreciendo la expresión de genes como *c-jun*, *c-fos*, *Zif268* y *Bdnf*, y la síntesis de las proteínas asociadas a estos genes (Hu, Chrivia, & Ghosh, 1999). Recientemente se ha demostrado que la expresión génica y la nueva síntesis de dichas proteínas son eventos necesarios para la consolidación de la memoria, pues inhibir la transcripción génica o la síntesis de proteínas inmediatamente después del aprendizaje perjudica el desempeño de los animales en tareas de condicionamiento clásico y de memoria espacial (Igaz, Vianna, Medina, & Izquierdo, 2002; Roozendaal, 2002).



**Figura 2.** Mecanismos moleculares implicados en la consolidación de la memoria. Adaptado de “Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala” por S. M. Rodrigues, G.E. Schafe y J .E. LeDoux, 2004 Neuron, 44, p.11. Copyright 2004 por Cell Press.

## Regulación epigenética de la memoria

El término epigenética fue formulado por Conrad Waddington (1905–1975), en un intento teórico de solucionar una pregunta de la biología del desarrollo; -en términos modernos- por qué las células del cuerpo al diferenciarse producen proteínas diferentes si tienen el mismo genoma, es decir la misma secuencia de ADN. Waddington supuso que debía existir un mecanismo – que según creía se encontraba por encima de los genes – encargado de controlar la lectura del ADN; ese mecanismo que denominó epigenético (epi significa por encima de) definiría el tipo de célula en el que se convertiría una célula madre; y sería heredable a través de la división celular manteniendo la identidad de esas células diferenciadas (Gilbert, 1991; Jablonka & Lamb, 2005; Sweatt, Nestler, Meaney, & Akbarian, 2013).

Años después de la propuesta de Waddington, se probó la existencia de varios mecanismos reguladores de la transcripción, y se observó que su participación no sólo se restringía al establecimiento y mantenimiento de la identidad celular, sino que se extendía a la regulación aguda de la expresión génica en respuesta a diversos factores ambientales. Asimismo, se observó que no todos los mecanismos reguladores eran heredables y que se presentaban incluso en células que no sufren procesos de división celular (i.e. las neuronas maduras); por estas razones el término epigenética en la actualidad se redefinió como el conjunto de procesos -heredables o no- que afectan el estado de la cromatina sin alterar la secuencia de nucleótidos del ADN; y dado su papel regulador de la transcripción, se han sugerido como posibles mecanismos involucrados en la formación y el mantenimiento de la memoria (Adwan & Zawia, 2013; Berger, Kouzarides, Shiekhattar & Shilatifard, 2009; Lopez-Atalaya & Barco, 2014).

Los principales mecanismos epigenéticos descritos son los microARNs (miARNs), la metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales en las histonas. Los microARNs son ARNs pequeños (i.e. 22 nucleótidos) de cadena simple que pueden controlar la expresión génica al degradar el ARN mensajero o al unirse a él impidiendo la traducción (Blaze & Roth, 2013). Aunque los estudios sobre su papel modulador en la memoria son escasos, Rajasethupathy et al., (2009) han sugerido que podrían actuar como

reguladores negativos de la expresión de CREB. En su estudio pionero los autores caracterizaron la expresión de ARNs pequeños del molusco de mar *Aplysia californica*, encontrando enriquecimiento de miARNs como miR-124 en el cerebro del animal. Al evaluar el efecto de la serotonina, un neurotransmisor liberado tras el aprendizaje por sensibilización, que induce aumentos en la expresión de CREB, encontraron que miR-124 se regulaba a la baja, y al aumentar artificialmente los niveles de miR-124 observaron que se revertía el aumento en CREB inducido por la serotonina; dado que el aumento de CREB es fundamental en la cascada de señalización activada tras el aprendizaje de distintas tareas en diferentes especies, este estudio dejó abierta la posibilidad de que los miARNs actúen como reguladores negativos generales de los procesos involucrados en la consolidación de la memoria; sin embargo, la investigación sobre este mecanismo epigenético en otros animales aún es incipiente y su papel en los procesos de memoria debe ser comprobado.

El segundo mecanismo epigenético descrito es la metilación del ADN, la cual consiste en la adición covalente de un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) a las regiones CpG (i.e. un nucleótido de citosina unido por un fosfato a un nucleótido de Guanina) en los promotores de los genes. Esta reacción es catalizada por un tipo de enzimas conocidas como ADN metil-transferasas (DNMT) y tiende a ser asociada a la supresión de la transcripción génica. (Blaze & Roth, 2013; Lipsky, 2013). Como sucede con los miARNs, los estudios sobre el papel de la metilación del ADN en los procesos de memoria son escasos, sin embargo han sugerido que la metilación del ADN actuaría como regulador negativo de la expresión de genes asociados con déficits de memoria (e.g. gen para la proteína fosfatasa 1) (Miller & Sweatt, 2007), y que la formación de la memoria podría involucrar hipometilación en genes como *Bdnf*, favoreciendo su expresión (Lubin, Roth, & Sweatt, 2008; Muñoz, Aspé, Contreras & Palacios, 2010).

Finalmente, el tercer mecanismo epigenético descrito son las modificaciones postraduccionales en las histonas; estas modificaciones se han asociado tanto con represión como con facilitación de la actividad transcripcional y han sido el mecanismo epigenético más estudiado en la última década por su participación en los procesos de memoria.

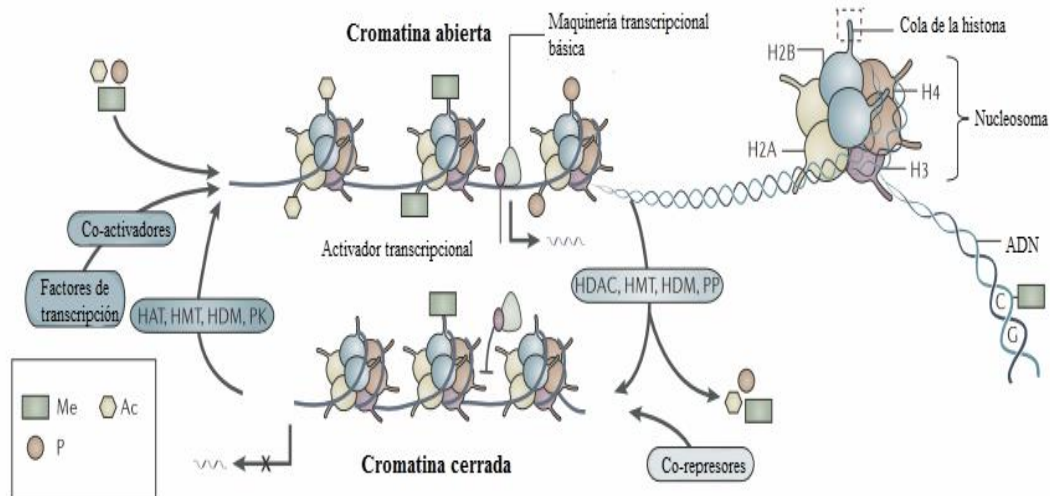
## Modificaciones postraduccionales en las histonas

Las histonas son proteínas básicas altamente conservadas en eucariotas; se ubican en el núcleo de las células y su función principal es la organización o empaquetamiento del ADN. Según su contenido de lisina (K) y arginina (A) se han descrito cinco tipos de histonas, las histonas 4 (H4) y 3 (H3) ricas en arginina, las histonas 2A (H2A) y 2B (H2B) moderadamente ricas en lisina y la histona 1 (H1) muy rica en lisina. Las histonas 4, 3, 2A y 2B se agrupan en octámeros (con dos copias de cada una), conformando la estructura básica de la cromatina conocida como nucleosoma (alrededor del cual se enrollan aproximadamente 150 pares de bases); mientras que la histona 1 se encuentra fuera del nucleosoma y se cree que su función principal es unir distintos nucleosomas conformando estructuras de orden superior (Landry, Kandel & Rajasethupathy, 2013; Sweeat, et al., 2013; Trollope et al., 2012).

El estado de condensamiento del ADN alrededor de los nucleosomas es un determinante crítico de la actividad transcripcional; si el ADN está altamente condensado (heterocromatina) los factores de transcripción y la ARN polimerasa no pueden acceder a las regiones promotoras de los genes, por lo cual la transcripción se mantiene inactiva; sin embargo, si el ADN se desenrolla (eucromatina), se habilita el acceso de los factores de transcripción y la ARNpolimerasa a las regiones promotoras de los genes promoviendo la transcripción. Ese estado de condensamiento del ADN puede ser alterado por distintas modificaciones postraduccionales que tienen lugar en las colas N- terminales de las histonas nucleosomales; entre dichas modificaciones se han descrito la metilación, la fosforilación y la acetilación, esta última principalmente estudiada en los procesos de plasticidad sináptica y en la memoria dependiente del hipocampo (Figura 3) (Guan et al., 2002; Jenuwein & Allis, 2001; Suganuma & Workman, 2011).

La metilación de las histonas se refiere a la adición de grupos metilo (-CH<sub>3</sub>) en los residuos de lisina y arginina. Esta reacción es catalizada por las enzimas histonas metiltransferasas (HMT) y revertida por las enzimas histonas demetilinasas (HDM) y se puede presentar en tres variaciones, monometilación, dimetilación o trimetilación. Dependiendo de la región específica de metilación así como de la cantidad, la metilación

de las histonas puede promover o reprimir la transcripción. Así, por ejemplo, la trimetilación de la histona 3 en la lisina 14 (H3K4me3) se ha asociado con un estado activo de la transcripción, mientras que la trimetilación de histona 3 en la lisina 27 (H3K27me3) y la dimetilación de la histona 3 en la lisina 9 (H3K9me2) se han asociado con un estado inactivo de la transcripción (Mifsud et al., 2011).



**Figura 3.** Modificaciones postraduccionales en las proteínas histonas. Adaptado de “Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin” por J. Gräff y L-H. Tsai, 2013 Nature reviews neuroscience, 14, p.98. Copyright 2013 por Macmillan Publishers Limited.

La fosforilación de las histonas se refiere a la adición de grupos fosfatos en residuos de serina, treonina y tirosina, lo cual es regulado por las proteínas quinasas. Aunque su participación en los procesos de memoria ha sido poco estudiada, se ha observado que la fosforilación de la histona 3 en la serina 10 (H3S10p) promueve la acetilación de la histona 3 en la lisina 14 (H3K14ac) –al menos en el giro dentado-, y se ha relacionado con un estado activo de la transcripción. (Crosio, Heitz, Allis, Borrelli & Sassone-Corsi, 2003; Chandramohan, Droste & Reul, 2007; Lo, et al., 2000; Steunou, Rossetto & Côté, 2014).

Finalmente, la acetilación de las histonas consiste en la adición de un grupo acetilo (-CO-CH<sub>3</sub>) en los residuos de lisina; al acetilarse, las histonas pierden su afinidad electrostática con el ADN promoviendo la apertura de la cromatina y la activación de la

actividad transcripcional; lo cual es regulado por las enzimas histonas acetil transferasas (HAT), como CBP, P300, y el factor asociado a P300/CBP (PCAF). Asimismo, la acetilación de las histonas es revertida por las desacetilasas de histonas (HDAC) entre las cuales HDAC1, HDAC2 y HDAC3 son las más estudiadas y están presentes en numerosos complejos de represión disminuyendo la actividad transcripcional (Gräff & Tsai, 2013; Sweatt, 2009). El balance controlado entre la actividad de las HATs y la actividad de las HDACs es esencial para la proliferación celular normal y para la correcta transcripción génica, pues en los casos donde se presenta un desequilibrio entre la acetilación y la desacetilación de las histonas se observa una transcripción génica desregulada y consecuentemente un funcionamiento alterado de las actividades celulares (Alarcón, et. Al., 2004; Shahbazian & Grunstein, 2007; Lithner, et al., 2013).

## **Acetilación de las histonas y consolidación de la memoria**

La importancia de la acetilación de las histonas en los procesos de consolidación de la memoria se planteó por primera vez en el estudio de Levenson et al., (2004). En este estudio los autores entrenaron grupos de ratas en el paradigma de temor condicionado al contexto o en el paradigma de inhibición latente -una tarea que no implica asociación entre estímulos- y evaluaron el nivel de acetilación de la histona 3 en la lisina 14 (H3K14ac) y de la histona 4 en las lisinas 5, 8, 12 y 16 (H4ac) en el área CA1 del hipocampo. Los resultados mostraron que 1 h después del entrenamiento en la tarea de temor contextual aumentó H3K14ac y no hubo cambios en H4ac; asimismo mostraron que la tarea de inhibición latente aumentó los niveles de H4ac, pero no alteró los niveles de H3K14ac; sugiriendo por primera vez que H3K14ac podría ser un marcador epigenético específicamente vinculado a la memoria asociativa.

Cambios en la acetilación de H3K14 durante la consolidación de la memoria también se han reportado en otro tipo de tareas asociativas (Bridi & Abel, 2013). Por ejemplo, utilizando la tarea de reconocimiento de objetos, se ha encontrado que la acetilación de la histona 3 en el hipocampo aumenta 1h después del entrenamiento (Fontán-Lozano, et al., 2008); y que los aumentos específicos de H3K14ac se mantienen hasta 24 h después de la adquisición, lo cual se relaciona con el aumento en la expresión

de genes de inducción temprana (IEGs) como *Zif268* (Gräff, Woldemichael, Berchtold, Dewarrat & Mansuy, 2012).

Así mismo, utilizando la tarea del laberinto acuático de Morris se han observado aumentos en H3K14ac relacionados con la memoria espacial. Por ejemplo, en un estudio reciente Dagnas y Mons (2013), realizaron un entrenamiento masivo (i.e. una única sesión de 12 ensayos) a un grupo de ratones jóvenes (4 meses de edad) en la tarea espacial del laberinto acuático de Morris o en una versión no espacial (por clave) donde la plataforma de escape es visible; 1h después del entrenamiento evaluaron los niveles de acetilación de H3K14 en el área CA1 del hipocampo, encontrando aumentos sólo en el tejido de los animales entrenados en la tarea espacial. Al someter a los animales a un entrenamiento espaciado (i.e., 4 ensayos diarios por 3 días) también se reportaron aumentos en H3K14ac asociados con la exposición a la tarea y aumentos en la acetilación de H2B en el hipocampo (Bousiges et al., 2010).

La implicación de la acetilación de las histonas en la consolidación de la memoria también se ha observado al afectar la actividad de las HATs en el cerebro. Por ejemplo, se ha observado que bloquear la actividad de P300/CBP con un inhibidor (e.g. C646) perjudica la memoria de reconocimiento de objetos, el aumento en H3K14ac (Gräff, et al., 2012) y la expresión *in vivo* de genes como *C-fos* (Barrett et al., 2011). Asimismo, usando ratones transgénicos inducibles para CBP se observó que a pesar de exhibir un comportamiento exploratorio normal, así como conductas de ansiedad normal y aprendizaje normal en las tareas de condicionamiento de temor contextual, reconocimiento de objetos y laberinto acuático de Morris, los animales transgénicos para CBP muestran déficits en la memoria a largo plazo; pues en comparación con los animales no transgénicos, exhiben menores niveles de congelamiento durante la prueba de temor contextual, así como menor exploración del objeto novedoso en la prueba de reconocimiento de objetos (Alarcón, et al., 2004) y mayores latencias de escape durante la prueba en el laberinto acuático de Morris; lo cual es revertido al evitar la expresión del transgen (Korzus, Rosenfeld, & Mayford, 2004) o con el uso de inhibidores de las enzimas HDACs (HDACs-in) (Haettig, et al., 2011; Vecsey, et al., 2007;).

Usando inhibidores de las enzimas HDACs inmediatamente después de la adquisición también se ha sugerido que la acetilación de las histonas es importante para la consolidación de la memoria. Por ejemplo, se ha observado que la edad está relacionada con déficits de memoria a largo plazo, si se entrena a un grupo de ratones jóvenes (3 meses de edad) y a un grupo ratones viejos (16 meses de edad) en la tarea de condicionamiento de temor contextual o en el laberinto acuático de Morris, se observa que a pesar de aprender las tareas de manera similar, los ratones viejos presentan déficits de memoria en comparación con los ratones jóvenes, es decir presentan menores niveles de congelamiento durante la prueba de recobro en la tarea de temor contextual y menos tiempo en el cuadrante meta durante la prueba en el laberinto acuático de Morris; sin embargo, si se les administra un inhibidor de las enzimas HDACs (i.e ácido hidroxámico suberoilánilida, SAHA) los déficits son revertidos, exhibiendo una mejora en los procesos de consolidación (Peleg, et al., 2010).

De manera similar, al utilizar un entrenamiento leve en la tarea de condicionamiento de temor contextual (e.g proporcionado un choque eléctrico en vez de tres) en animales jóvenes, se ha observado que facilitar la acetilación de las histonas con butirato de sodio (NaB) o con tricostatina (TSA) promueve una mejora en la consolidación de la memoria a largo plazo, pues en comparación con los animales inyectados con un vehículo, los animales inyectados con cualquiera de los dos inhibidores muestran un mayor porcentaje de congelamiento durante la prueba de recobro realizada a las 24h después del entrenamiento (Levenson, et al., 2004); los mismos efectos facilitadores se han observado al inyectar TSA inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de reconocimiento de objetos (Roozendaal, et al., 2010) y en laberinto acuático de Morris (Dash, Orsi, y Moore, 2009).

En conjunto, los estudios donde se evalúa la acetilación de las histonas después de la adquisición de algunas tareas, así como los estudios donde se manipula la actividad de las HATs y las HDACs sugieren que la acetilación de las histonas, principalmente H3K14, es un mecanismo implicado en la consolidación de la memoria; sin embargo, para corroborar que es un mecanismo general involucrado en la memoria espacial es necesario extender su estudio a otras tareas (e.g. el laberinto de Barnes).



## Estrés

En términos generales el estrés se define como cualquier cambio en la homeostasis (Levine, 2005; Pacák & Palkovits, 2001) desencadenado por estímulos percibidos por el individuo como potencialmente amenazantes (Kim & Diamond, 2002). Estos estímulos, denominados estresores pueden ser de dos tipos; biológicos, si alteran directamente el equilibrio fisiológico del organismo (e.g. un choque eléctrico o la exposición a bajas temperaturas); o psicológicos si no alteran el equilibrio fisiológico del organismo inmediatamente, pero representan una fuente de peligro potencial (e.g. la exposición al olor de un depredador) (de Kloet, Joëls & Holsboer, 2005).

De acuerdo con Koolhaas, de Boer y Buwalda (2005) la magnitud de la respuesta de estrés depende de la capacidad del organismo para predecir y controlar al estresor, así como de la magnitud y la duración del mismo. Teniendo en cuenta estos parámetros es posible identificar dos tipos de estrés. El primer tipo de estrés es denominado estrés agudo y hace referencia al estado del organismo tras la pérdida repentina de la predicción o el control de los factores relevantes del medio; en este tipo de estrés el estresor suele ser presentado una sola vez y por un periodo de tiempo corto (i.e., inferior a las 4 horas); y la respuesta desencadenada retorna a su nivel basal poco después de retirado el estresor (Steckler, 2005). El segundo tipo de estrés es denominado estrés crónico y se refiere al estado del organismo tras una pérdida sostenida por un largo periodo de tiempo en la predicción o el control de dichos factores relevantes. En este tipo de estrés el estresor es presentado repetidamente y por un periodo de tiempo largo (e.g. 1 semana o más); y la respuesta desencadenada se mantiene incluso después de retirado el estresor (de Kloet, 2013).

De acuerdo con Pacák y Palkovits (2001) las respuestas provocadas por un estresor agudo incluyen procesos fisiológicos y conductuales esenciales para restablecer la homeostasis, en otras palabras implican respuestas adaptativas para el organismo. Sin embargo, si dichas respuestas para afrontar el estrés se sostienen por un largo periodo de tiempo, como ocurre en el estrés crónico, se observa un deterioro de los procesos fisiológicos del organismo; por ejemplo, atrofia en las neuronas del área CA1 del

hipocampo (Kim & Diamond, 2002; Tasker, Di & Malcher-Lopes, 2006), reducción de la proliferación celular (Conrad, 2010), disminución en la expresión de receptores hipocampales de glucocorticoides (Mizoguchi, Ishige, Aburada & Tabira, 2003) y disminución en los procesos de plasticidad sináptica (Pinto-Ribeiro, Almeida, Pêgo, Cerqueira, & Sousa, 2004; Rosenkranz, Venheim & Padival, 2010).

## **Inducción experimental de estrés**

Para evaluar la naturaleza de la respuesta de estrés y los mecanismos por los cuales el estrés ejerce sus acciones se han propuesto una serie de modelos experimentales en roedores entre los que se encuentran: el estrés por derrota social, el estrés por exposición a los depredadores o al olor de los depredadores, el estrés por inducción de dolor, el estrés por exposición a la novedad, el estrés por nado forzado y el estrés por restricción de movimientos.

El estrés por derrota social se refiere a la inducción de estrés por la pérdida de control social. En este modelo el animal experimental es introducido en el territorio de animales congéneres desconocidos; los cuales tienden a atacarlo. La derrota social por un macho congénere induce incrementos en la tasa cardiaca, en la presión sanguínea y en la temperatura corporal, así como reacciones conductuales de lucha o inmovilidad. (Koolhaas, et al., 2005)

El estrés por exposición a los depredadores o por exposición al olor de los depredadores es un modelo de gran relevancia etológica en tanto permite evaluar las reacciones típicas de la especie ante un depredador natural (Figueiredo, Bodie, Tauchi, Dolgas & Herman, 2003). Cuando se trabaja con ratas como sujetos experimentales, los animales son introducidos dentro de una caja plástica y generalmente expuestos a la presencia de un gato o su olor. Este modelo promueve respuestas de evitación y temor en los animales, así como aumentos significativos en la presión sanguínea (Dielenberg, Carrive & McGregor, 2001; Takahashi, Nakashima, Hong & Watanabe 2005).

El estrés por inducción de dolor implica la administración de estresores dolorosos como choques eléctricos en las patas del animal. Este procedimiento ha mostrado ser

eficaz para inducir comportamientos de miedo tales como el congelamiento; también ha mostrado promover comportamientos como hiperactividad locomotora en ambientes conocidos y la reducción del consumo de sustancias preferidas (Cao, Hudson & Moynihan; 2007).

El estrés por exposición a la novedad como su nombre lo indica se refiere a la exposición del organismo a situaciones desconocidas. Este estresor induce aumentos moderados en los niveles de corticosterona (i.e. alrededor 140 ng/ml en comparación con el nivel basal de 50ng/ml) (Piazza, et al., 1991) y promueve reacciones altamente variables en los organismos (Koolhaas, et al., 2005).

El estrés por nado forzado consiste en colocar al animal en un contenedor con agua durante 20 o 30 minutos generalmente. De acuerdo con Linthorst (2005) este tipo de estrés tiene un componente psicológico claro en tanto el animal debe enfrentar una situación inescapable, así como un componente físico importante, en tanto el animal aumenta significativamente su conducta locomotora, tratando de escapar; y con ello aumenta drásticamente su temperatura corporal.

Finalmente, el estrés por restricción de movimientos se refiere a la restricción de la actividad músculo-esquelética del animal experimental; para inducirlo el animal es ubicado en un tubo de plexiglás (durante 1h generalmente) donde puede mover sus extremidades pero no puede rotar sobre su eje dorso-ventral (Anisman, Hayley, Kelly, Borowski & Merali; 2001). Aunque la restricción de movimientos implica un componente psicológico similar al nado forzado, resulta menos estresante para el animal; pues al comparar entre una exposición a estrés por nado forzado y una exposición a estrés por restricción de movimientos, se observa que el nado forzado induce el doble de elevación en los niveles de corticosterona (i.e. 800ng/ml en vez de 400ng/ml. El nivel basal fue 35ng/ml) (Kirby, Chou-Green, Davis & Lucki, 1997).

## **Respuesta fisiológica de estrés**

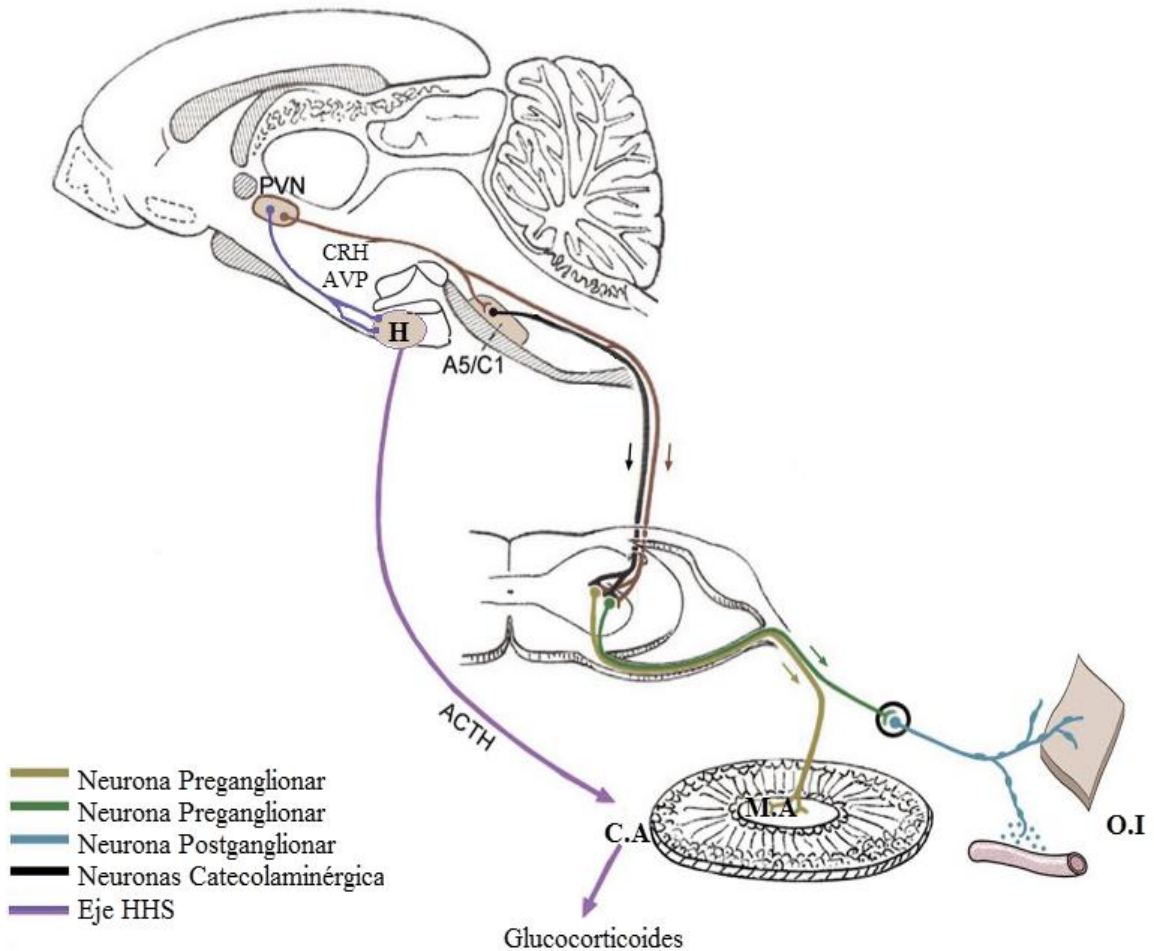
Cuando un organismo se expone a un estresor, la información que adquiere del mismo través de sus órganos sensoriales se transmite al núcleo paraventricular hipotálamo

(PVN) (Joëls, Pu, Wiegert, Oitzl & Krugers, 2006); si el estresor es biológico, la información llega al hipotálamo a través de aferentes directos desde el tallo cerebral; pero si el estresor es psicológico, la información se transmite al hipotálamo indirectamente a través de estructuras como la amígdala, la corteza y el hipocampo, lo que sugiere que esta categoría de estresores implica un procesamiento de orden superior en el sentido que requiere la integración de información multimodal (Steckler, 2005; Herman & Cullinan, 1997; Herman et al., 2003). Una vez se activan las neuronas parvocelulares del PVN se promueve la activación de dos sistemas de respuesta al estrés, el sistema simpático adrenomedular (SAM) y el eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal (HHS) (Pacák & Palkovits, 2001) (Figura 4).

El sistema SAM es el primer sistema en activarse. Al percibir el estresor las neuronas parvocelulares del PVN activan a las neuronas preganglionares de la rama simpática del sistema nervioso autónomo, directamente o a través de neuronas catecolaminérgicas de la parte inferior del tallo cerebral. Al activarse, esas neuronas preganglionares proyectan sus axones a dos lugares; uno, a las neuronas postganglionares de la misma rama simpática promoviendo la liberación de noradrenalina en los órganos internos; dos, a la medula adrenal promoviendo la liberación de adrenalina y una liberación adicional de noradrenalina (Habib, Gold & Chrousos, 2001; Kvetnansky, Sabban & Palkovits, 2009). Estas catecolaminas se unen a receptores de membrana específicos vinculados a proteínas G y promueven efectos rápidos y transitorios en la excitabilidad celular, los cuales derivan en un incremento en el flujo sanguíneo desde el corazón hacia los músculos, aumento en la tasa respiratoria e inhibición de la actividad digestiva, preparando al organismo para reacciones de lucha o huida (Carlson, 2006).

Poco después se activa el segundo sistema de respuesta al estrés; el eje HHS cuya función principal es prolongar la disponibilidad de los recursos metabólicos movilizados por la activación previa del sistema SAM (Joëls, et al., 2006). La actividad del eje HHS se inicia con la activación de las neuronas parvocelulares del PVN; estas neuronas secretan dos neuropéptidos, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina vasopresina (AVP), los cuales son liberados en el sistema portal y a través de este dirigidos a la hipófisis anterior (de Kloet, et al., 2005); donde estimulan la producción de la

hormona corticotropina (ACTH); que al ser liberada al torrente sanguíneo estimula la producción de glucocorticoides en la corteza adrenal (principalmente cortisol en humanos y corticosterona en ratas y ratones) (Groeneweg, Karst, de Kloet & Joëls, 2011; de Kloet, et al, 2005).



**Figura 4.** Sistemas de respuesta al estrés. **Abreviaturas:** PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo, CRH: hormona liberadora de corticotropina, AVP: arginina vasopresina, H: hipófisis; A5C1: neuronas catecolaminérgicas de la parte inferior del tallo cerebral, ACTH: corticotropina, M.A: medula adrenal, C.A: corteza adrenal, O.I: órganos internos. Adaptado de “Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches” por R. Kvetnansky, E. L. Sabban y M. Palkovits, 2009, *Physiological Reviews*, 89, p.556. Copyright 2009 por the American Physiological Society.

En situaciones no estresantes CRH y AVP también son liberadas en el sistema portal, siguiendo un patrón circadiano regulado por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ); donde los pulsos de mayor amplitud se presentan durante la fase activa del animal. Así, en el caso de los animales diurnos como los humanos la amplitud de los pulsos de CRH y AVP incrementa en la mañana (promoviendo un incremento consecuente en los niveles de ACTH y cortisol); y disminuye espontáneamente en la noche (Habib, et al., 2001); mientras que en animales nocturnos como las ratas la amplitud de los pulsos de CRH y AVP aumenta durante la noche (promoviendo un incremento consecuente en los niveles de ACTH y corticosterona) y disminuye espontáneamente durante la mañana (Antle & Mistlberger, 2005). De acuerdo con Young, Abelson y Lightman (2004), adicionalmente se ha observado que CRH y AVP, así como los glucocorticoides son liberados de manera pulsátil en patrones ultradianos de una hora, donde los pulsos de mayor amplitud se presentan poco antes del inicio de la fase activa. Esta liberación ultradiana y circadiana de las hormonas del eje HHS es críticamente influenciada por factores ambientales como las condiciones luz en las que se mantiene el animal, pues estas pueden inducir un cambio de fase y con ello una modificación en la activación del NSQ (Dibner, Schibler & Albrecht, 2010).

Una vez producidos bien sea en pulsos horarios, circadianos o a un nivel mayor durante las situaciones de estrés, los glucocorticoides son liberados al torrente sanguíneo y distribuidos a nivel central y periférico, donde promueven acciones de ajuste como potenciación de la vaso constricción mediada por el sistema nervioso simpático, incremento de la síntesis hepática de glucógeno, movilización de los recursos necesarios para la síntesis de glucosa, activación de la lipólisis, proteólisis, supresión de la inmunidad innata (Makino, Hashimoto & Gold, 2002; Herman et al., 2003) y acciones regulatorias sobre el eje HHS a través de un mecanismo de retroalimentación negativa; cuya función es evitar la activación excesiva del eje y el consecuente deterioro de los procesos fisiológicos del animal (Fulford & Harbuz, 2005).

Dado su carácter lipídico los glucocorticoides atraviesan fácilmente la membrana plasmática de sus células objetivo y ejercen sus efectos a partir de la unión a dos tipos de receptores, el receptor de mineralocorticoides (MR) o tipo I, y el receptor de

glucocorticoides (GR) o tipo II (De Rijk, Kitraki & De Kloet, 2010). Estos receptores actúan como factores de transcripción. En su estado libre de ligando MR y GR se encuentran en el citoplasma de la célula objetivo como parte de complejos de proteínas; cuando el ligando se une al receptor, el complejo de proteínas se disocia, el receptor se dimeriza y posteriormente se traslada al núcleo de la célula, donde interactúa con el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE), una porción de ADN ubicada en el promotor de un gen diana. Al unirse al GRE los receptores MR y GR facilitan o inhiben la transcripción; y como resultado final se altera la abundancia o función de las proteínas de membrana como los canales iónicos o los receptores para neurotransmisores (De Kloet, et al, 2005).

Aunque MR y GR presentan una estructura similar y ambos afectan la transcripción génica, estos receptores se unen a distintos tipos de genes, razón por la cual se ha sugerido que podrían ejercer diferentes acciones celulares (Groeneweg, et al, 2011); asimismo aunque se ha descrito co-localización de estos receptores en el hipocampo y el giro dentado (Han, Ozawa, Matsuda, Nishi & Kawata, 2004), se ha observado que MR y GR se diferencian en sus patrones generales de distribución cerebral, encontrándose expresión de MR en áreas límbicas con niveles moderados en la corteza y en la amígdala; y expresión de GR abundantemente en todo el cerebro. Finalmente MR y GR difieren en su afinidad por el ligando; así, MR exhibe una afinidad alta por los glucocorticoides, suficiente para activarse incluso durante los intervalos entre pulsos ultradianos de corticosterona; mientras que GR exhibe una afinidad baja por los glucocorticoides (i.e. 10 veces menor a MR), por lo cual sólo se activan en los picos de liberación circadianos de corticosterona y durante las situaciones de estrés. En este sentido se ha observado que MR media la actividad basal del eje HHS, determinando su umbral o sensibilidad al estrés, mientras que GR modula el procesamiento de la información estresante y facilita la adaptación al promover la finalización de la respuesta de estrés (De Rijk, et al., 2010).

## **Efectos del estrés en la memoria a largo plazo**

Las investigaciones con humanos y modelos animales han evidenciado que el estrés agudo y los glucocorticoides pueden ejercer efectos facilitadores o perjudiciales en

la memoria a largo plazo (Mclay, Freeman & Zadina, 1998; Kim & Diamond, 2002; Summers, Crowe, & Kim, 2003; Sandi & Pinelo-Nava, 2007), en función de factores como el tiempo y el contexto de administración, la intensidad o la dosis administrada y la fase de la memoria evaluada. Con relación al tiempo y al contexto de administración, se ha observado que el estrés facilita la memoria si el aumento en los niveles de glucocorticoides se presenta cerca del momento y en el contexto del aprendizaje de la tarea, mientras que tiene el efecto contrario si se administra mucho antes de la adquisición o ante elementos que no estuvieron presentes durante la misma (De Kloet, Oitzl & Joëls, 1999).

Con relación a la intensidad del estrés o a la dosis de glucocorticoides suministrada, se sugiere que los efectos sobre la memoria siguen un patrón de U invertida, donde en intensidades o dosis moderadas el estrés y los glucocorticoides facilitan la memoria, mientras que en intensidades muy bajas o altas la perjudican (Roosendaal, 2000; Roosendaal, 2002). Por ejemplo, se sabe que las elevaciones en los glucocorticoides promovidas por la exposición al laberinto acuático de Morris se relacionan con la memoria para la ubicación de la plataforma; si durante el entrenamiento la temperatura del agua se mantiene a 19°C, se observa que los animales muestran un desempeño óptimo en la prueba de retención (Joëls, et al., 2006); sin embargo, al aumentar el estrés disminuyendo la temperatura del agua a 16°C o al disminuir el estrés aumentando la temperatura del agua a 25°C, se observa un efecto perjudicial (Salehi, Cordero & Sandi, 2010). Este patrón de U invertida también ha sido descrito recientemente en humanos. En su estudio, Schilling et al., (2013), expusieron a un grupo de personas a la asociación entre rostros con expresiones faciales neutras y la descripción de comportamientos socialmente valorados; y antes del recobro (que consistió en mencionar la descripción adecuada ante el rostro presentado) administraron distintas dosis de cortisol por vía intravenosa (i.e. 0, 3, 6, 12, o 24mg); los resultados mostraron que el grupo con la dosis intermedia (6mg) tuvo un mayor porcentaje de recobro en comparación con los demás grupos; y que los grupos con las dosis extremas (0 o 24mg) tuvieron un peor desempeño.

Aunque la mayoría de ejemplos indican que los efectos del estrés o los glucocorticoides sobre la memoria exhiben dicha relación de U invertida con relación a la intensidad o la dosis, se ha sugerido que los glucocorticoides podrían afectar algunos tipos



de memoria siguiendo un patrón lineal. Por ejemplo, se ha descrito que en la memoria de temor al tono, una tarea no dependiente del hipocampo mediada por la activación del núcleo central de la amígdala (Nader, Majidishad, Amorapanth & LeDoux, 2001), a medida que se aumenta la intensidad del choque eléctrico, los animales aumentan su desempeño en la prueba de retención (Sandi & Pinelo-Nava, 2007; Joëls, 2006); sin embargo, se ha propuesto que estas diferencias en la relación intensidad –efecto podrían obedecer a diferencias en el balance de receptores para glucocorticoides en las áreas involucradas en cada tipo de memoria, así, se ha reportado que en áreas con mayores niveles de GRs en comparación con los niveles de MRs, como el núcleo central de la amígdala, se tienden a observar relaciones lineales entre las dosis y los efectos de los glucocorticoides; mientras que en áreas con altos niveles de ambos receptores, como el hipocampo se han descrito relaciones dosis-efecto en forma de U invertida (Diamond, Bennett, Fleshner & Rose, 1992; Conrad, 2005).

Finalmente, los efectos del estrés y los glucocorticoides varían en función de la fase de la memoria evaluada; por ejemplo, en estudios recientes el grupo de neurofisiología comportamental de la universidad Nacional de Colombia reportó que la exposición a estrés agudo por restricción de movimientos durante 1h, 30 minutos antes de la prueba de recobro, perjudica la recuperación de la memoria espacial en el laberinto de Barnes, pues los animales estresados cometen un mayor número de errores para encontrar la caja meta y presentan mayores latencias de escape con relación a los animales control (Troncoso, Lamprea, Cuestas & Múnera, 2010). Los mismos efectos fueron evidenciados al administrar corticosterona (0.125 mg/kg) por vía intraperitoneal 10 minutos antes de la prueba de recobro en dicha tarea (Prado, 2009); y se observó que la activación de los MRs pero no de los GRs es esencial para la expresión de los efectos negativos del estrés sobre la recuperación de la memoria (Urueña-Méndez & Lamprea, 2015). De manera similar al usar la tarea espacial del laberinto acuático de Morris, se ha observado que la administración de corticosterona o la exposición a estrés agudo perjudica la recuperación de la memoria y que el bloqueo de MRs revierte el efecto (Roosendaal, Hahn, Nathan, Quervain & McGaugh, 2004; Khaksari, Rashidy-Pour & Vafae, 2007); lo mismo se ha reportado en estudios con humanos (de Quervain, Roosendaal, Nitsch, McGaugh & Hock, 2000; Kuhlmann, Piel & Wolf, 2005).

A diferencia de lo observado en la fase de recuperación de la memoria, el estrés y los glucocorticoides facilitan la fase de adquisición; por ejemplo, en estudios con roedores se ha reportado que la exposición aguda a choques eléctricos en la cola facilita la adquisición en las tareas de condicionamiento dependientes del hipocampo (i.e. Condicionamiento de temor contextual o evitación inhibitoria) (Beylin & Shors, 2003). De la misma manera se ha encontrado que la exposición al olor de los depredadores, pero no la exposición a una sustancia control, facilita el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris (Galliot, Levailant, Beard, Millot & Pourié; 2010). Asimismo, en estudios con humanos se ha reportado que la administración de estrés agudo (e.g. Inmersión del brazo dominante en agua helada durante 6 minutos) o la administración de cortisol (e.g. 20mg) antes del entrenamiento mejora el aprendizaje de tareas espaciales como la tarea virtual del laberinto acuático de Morris, al igual que el aprendizaje de información declarativa emocional (Duncko, Cornwell, Cui, Merikangas & Grillon, 2007; Buchanan, & Lovallo, 2001). Estos efectos facilitadores del estrés agudo sobre la adquisición de la memoria parecen depender de la activación de MRs, pues su bloqueo con antagonistas específicos antes de la adquisición revierte los efectos de mejora (De Kloet, et al., 1999; Schwabe, Tegenthoff, Höffken & Wolf, 2013).

## **Estrés agudo y consolidación de la memoria**

Respecto a la consolidación de la memoria dependiente del hipocampo, los estudios con roedores han tendido a utilizar la administración sistémica de glucocorticoides post-entrenamiento en vez de la exposición directa a un evento de estrés y con esta aproximación han evidenciado consistentemente efectos facilitadores. Por ejemplo, se ha reportado que la inyección sistémica de glucocorticoides después del entrenamiento revierte los efectos amnésicos de los inhibidores de síntesis de proteínas administrados durante la consolidación de la memoria (Roosendaal, 2003); también se ha observado que la inyección de dosis moderadas de agonistas de glucocorticoides poco después del entrenamiento facilita la memoria en las tareas de condicionamiento contextual, de evitación inhibitoria y de reconocimiento de objetos (Roosendaal, 2002; Okuda, Roosendaal & McGaugh, 2004; Abrari, Rashidy-Pour, Semnani, Fathollahi & Jadid, 2009); asimismo se ha encontrado que la aplicación de corticosterona o agonistas

sintéticos de glucocorticoides poco después de la adquisición mejora la consolidación de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris (Roosendaal & McGaugh, 1997; Roosendaal, 2000; Roosendaal, 2003; Schwabe, Joëls, Roosendaal, Wolf & Oitzl, 2011; Sandi & Pinelo-Nava, 2007).

A diferencia de los estudios con administración sistémica de glucocorticoides, los estudios en roedores donde se utiliza la exposición directa a un estresor son escasos y han reportado tanto efectos facilitadores como efectos perjudiciales. Por ejemplo, en uno de los estudios disponibles se observó que la administración post-entrenamiento de un choque eléctrico inescapable mejoró la consolidación de la memoria a largo plazo en la tarea de evitación inhibitoria, mientras que se observó el efecto contrario con la exposición post-entrenamiento a una sesión de nado forzado (Jodar, Takahashi, y Kaneto; 1995); asimismo, al administrar cinco choques eléctricos inescapables inmediatamente después del entrenamiento en la tarea espacial del laberinto acuático de Morris se observaron déficits en la consolidación de la memoria espacial (Almaguer-Melian et al., 2012). Dichos efectos negativos sobre la consolidación en estas dos tareas dependientes del hipocampo, podrían obedecer a la intensidad del estrés; así, estresores intensos tendrían un efecto perjudicial, mientras que estresores moderados tendrían un efecto de mejora; sin embargo, para extender esta observación se deberían evaluar los efectos del estrés sobre la consolidación de la memoria en roedores con otras tareas y con otros estresores.

Utilizando la administración sistémica de glucocorticoides, así como la exposición directa a estresores, los estudios sobre estrés en la consolidación de la memoria con humanos también han favorecido la idea de una mejora en la consolidación. Por ejemplo, se ha observado que la exposición post-entrenamiento a un protocolo de estrés social mejora la consolidación de la memoria declarativa verbal (Smeets, Giesbrecht, Jelicic, & Merckelbach, 2007; Smeets, Otgaar, Candel & Wolf, 2008), asimismo se ha observado que la exposición a estrés por frío o la administración de cortisol post-entrenamiento mejora la memoria para palabras e imágenes con contenido emocional (Wolf, 2009), así como la memoria visual para imágenes con contenido neutro (Preuß & Wolf, 2009).

Diversas investigaciones sugieren que los efectos del estrés y los glucocorticoides sobre la consolidación de la memoria están mediados principalmente por la activación de GRs en el hipocampo, pues, se ha observado que la administración de antagonistas para GRs hipocampales revierte los efectos facilitadores de la corticosterona o el estrés sobre la consolidación de la memoria en el laberinto acuático de Morris, así como en las tareas de evitación inhibitoria (Roozendaal, 2000; Donley, Schulkin & Rosen, 2005); mientras que la administración de antagonistas para MRs no tiene efecto (Roozendaal, 2000). También, se ha reportado que la activación del núcleo basolateral (BLA), pero no del núcleo central (CeA) de la amígdala modula los efectos del estrés sobre la consolidación de la memoria dependiente del hipocampo, pues las lesiones excitotóxicas o la inactivación farmacológica en el núcleo basolateral, pero no en el núcleo central de la amígdala bloquean los efectos facilitadores de la inyección post-entrenamiento de glucocorticoides en la tarea de evitación inhibitoria (Roozendaal & McGaugh, 1997; Schwabe, et al., 2011), de la misma manera, la administración de antagonistas para GRs en el núcleo basolateral, pero no en el núcleo central de la amígdala bloquea los efectos facilitadores de la dexametasona intrahipocampal sobre la consolidación de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris (Roozendaal 2000; McGaugh, 2000).

## **Estrés agudo y acetilación de histonas**

Como se ha observado el estrés agudo ejerce sus efectos a través de la liberación de glucocorticoides y la activación de MRs y GRs, los cuales se unen a los GREs localizados en las regiones promotoras de los genes. Aunque se sabe que esa unión de MRs y GRs en los GREs afecta la transcripción, el mecanismo exacto a través del cual esto sucede aún no ha sido completamente explicado. Investigaciones recientes han sugerido que el estrés agudo podría afectar la transcripción génica a través de múltiples mecanismos epigenéticos; por ejemplo, disminuyendo marcadores de represión transcripcional como la metilación del ADN (Rodrigues, et al., 2015) o la trimetilación de H3K27 (Hunter, McCarthy, Milne, Pfaff, & McEwen, 2009); sin embargo, al observar que los receptores de glucocorticoides pueden reclutar HATs como CPB y PCAF (Li, Wong, S. Tsai, M. Tsai, & O'Malley, 2003); así como reclutar HDACs como HDAC2 (VandenBerghe, De Bosscher, Vermeulen, De Wilde, & Haegeman, 2002), la investigación sobre los mecanismos

epigenéticos afectados por el estrés agudo se ha orientado principalmente a evaluar la acetilación de las histonas.

Aunque los estudios en animales sobre los efectos del estrés agudo en la acetilación de las histonas son escasos, han sugerido que el estrés puede afectar la fosforilación de H3S10 y la acetilación de H3K14. Por ejemplo, en un estudio realizado por Chandramohan, Droste, y Reul (2007) se sometió a un grupo de ratas a estrés agudo por exposición a la novedad, el cual consistió en ubicarlas durante 30min en una habitación con diferentes condiciones de iluminación (i.e 100, 300, 500 o 750 lux). 2, 4, 8 o 24 horas después del estrés se obtuvieron muestras de tejido cerebral y se evaluaron ambos marcadores. Los resultados mostraron la fosforilación de H3S10 y la acetilación de H3K14 aumentaron en la región granular del giro dentado (donde se encuentra la población de neuronas maduras de dicha estructura) pero no en otras áreas del mismo; también mostraron que el aumento máximo se presentó en la condición de iluminación de 500 lux a las 2 horas post-estrés.

Estos cambios también han sido reportados al someter a los animales a estrés agudo por nado forzado. Por ejemplo, se ha observado que el nado forzado durante 15 minutos (en agua a 25°C) aumenta la fosforilación de H3S10 y la acetilación de H3K14 en la región granular del giro dentado, lo cual inicia a los 15 minutos del estrés, alcanza el aumento máximo a las 2h y se mantiene hasta 4 horas después de la exposición. (Chandramohan, Droste, Arthur & Reul, 2008; Gutiérrez-Mecinas, et al., 2011).

Finalmente, se ha mostrado que la exposición aguda durante 30 minutos a un depredador promueve la fosforilación de H3S10 y como esta modificación a su vez promueve la acetilación de H3K14 se sugiere que podría aumentarla (Bilang-Bleuel, et al., 2005). Sin embargo, los efectos sobre H3K14ac, promovidos por protocolos de estrés diferentes al nado forzado o la novedad aún no han sido investigados.

## **Estrés agudo, consolidación de la memoria espacial y H3K14ac**

Como se describió previamente el estrés agudo puede afectar la consolidación de la memoria dependiente del hipocampo, sin embargo, la escasez de estudios en roedores así como la diferencia en los resultados obtenidos plantean la necesidad de utilizar otros estresores inmediatamente después de la adquisición y evaluar los cambios que inducen en la consolidación de la memoria a largo plazo. También se describió anteriormente que el estrés agudo, así como la consolidación de la memoria a largo plazo podrían involucrar cambios en la acetilación de H3K14. Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado si formas de estrés agudo diferentes al nado forzado o la novedad afectan la acetilación de H3K14, o si otras tareas espaciales, diferentes al laberinto acuático de Morris promueven aumentos en este marcador. Finalmente, ningún estudio hasta la fecha ha evaluado si los efectos del estrés agudo sobre la consolidación de la memoria espacial involucran cambios en la acetilación de H3K14, en otras palabras no se ha estudiado si el estrés agudo inmediatamente después del aprendizaje, promueve cambios en la acetilación de la histona 3, que pudieran relacionarse con su efecto sobre la consolidación de la memoria.



# 1. Justificación

La consolidación de la memoria es un proceso de estabilización progresivo a través del cual la información recientemente adquirida se retiene a largo plazo. Este proceso de estabilización involucra cambios en las neuronas del sistema nervioso central, como la formación de receptores y su anclaje en la membrana plasmática, la modificación de las espinas dendríticas preexistentes o la formación de nuevas espinas dendríticas (Lamprecht & LeDoux, 2004), los cuales dependen de la transcripción génica y la nueva síntesis de proteínas, dos procesos cuya regulación se ha vinculado con diversos mecanismos epigenéticos (i.e. mecanismos que afectan el estado de la cromatina sin alterar la secuencia de nucleótidos en el ADN).

Entre los mecanismos epigenéticos, uno de los más estudiados por su relación con los procesos de memoria es la acetilación de las histonas, un grupo de proteínas que se encargan del enrollamiento del ADN; al ser acetiladas por las enzimas histonas acetiltransferasas (HATs), las histonas facilitan la transcripción, mientras que al ser desacetiladas por las enzimas deacetilasas (HDACs), las histonas ejercen el efecto contrario. Investigaciones recientes realizadas en roedores han sugerido que la consolidación de la memoria puede involucrar cambios en la acetilación de las histonas en área CA1 del hipocampo, los cuales se observan en las primeras horas post-entrenamiento y se mantienen por 24h (Levenson, et al., 2004; Gräff, et al., 2012); asimismo han mostrado que promover la acetilación de las histonas, con el uso de inhibidores de las HDACs revierte los déficits de memoria observados en animales modelo de enfermedades neurodegenerativas y promueve la consolidación de la memoria en animales normales (Gräff & Tsai, 2013).





Una de las memorias que más llama la atención por su vulnerabilidad a la disrupción en los procesos neurodegenerativos es la memoria espacial, un tipo de memoria episódica que se refiere a la adquisición, el almacenamiento y el recobro de la información sobre los objetos y los lugares a los que ha estado expuesto un individuo (Carrillo-Mora et al., 2009). Este tipo de memoria suele ser estudiada en roedores con el uso de diferentes laberintos, entre los cuales el laberinto acuático de Morris, el laberinto radial y el laberinto de Barnes suelen ser los más utilizados. Investigaciones recientes, en las que se usa el laberinto acuático de Morris sugieren que la consolidación de la memoria espacial podría involucrar cambios en la acetilación de H3K14 en el hipocampo, sin embargo, es necesario extender la investigación a otras tareas espaciales para evaluar si la acetilación de H3K14 es un mecanismo general que está involucrado en la consolidación de la memoria espacial o si es un mecanismo particularmente involucrado en tareas asociativas con un alto componente de estrés intrínseco, como el laberinto acuático de Morris (Harrison, Hosseini & McDonald, 2009).

Al respecto, una de las mejores opciones para la evaluación de la memoria espacial es el laberinto de Barnes, pues en comparación con el laberinto acuático de Morris presenta un componente de estrés intrínseco significativamente menor (Harrison et al., 2009), en comparación con el laberinto radial no implica la privación alimenticia de los animales -la cual se ha demostrado que incrementa la respuesta de estrés- (Stamp, Mashoodh, van Kampen & Robertson, 2008) y al igual que dichas tareas permite un aprendizaje eficiente en los animales, lo cual ha sido demostrado consistentemente en las investigaciones del grupo de Neurofisiología Comportamental de la Universidad Nacional de Colombia (Troncoso, et al., 2010; Vargas-López, Lamprea & Múnera, 2011).

Distintas investigaciones realizadas por este grupo y otros grupos de investigación han sugerido que la memoria a largo plazo puede ser afectada por el estrés, evidenciando efectos perjudiciales cuando el estrés es intenso, duradero y frecuente; y efectos facilitadores cuando el estrés es moderado, breve e infrecuente (De kloet, et al., 2005). Con estas últimas características, se ha sugerido que la administración de estrés agudo puede mejorar la consolidación de la memoria dependiente del hipocampo, sin embargo, en roedores la investigación de dichos efectos es escasa y los resultados son variables; lo

que puede obedecer a diferencias en la intensidad de los estresores. Una forma de comprobar esta observación consiste en administrar un estresor inmediatamente después de la adquisición y evaluar si induce mejoras en la consolidación de la memoria a largo plazo. Al respecto, una de las mejores opciones para inducir estrés, que consistentemente ha mostrado promover aumentos moderados y transitorios en la liberación de glucocorticoides es la restricción de movimientos (durante 1h) (Acosta, 2008), la cual resulta menos dolorosa para los roedores en comparación con la administración de choques eléctricos y es menos estresante en comparación con la exposición al nado forzado (Koolhaas, et al., 2005), estresores utilizados en los estudios previamente reportados.

Algunas investigaciones en roedores también han sugerido que el estrés agudo puede afectar la transcripción génica a través de mecanismos epigenéticos como la acetilación de las histonas. Así, se ha evidenciado que la exposición aguda a la novedad o al nado forzado promueve aumentos transitorios en H3K14ac a partir de los 15 minutos y hasta las 2-4h post-estrés (Chandramohan, Droste, & Reul, 2007); sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado si formas de estrés agudo alternativas, como la restricción de movimientos afectan la acetilación de dicho marcador. Asimismo, hasta la fecha ningún estudio ha evaluado si los efectos del estrés agudo sobre la consolidación de la memoria espacial involucran cambios en H3K14ac; en otras palabras, no se ha estudiado si el estrés agudo inmediatamente después del aprendizaje, promueve cambios en la acetilación de la histona 3, que pudieran relacionarse con su efecto sobre la consolidación de la memoria.

Dado este contexto en el presente trabajo se evaluaron los efectos del estrés agudo por restricción de movimientos durante 1h sobre la consolidación de la memoria espacial en el laberinto de Barnes; se evaluó por primera vez si esta tarea afectaba la acetilación de H3K14; se evaluó por primera vez si la restricción aguda de movimientos alteraba este marcador y se evaluó por primera vez si las diferencias en el desempeño entre los animales estresados y no estresados inmediatamente después de la adquisición involucraban diferencias en H3K14ac.



## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo General**

Determinar los efectos de la exposición a un protocolo de estrés agudo sobre la consolidación de la memoria espacial en el laberinto de Barnes y su relación con posibles cambios en la acetilación de la histona 3 cerebral.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- 1- Evaluar el efecto del estrés por restricción de movimientos, administrado inmediatamente después del entrenamiento en el laberinto de Barnes, sobre la consolidación de la memoria espacial.
  
- 2- Determinar el efecto de la exposición a estrés por restricción de movimientos sobre la acetilación de la histona 3 en la lisina 14, en diversas áreas cerebrales.
  
- 3- Determinar el efecto del entrenamiento en el laberinto de Barnes sobre la acetilación de la histona 3 en la lisina 14, en diversas áreas cerebrales.
  
- 4- Determinar el efecto de la exposición a estrés por restricción de movimientos administrado inmediatamente después del entrenamiento en el laberinto de Barnes sobre acetilación de la histona 3 en la lisina 14, en diversas áreas cerebrales.



### **3. Hipótesis**

1. Si el estrés agudo por restricción de movimientos mejora la consolidación de la memoria espacial a largo plazo, se espera que los animales sometidos a estrés inmediatamente después del entrenamiento en el laberinto de Barnes exhiban un mejor desempeño durante la prueba de retención en comparación con los animales entrenados que no fueron sometidos a estrés.
2. Si el estrés por restricción de movimientos promueve cambios en la acetilación de la histona 3 en la lisina 14, se espera encontrar diferencias en la cantidad de células inmunoreactivas para dicho marcador al comparar las estructuras cerebrales de los animales estresados y los animales no estresados.
3. Si el aprendizaje espacial en el laberinto de Barnes promueve cambios en la acetilación de histona 3 en la lisina 14, se espera encontrar diferencias en la cantidad de células inmunoreactivas para dicho marcador al comparar las estructuras cerebrales de los animales entrenados y los animales no entrenados.
4. Si el estrés mejora la memoria a través de un mecanismo epigenético que involucra la acetilación de la histona3 en la lisina 14, se espera encontrar diferencias en la cantidad de células inmunoreactivas para dicho marcador al comparar las estructuras cerebrales de los animales sometidos a estrés inmediatamente después del entrenamiento y los animales entrenados que no fueron expuestos al estrés.





## **4. Método**

### **4.1 Sujetos**

Se emplearon 40 ratas Wistar macho adultas (3-4 meses de edad) con un peso aproximado de  $280 \pm 30$  g, suministradas por el Instituto Nacional de Salud (INS). Los animales fueron trasladados al Laboratorio de Aprendizaje y Comportamiento Animal del Departamento de Psicología de la Universidad Nacional de Colombia, y fueron alojados en grupos de cuatro ratas, en cajas de policarbonato (38 cm de largo x 32 cm de ancho x 18 cm de alto). Durante su estadía en el laboratorio los animales permanecieron en un bioterio con condiciones de temperatura controladas ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ), con un ciclo de luz/oscuridad estándar de 12h (con las luces encendidas a las 7:00h) y con acceso libre al agua y al alimento. Todos los procedimientos experimentales se realizaron entre las 7:00 y las 12:30h, con el fin de evitar el pico circadiano de corticosterona (De Kloet, et al., 1999). Antes de iniciar los procedimientos experimentales los animales tuvieron un periodo mínimo de 7 días de aclimatación a las condiciones del laboratorio; al finalizar dicho periodo los animales fueron manipulados por el experimentador en sesiones individuales de 5 minutos diarios por tres días.

### **4.2 Materiales y equipos**

La evaluación de la memoria espacial se realizó en el laberinto de Barnes (Barnes, 1979), que consiste en una plataforma circular de acrílico negro, elevada 80cm respecto al suelo, con 122 cm de diámetro, 1cm de grosor y 18 agujeros de 9.5 cm de diámetro cada uno, espaciados de manera regular en la periferia. Bajo cada agujero es posible insertar una



caja de escape o caja meta elaborada en acrílico blanco y con forma de prisma rectangular (24 cm de largo x 8.75 cm de ancho x 10 cm de alto). La selección del agujero en el que se emplaza la caja meta (agujero meta) es aleatoria para cada animal y se mantiene durante el entrenamiento. En el centro del laberinto, es decir a 61cm del borde de la plataforma circular, se ubica una caja de acrílico blanco en forma de cilindro con la base inferior abierta (25 cm de base x 10cm alto). Esta caja se denomina caja de salida y puede ser elevada por el experimentador a través de un sistema de poleas.

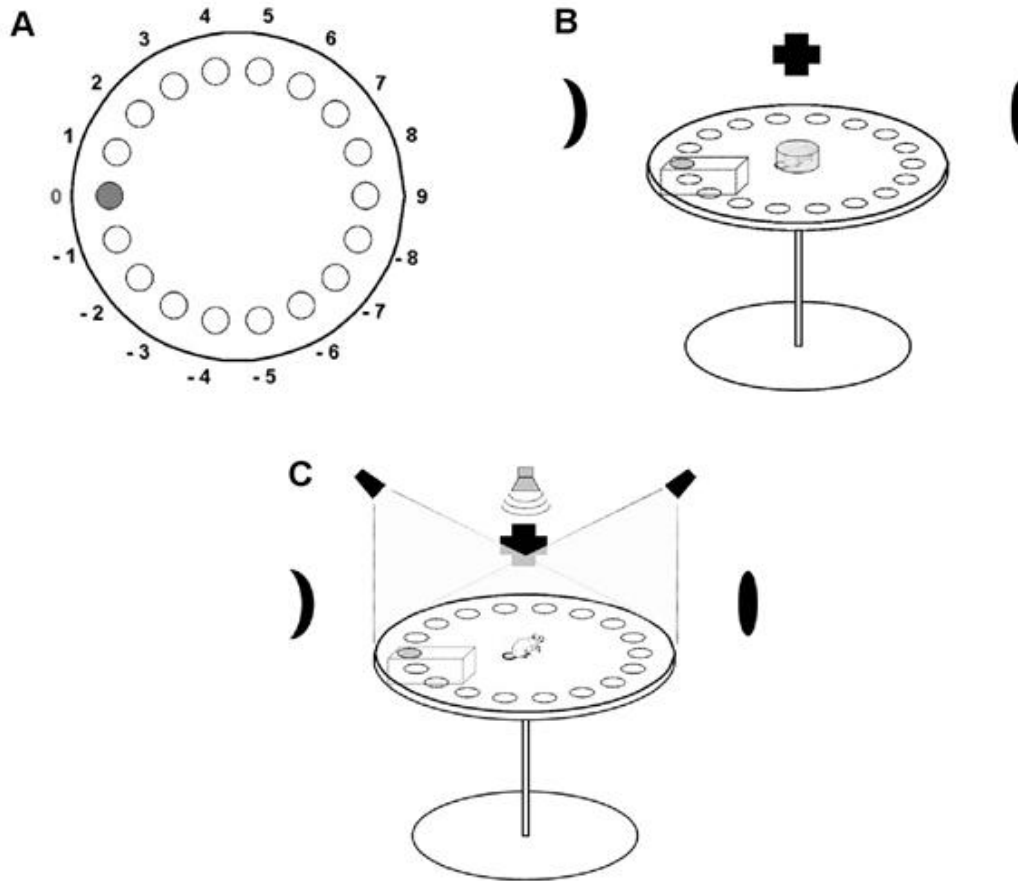
El laberinto se encuentra en una cabina experimental aislada del ruido del laboratorio. En el techo de la cabina experimental se hayan instaladas una cámara de video una fuente de ruido blanco de 90 dB y una fuente de luz blanca de 300W ubicadas hacia el centro de la plataforma circular. En una de las cuatro paredes de la cabina experimental también se encuentra una fuente de luz roja de 60W; esta luz puede ser alternada con la luz blanca a través de un circuito activado por el experimentador.

En las paredes restantes de la cabina experimental se encuentran estímulos visuales arbitrarios o claves espaciales extra-laberínticas, las cuales pueden ser usadas por el animal para ubicarse en el espacio (Harrison, et al., 2009). Dichas claves extra-laberínticas se mantuvieron en una ubicación fija y a una distancia media de 45 cm a partir del borde de la plataforma circular (Figura 5). En la cabina experimental también se ubicó una caja de polipropileno (42 cm de largo x 32 cm de ancho x 31 cm de alto) llamada caja de consolidación, en la cual se ubicó al animal durante los intervalos entre ensayos.

Las sesiones experimentales fueron grabadas por medio de un circuito cerrado de televisión para su análisis posterior con el Freeware X-PloRat 2005, desarrollado en el Laboratorio de Comportamiento Exploratorio de la Universidad de Sao Paulo, Brasil.

Para el análisis inmunohistoquímico se obtuvieron secciones cerebrales de 40µm usando un criostato Marca Leica (referencia CM1850). Las secciones cerebrales procesadas fueron observadas con un microscopio de luz marca Zeiss Axioskop 40, con un objetivo de 40 aumentos y se obtuvieron imágenes digitales utilizando el programa Zen 2011 (Blue edition) y una cámara marca Canon PowerShot G10 acoplada al microscopio.

La cuantificación de las células inmunoreactivas para H3K14ac se realizó con el Freeware ImageJ (Schindelin, et al., 2012)



**Figura 5.** Laberinto circular de Barnes. **A.** Vista superior del instrumento; se observa la ubicación de los 18 agujeros; en gris oscuro se observa el agujero meta designado como 0, el cual es seleccionado de manera aleatoria para cada animal. **B.** Se observan las claves extra-laberínticas, ubicadas en las paredes de la cabina experimental; la caja meta se emplaza bajo el agujero 0 y el animal se ubica en la caja de salida (en gris claro). **C.** Se retira la caja de salida y, simultáneamente, se encienden la luz blanca y el Sonido. Adaptado de “El estrés agudo interfiere con la evocación y promueve la extinción de la memoria espacial en el laberinto de Barnes” por J. Troncoso, M. Lamprea, D. Cuestas y A. Munera, 2010, *Acta Biológica Colombiana*, 15 (1), p.212.

## 4.3 Procedimientos

### 4.3.1 Entrenamiento y evaluación de la memoria en el laberinto de Barnes

**Habitación:** 24h después de la tercera sesión de manipulación, los animales fueron expuestos individualmente de manera no contingente a los elementos de la cabina experimental con el objetivo de reducir su reactividad frente a la novedad del ambiente.

De acuerdo con el protocolo de habitación, cada animal fue conducido hacia la cabina experimental en una caja de transporte elaborada en poliestireno expandido, cuya función fue aislarlo del ruido externo. Una vez ingresó a la cabina experimental, en la cual sólo permaneció encendida la fuente de luz roja, el animal fue ubicado en la caja de consolidación, y permaneció allí durante un minuto. Posteriormente fue ubicado durante dos minutos en la caja meta situada sobre la superficie de la plataforma, es decir no emplazada en algún agujero; retornó a la caja de consolidación por un minuto y fue ubicado durante dos minutos en la caja meta, esta vez emplazada en un agujero del laberinto. A continuación, regresó a la caja de consolidación por un minuto y fue ubicado durante dos minutos en la caja de salida. Finalmente fue regresado a la caja de transporte y ubicado en su respectiva caja hogar.

**Adquisición:** 24h después de la sesión de habitación, los animales recibieron individualmente una sesión con ocho ensayos de entrenamiento en la tarea espacial, tal como se describe a continuación. Cada animal fue colocado en la caja de transporte y llevado a la cabina experimental donde permaneció encendida sólo la fuente de luz roja. Al ingresar a la cabina se ubicó al animal en la caja de consolidación por un periodo de dos minutos. Al concluir los dos minutos, el experimentador sacó al animal de la caja de consolidación y lo ubicó en la caja de salida, donde permaneció treinta segundos. Finalizado ese tiempo, el experimentador elevó la caja de salida a través del sistema de poleas, al tiempo que activó la fuente de luz blanca y simultáneamente la fuente de sonido.

El animal experimental permaneció expuesto a las condiciones de luz blanca y sonido hasta que encontró la caja meta o hasta completarse cuatro minutos de exposición a dichas condiciones. En el último caso el experimentador condujo al animal hasta la caja meta emplazada en el agujero correspondiente. Una vez el animal ingresó a la caja meta, el experimentador apagó simultáneamente la fuente de luz blanca y la fuente de sonido. El animal permaneció en la caja meta hasta que salió por sí mismo o hasta completar un minuto; a continuación fue ubicado en la caja de consolidación.

El animal fue mantenido en esta condición por un intervalo inter-ensayo de cuatro minutos, en los cuales se limpió el instrumento y sus elementos con alcohol diluido al 10% en agua con el fin de disipar posibles marcas de olor. Al terminar los cuatro minutos del intervalo el experimentador retiró al animal de la caja de consolidación y lo ubicó en la caja de salida, dando inicio a un nuevo ensayo. Al finalizar el octavo ensayo de adquisición el animal fue ubicado directamente en la caja de transporte.

Los animales pertenecientes a los grupos sin estrés después de la adquisición fueron inmediatamente transportados a su respectiva caja hogar, mientras que aquellos pertenecientes a los grupos con estrés después de la adquisición fueron transportados inmediatamente a una cabina diferente donde se siguió el protocolo de restricción motora. (Para un esquema del procedimiento diríjase a las figuras 7 y 8).

Durante la sesión de adquisición se determinó como criterio de exclusión que el animal se cayera dos veces seguidas de la plataforma o que no ingresara por sí mismo en la caja meta durante 5 ensayos consecutivos.

**Prueba de retención:** 24h después del último ensayo de entrenamiento se evaluó la retención de la memoria espacial a largo plazo, utilizando un procedimiento similar al de adquisición, excepto en que se realizó un único ensayo de 4 minutos de exploración sin la caja meta.

### 4.3.2 Inducción experimental de estrés por restricción motora

Se siguió el protocolo de restricción motora descrito en Troncoso et al., (2010). En resumen, cada animal fue transportado individualmente a una cabina similar al bioterio y a la cabina experimental donde se ubicó el laberinto; al entrar en esa nueva cabina el animal fue inmediatamente ubicado en un restrictor cilíndrico elaborado en plexiglás (18 cm de longitud y 4.5 cm de diámetro); el cual le permitió respirar cómodamente pero le limitó los movimientos de la cabeza y las extremidades (Figura 6).

El procedimiento de restricción motora tuvo una duración de 1h y se llevó a cabo en condiciones de luz y ruido blanco. Bajo estas condiciones el grupo de neurofisiología comportamental de la Universidad Nacional de Colombia evidenció que el procedimiento de restricción motora durante 1h es eficiente para promover cambios en los niveles plasmáticos de corticosterona, pues en comparación con los animales no estresados, los animales estresados muestran una elevación 4.5 veces mayor (250ng/ml en vez de 55ng/ml) 30 minutos después de finalizado el estrés y 2.5 veces mayor (150 ng/ml en vez de 55ng/ml) 1h y hasta 2.5h después de finalizado el estrés (Acosta, 2008).



**Figura 6.** Procedimiento de inducción de estrés agudo por restricción de motora. El animal es ubicado en un restrictor durante 1h bajo condiciones de luz y ruido blanco.

Al terminar el periodo de restricción motora cada animal fue ubicado en la caja de transporte y regresado a su respectiva caja hogar.

### 4.3.3 Inmunohistoquímica para H3K14ac

En el tiempo determinado para cada condición experimental (ver Figuras 7 y 8) los animales fueron profundamente anestesiados con una inyección intraperitoneal de uretano (a una dosis de 1.6g/kg) y perfundidos transcárdialmente con solución salina 0.9% y paraformaldehído (4% en PBS 0.1 M, 4°C, pH 7.4). Los cerebros fueron rápidamente removidos del cráneo y postfijados en el mismo fijador durante 24h a 4°C. Posteriormente fueron crioprotectados en sacarosa al 30% en PBS y mantenidos a 4°C hasta su completa inmersión en la solución (aproximadamente 48h). A continuación los cerebros fueron congelados con isopentano en hielo seco y cortados a 40µm de grosor (Gräff, et al., 2012) en un criostato a -20 °C. Las secciones cerebrales fueron almacenadas en solución anticongelante a -20°C para su procesamiento posterior.

Para el marcaje por inmunohistoquímica se seleccionaron aleatoriamente los cerebros de 4 animales por grupo y se eligieron 3 cortes coronales de cada uno (coordinadas antero-posterior (AP): 1.80mm, -2.76 mm y -3.00mm desde bregma)(Paxinos & Watson, 2008) con el fin de visualizar las siguientes áreas: zona periventricular (como control positivo), capa granular del giro dentado (GrDG), áreas CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, núcleo basolateral de la amígdala (BLA) y núcleo central de la amígdala (CeA).

Luego de ser seleccionados, los cortes fueron lavados utilizando PBS (3 veces por 8 minutos cada vez); fueron permeabilizados con 0.5% de Triton X-100 en PBS por 40 minutos y lavados nuevamente con PBS (2 veces por 8 minutos cada una). La actividad de la peroxidasa endógena fue inactivada durante 20 minutos por incubación con 1.66% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, 50% de etanol, 25% de PB2X y 25% de agua destilada. A continuación los cortes fueron lavados en PB2X (2 veces por 10 minutos cada una) y equilibrados con 0.5% de Triton X-100 en PBS durante 20 minutos. El marcaje inespecífico fue bloqueado con 0.5% de Triton X-100 en PBS, 2% de gelatina y 2% de suero fetal bovino durante 1h y se



realizó la incubación con el anticuerpo primario monoclonal producido en conejo anti-H3K14ac (Abcam, 1:2500) en 0.5% de Triton X-100 en PBS, 2% de gelatina y 2% de suero fetal bovino durante toda la noche a 4°C.

Se lavó el exceso de anticuerpo primario con 0.5% de Triton X-100 en PBS (4 veces por 10 minutos cada una) y se realizó la incubación con el anticuerpo secundario biotilado anti IgG de conejo producido en cabra (Laboratorios Vector, 1:1000) durante 1h a temperatura ambiente. Luego de lavar el exceso de anticuerpo secundario con 0.5% de Triton X-100 en PBS (3 veces por 8 minutos cada una) y luego de lavar el detergente con PBS (3 veces por 8 minutos cada una) los tejidos fueron incubados durante 1h en una solución de avidina-biotina (kit ABC de Vectastain, Vector, USA, Ref. PK 6101). Se repitieron los lavados con 0.5% de Triton X-100 en PBS, y los lavados con PBS solo. Finalmente, se realizó el revelado con una solución de 3,3'-diaminobenzidina + solución níquel (Vector, USA, Ref. SK 4100), se suspendió la reacción con PBS a 4°C y los cortes fueron montados en láminas histológicas para su análisis posterior.

Las láminas fueron observadas utilizando un microscopio de luz; se ubicó el área cerebral correspondiente y se tomaron 3 fotos, desde 3 puntos representativos diferentes utilizando el lente de 40 aumentos. Los puntos representativos seleccionados para cada área fueron similares en todas las muestras.

La cuantificación de las células positivas para H3K14ac se realizó utilizando la herramienta “cell counter” del programa ImageJ; se cuantificó la señal en las 3 fotografías (en un área de 0.1mm<sup>2</sup>) para cada región cerebral de cada animal y se obtuvo el promedio. Los datos se expresan como el porcentaje de la media del grupo basal.

#### **4.4 Consideraciones éticas**

Los procedimientos experimentales y el manejo de los residuos bioquímicos se desarrollaron siguiendo las normas estipuladas en la Resolución No 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, la Ley 84 del 27 de diciembre de 1989, la normativa de la Unión Europea (8616091EU) y la normativa del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América para el manejo y cuidado de los animales de laboratorio.

Respecto a la aplicación de las normas se aclara que: 1) Todos los procedimientos experimentales fueron sometidos a la consideración del Comité de Ética de la facultad de ciencias Humanas, conformado según lo estipulado en el artículo 26 de la Ley 84 de 1989; 2) Se garantizó que todo el personal encargado del cuidado y manejo de los animales experimentales contara con formación específica y experiencia en los procedimientos establecidos; 3) Para garantizar la seguridad de los investigadores, la manipulación de los residuos contaminados producto de los experimentos, se realizó utilizando batas y gorros desechables, guantes de nitrilo, tapabocas, y gafas de protección; 4) Para impedir la contaminación ambiental con elementos potencialmente tóxicos, los residuos químicos y los materiales desechables utilizados para el procedimiento de inmunohistoquímica fueron depositados en contenedores adecuados; 5) Los cadáveres de los animales experimentales de esta investigación fueron incinerados en el horno de incineración Eco Capital según lo dispuesto por el Sistema de Gestión Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia. (6) La Unidad de Recursos Físicos de la Universidad Nacional de Colombia, a través del programa UN Ambiente, se hizo cargo de la disposición definitiva de los desechos químicos producidos en el presente estudio.

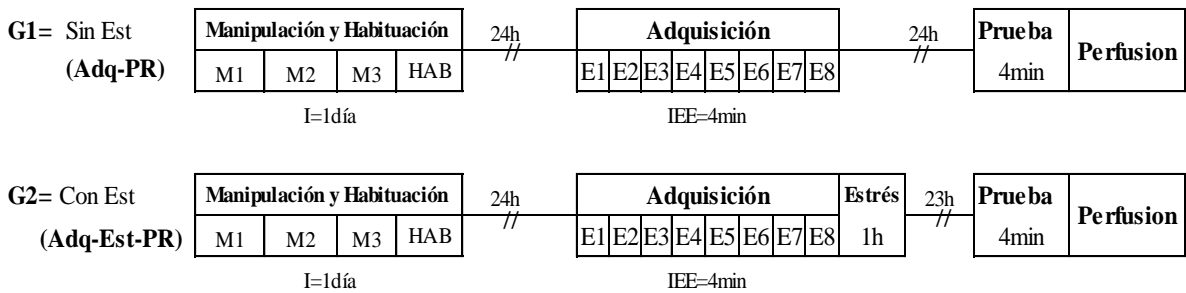
#### **4.5 Tipo de investigación y diseño**

Este estudio es de tipo experimental y está conformado por dos experimentos. El primer experimento, tuvo como objetivo la evaluación comportamental de los efectos del estrés agudo sobre la consolidación de la memoria espacial y fue realizado siguiendo un diseño experimental para grupos independientes; donde la variable manipulada fue el estrés (presencia o ausencia) inmediatamente después de la adquisición (Tabla 1). Para desarrollar este experimento se siguió el procedimiento descrito en la Figura 7.

El segundo experimento tuvo como objetivo evaluar los niveles de H3K14ac en los animales que sólo recibieron manipulación (basales), los animales sometidos a estrés por restricción de movimientos, los animales entrenados en la tarea del laberinto de Barnes y los animales entrenados con estrés inmediatamente después de la adquisición. Para ello se siguió un diseño experimental de 2x2 para grupos independientes con las variables adquisición y estrés (Tabla 2) y se desarrolló el procedimiento descrito en la figura 8.

Tratamiento	
Estrés inmediatamente después de la adquisición	
Sin estrés	Con estrés
G1: Adq-PR	G2: Adq-Est-PR
n=7	n=7

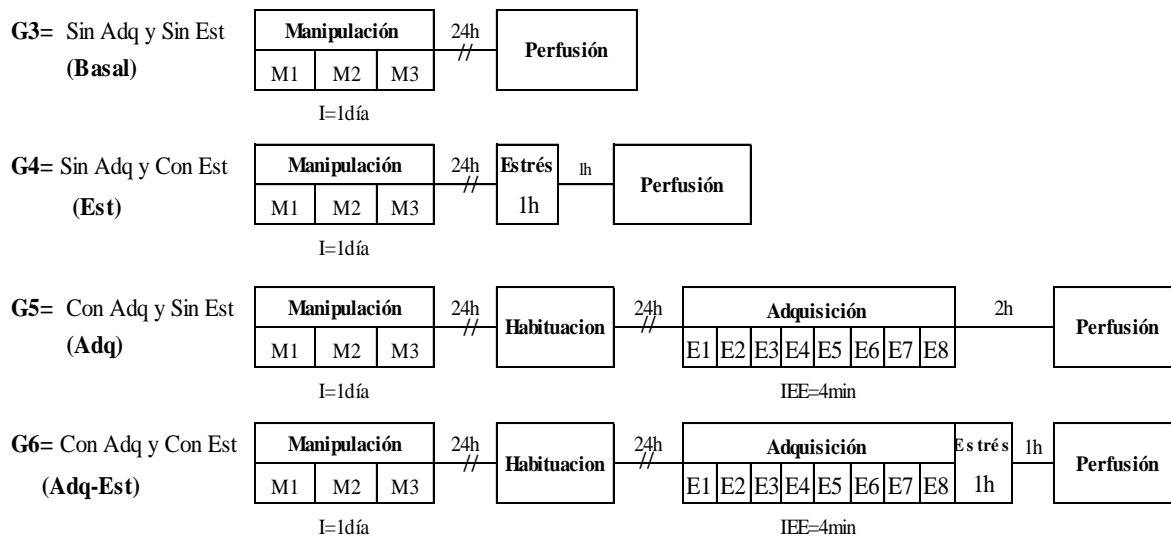
**Tabla 1.** Diseño experimental para la evaluación de los efectos del estrés agudo sobre la consolidación de la memoria espacial. Variable independiente: estrés inmediatamente después de la adquisición. **Abreviaturas.** **G:** grupo; **Adq:** adquisición; **Est:** estrés; **PR:** prueba; **n:** número final de animales por grupo.



**Figura 7.** Esquema del procedimiento general para la evaluación de los efectos del estrés agudo sobre la consolidación de la memoria espacial. Los animales tuvieron un periodo de aclimatación al bioterio, posteriormente fueron manipulados durante 3 días y tuvieron una sesión de habituación. 24h después fueron entrenados en la tarea espacial de Barnes y a continuación la mitad de ellos (seleccionada de manera aleatoria) fue inmediatamente sometida a estrés por restricción motora; mientras que la otra mitad fue retornada a su caja hogar correspondiente. 24h después del último ensayo de adquisición todos los animales tuvieron una prueba de retención. Adicionalmente, los animales fueron perfundidos inmediatamente después de la prueba, con el fin de aprovechar sus cerebros para evaluar los cambios en H3K14ac a las 24h de los tratamientos. **Abreviaturas.** **G:** grupo; **Adq:** adquisición; **Est:** estrés; **PR:** prueba; **I:** intervalo, **E:** ensayo; **IEE:** intervalo entre ensayos.

		Tratamiento 1	
		Estrés	
		Sin estrés	Con estrés
Tratamiento 2 Adquisición	Sin Adquisición	G3: Basal n=4	G4: Est n=4
	Con Adquisición	G5: Adq n=6	G6: Adq-Est n=6

**Tabla 2.** Diseño experimental para la evaluación de los niveles de H3K14ac. Variables independientes: Adquisición y estrés. **Abreviaturas.** **G:** grupo; **Adq:** adquisición; **Est:** estrés; **PR:** prueba; **n:** número final de animales por grupo.



**Figura 8.** Esquema del procedimiento general para la evaluación de los niveles de H3K14ac. Los animales tuvieron un periodo de aclimatación al bioterio, posteriormente fueron manipulados y fueron asignados aleatoriamente a una de las siguientes condiciones: Sin estrés y sin adquisición (Basal), sólo estrés, sólo adquisición, y estrés inmediatamente después de la adquisición; y fueron perfundidos 2h después de la adquisición o 1h después del estrés. **Abreviaturas.** **G:** grupo; **Adq:** adquisición; **Est:** estrés; **PR:** prueba; **I:** intervalo, **E:** ensayo; **IEE:** intervalo entre ensayos.

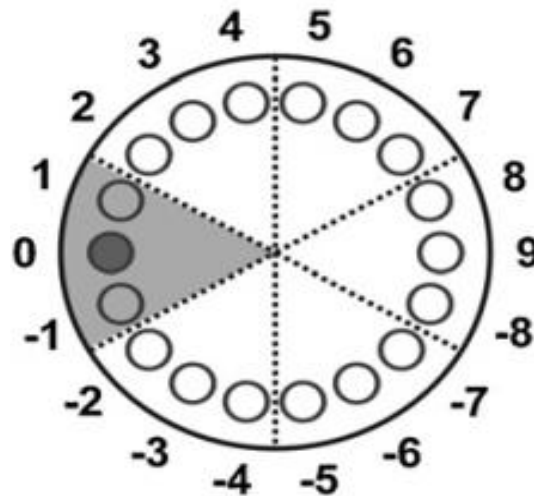
Las variables dependientes evaluadas durante la adquisición fueron:

- a) Latencia a meta: Tiempo en segundos que tarda el animal en entrar a la caja meta.
- b) Errores ponderados: Frecuencia de errores ponderados por la distancia a la meta. Para su cálculo cada error se multiplicó por su distancia en centímetros al agujero meta y se realizó la sumatoria. Esta medida permite una interpretación más precisa del error; pues aunque dos animales cometieran el mismo número de errores, aquel que lo hiciera en agujeros cercanos al meta tendría un nivel de error menor.
- c) Distancia media a meta: Representa la distancia promedio en centímetros entre los agujeros explorados y el agujero meta. Esta variable proporciona información sobre qué tan cercana al azar es la exploración de los animales durante cada ensayo.  
  
En una exploración dirigida a la meta el animal explora el agujero meta o agujeros cercanos, por lo que la distancia promedio a la meta es pequeña; sin embargo, en una exploración al azar, hay exploraciones en agujeros lejanos al meta, por lo cual la distancia promedio a la meta es mayor.
- d) Distancia total recorrida: Representa el recorrido total del animal en la plataforma. Esta variable fue medida en centímetros.
- e) Latencia al primer agujero: Tiempo en segundos que tarda el animal en iniciar la exploración. Esta variable brinda información sobre el desempeño motor de los animales.
- f) Velocidad media (cm/s): Calculada a partir de la distancia total recorrida dividida por la latencia de llegada a meta

Dado que la prueba de retención consiste en un ensayo de exploración de 4 minutos sin la caja meta, para obtener datos comparables en las variables anteriormente citadas, se evaluó el desempeño de los animales hasta que exploraron por primera vez el agujero meta, es decir, aquel que contuvo la caja de escape en la sesión de adquisición; a estas variables se les denominó primarias (Harrison, Reiserer, Tomarken, & McDonald, 2006).

Adicionalmente, se tuvieron en cuenta los 4 minutos de la prueba para evaluar el porcentaje de exploraciones totales por agujero con el fin de determinar si los animales exhibieron alguna preferencia en la exploración; este índice se calculó al dividir el número de exploraciones realizadas en cada agujero entre la frecuencia total de exploración y multiplicar el resultado por cien.

También se realizó un análisis por sector en el cual se comparó el porcentaje de exploraciones totales entre el sector meta (S.M), que correspondió al agujero meta y a los dos agujeros adyacentes (uno a la izquierda y uno a la derecha) y el sector opuesto (S.O) que correspondió a los demás agujeros agrupados en cinco secciones de tres agujeros cada (Figura 9). Para hacer comparable a los dos sectores, el porcentaje de exploraciones totales en el sector opuesto se dividió entre 5 (Vargas-López, et al., 2011).



**Figura 9.** División virtual por secciones del laberinto de Barnes. El sector meta S.M está representado en gris y el sector opuesto está representado en blanco. Adaptado de “Characterizing spatial extinction in an abbreviated version of the Barnes maze” por V. Vargas -López, M. Lamprea y A. Múnera, *Behavioural Processes*, 86(1), p.36. Copyright 2010 por Elsevier B.V.

## 4.6 Análisis estadístico

El desempeño de los animales durante la adquisición se evaluó con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores de medidas repetidas, los factores seleccionados fueron grupo y ensayo, y se utilizó como prueba post-hoc el método de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, el objetivo de este análisis fue evaluar el desempeño de los animales a lo largo del entrenamiento.

Durante la prueba de recuperación, para comparar el desempeño de los animales estresados (Adq-Est-PR) con los animales no estresados (Adq-PR) en las variables primarias, es decir aquellas evaluadas hasta la primera exploración al agujero meta, se hicieron pruebas t para grupos independientes o pruebas U de Mann-Whitney dependiendo del cumplimiento o no de los criterios de normalidad y homogeneidad de varianzas. También se comparó el desempeño de los animales durante la prueba, con su respectivo desempeño durante el último ensayo de adquisición; para ello se hicieron pruebas t pareadas o pruebas de Wilcoxon, dependiendo del cumplimiento o no de los criterios de normalidad y homogeneidad de varianzas.

Adicionalmente, para analizar el porcentaje de exploración total por agujero y por sector se realizó un ANOVA de dos factores de medidas repetidas; los factores seleccionados fueron grupo y agujero, y se utilizó como prueba post-hoc el método de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

Los niveles de H3K14ac en los grupos para la detección inmunohistoquímica se analizaron con un ANOVA de dos factores; los factores seleccionados fueron adquisición y estrés, y se utilizó como prueba post-hoc el método de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

En un análisis adicional, se evaluaron los niveles de H3K14ac a las 24h de la adquisición, aprovechando los cerebros de los animales con prueba. Aunque estos animales tuvieron una prueba de retención de 4 minutos, se presume que por la duración de la misma y por el tiempo de obtención de la muestra no es probable que se generen cambios en H3K14ac (Chandramohan, Droste, Arthur, et al., 2008); por lo cual, cualquier

cambio observado podría atribuirse a la adquisición o al estrés que tuvo lugar el día anterior a la prueba. Dichos grupos, se compararon con el basal y con los animales que tuvieron adquisición y estrés inmediatamente después de la adquisición pero no tuvieron prueba, en estos dos últimos grupos la medición de H3K14ac se realizó 2h después de la adquisición. El objetivo de este análisis adicional fue observar si los niveles de H3K14ac detectados a las 2h variaban a las 24h de las intervenciones; para ello se utilizó un ANOVA de un factor para grupos independientes y el método de comparaciones múltiples de Holm-Sidak como prueba post-hoc.

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Sigma Stat 3.5 (Systat Software, Inc., San José, California, EUA) y para todas las pruebas el nivel de significancia estadística fue establecido para probabilidades menores o iguales a 0,05.

Las gráficas fueron realizadas con el programa Microsoft® Office Excel 2010 y en todos los casos representan el promedio y el error estándar de la media (SEM).





## **5. Resultados**

### **5.1 Efectos del estrés por restricción de movimientos sobre la consolidación de la memoria espacial a largo plazo**

Para evaluar los efectos del estrés por restricción motora sobre la consolidación de la memoria espacial 16 ratas Wistar macho fueron entrenadas en el laberinto de Barnes. Inmediatamente después del último ensayo de adquisición la mitad de los sujetos fue expuesta a estrés durante 1h y la otra mitad retornada a su caja hogar. 24h después del último ensayo de adquisición se realizó una prueba de retención para ambos grupos.

Durante la adquisición se descartaron 2 animales por caerse dos veces seguidas de la plataforma, por esa razón el número final de animales en cada grupo es 7.

#### **5.1.2 Adquisición**

Los datos de la adquisición se presentan discriminados para cada grupo con el fin de mostrar que no fueron significativamente diferentes antes del tratamiento. Se realizó un ANOVA de dos factores de medidas repetidas, los factores seleccionados fueron grupo y ensayo; y se contrastó el desempeño de los animales con relación al primer ensayo de adquisición correspondiente. En las gráficas, para cada grupo se señalan las diferencias en el último ensayo de entrenamiento con relación al primero.

En la Figura 10.A, se presenta la latencia de llegada a la meta a lo largo del entrenamiento. De acuerdo con los análisis estadísticos, se observó un efecto del ensayo ( $F_{(1,7)}=8.579$ ,  $p<0.001$ ), pero no un efecto del grupo ( $F_{(1,7)}=2.136$ ,  $p=0.170$ ) o de la

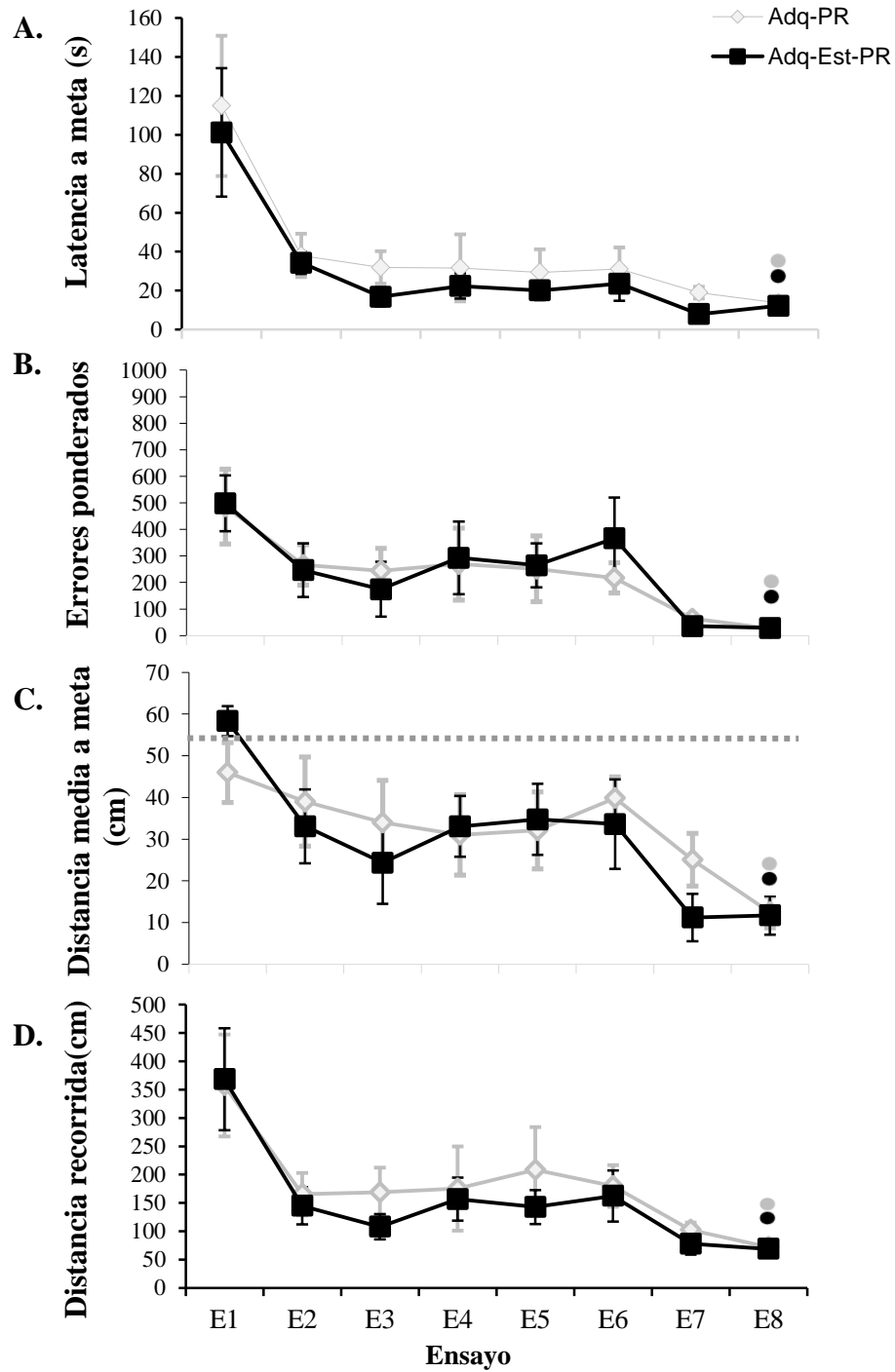
interacción ( $F_{(1,7)}=0.0474$ ,  $p=1.000$ ). Al finalizar el entrenamiento se observó que en comparación con el desempeño inicial ambos grupos de animales disminuyeron significativamente su latencia para encontrar la meta. (Anexo1.A).

Respecto la frecuencia de errores ponderados a lo largo de los ensayos de entrenamiento (Figura 10.B), se observó un efecto del ensayo ( $F_{(1,7)}=4.256$ ,  $p<0.001$ ), pero no un efecto del grupo ( $F_{(1,7)}=0.0790$ ,  $p=0.783$ ) o de la interacción ( $F_{(1,7)}=0.201$ ,  $p=0.984$ ). Al finalizar el entrenamiento se observó que en comparación con el desempeño inicial, ambos grupos de animales redujeron significativamente la cantidad de errores cometidos. (Anexo1.B).

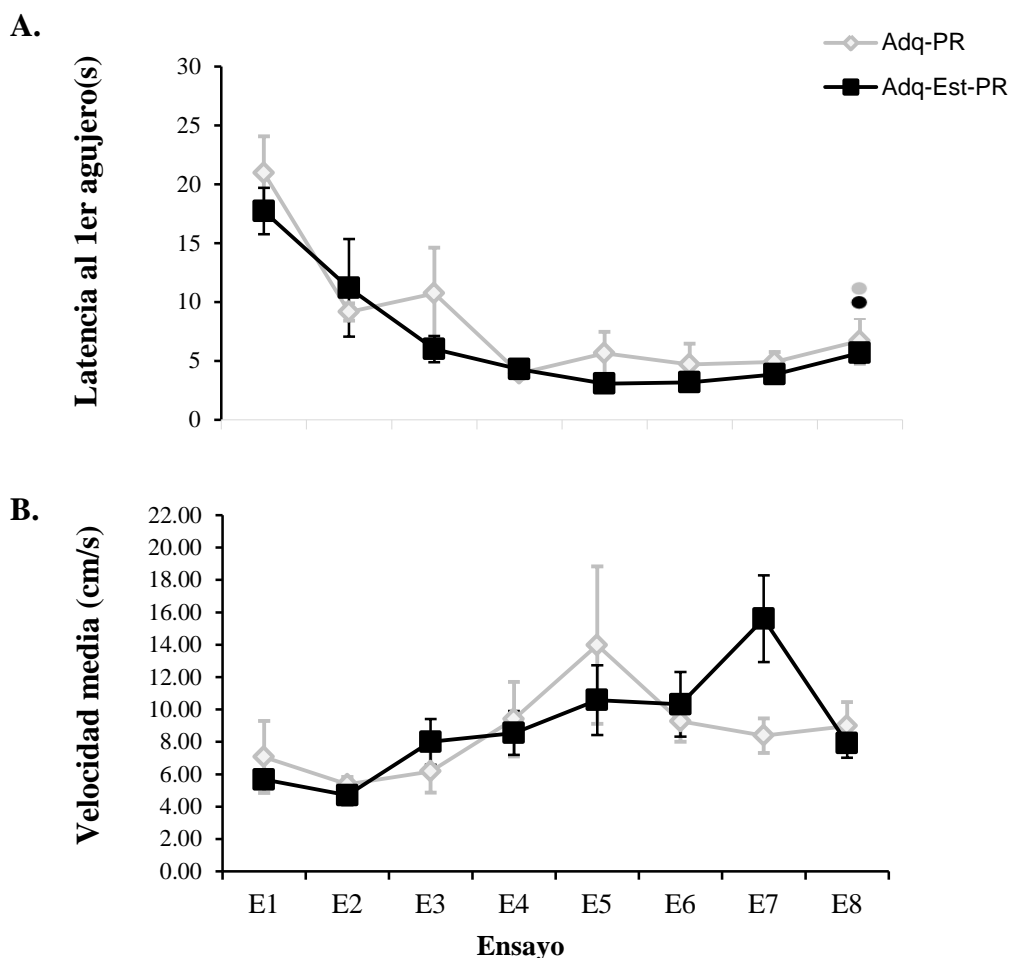
Al evaluar la distancia promedio entre los agujeros explorados y el agujero meta (Figura 10.C), se observó un efecto del ensayo ( $F_{(1,7)}=5.043$ ,  $p<0.001$ ), pero no un efecto del grupo ( $F_{(1,7)}=0.252$ ,  $p=0.625$ ) o de la interacción ( $F_{(1,7)}=0.578$ ,  $p=0.772$ ). Al finalizar el entrenamiento ambos grupos de animales recorrieron una distancia promedio a la meta significativamente diferente del nivel de azar, el cual fue dado por la ejecución de los animales durante en el primer ensayo de entrenamiento. (Anexo1.C).

Con relación a la distancia recorrida (Figura 10.D), se observó un efecto del ensayo ( $F_{(1,7)}=6.070$ ,  $p<0.001$ ), pero no un efecto del grupo ( $F_{(1,7)}=1.780$ ,  $p=0.207$ ) o de la interacción ( $F_{(1,7)}=0.134$ ,  $p=0.995$ ). En comparación con el desempeño inicial, al finalizar el entrenamiento ambos grupos de animales recorrieron una distancia significativamente menor en la plataforma. (Anexo1.D).

En la figura 11 se muestra el desempeño de los animales en las otras variables evaluadas durante la adquisición. En cuanto a la latencia al primer agujero (Figura 11.A), los análisis estadísticos mostraron un efecto del ensayo ( $F_{(1,7)}=15.623$ ,  $p<0.001$ ), pero no un efecto del grupo ( $F_{(1,7)}=1.567$ ,  $p=0.234$ ) o de la interacción ( $F_{(1,7)}=0.628$ ,  $p=0.732$ ). Al finalizar el entrenamiento se observó que en comparación con el ensayo inicial, ambos grupos de animales disminuyeron significativamente su latencia para iniciar la exploración (Anexo1.E).



**Figura 10:** Promedio ( $\pm$ SEM) durante los ensayos de adquisición en **A.** Latencia a meta. **B.** Errores ponderados. **C.** Distancia media a meta y **D.** Distancia total recorrida. El punto indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en el último ensayo de entrenamiento con relación al primero. (●): para el grupo control (Adq-PR) (●) para el grupo experimental (Adq-Est-PR). La línea punteada representa el nivel de azar.



**Figura 11:** Otras variables evaluadas durante la adquisición ( $\pm$ SEM) **A.** Latencia de inicio. **B.** Velocidad media. El punto indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en el último ensayo de entrenamiento con relación al primero. (●): para el grupo control (Adq-PR) (●) para el grupo experimental (Adq-Est-PR).

Finalmente, al evaluar la velocidad promedio de los animales a lo largo de los ensayos de entrenamiento (Figura 11.B), se observó un efecto del ensayo ( $F_{(1,7)} = 3.920$ ,  $p < 0.001$ ), pero no un efecto del grupo ( $F_{(1,7)} = 0.0640$ ,  $p = 0.804$ ) o de la interacción ( $F_{(1,7)} = 1.508$ ,  $p = 0.176$ ). Sólo en el ensayo 7 el grupo experimental (Adq-Est-PR) fue más veloz en comparación con su respectivo ensayo 1 y con el control (Adq-PR). Este resultado obedeció a que dentro del grupo experimental algunos animales presentaron una distancia recorrida muy pequeña, que al ser dividida por la latencia para el cálculo de la velocidad permitió alcanzar una diferencia estadística. Sin embargo, en los demás ensayos de entrenamiento no se observaron diferencias con relación al ensayo 1 correspondiente, ni

se observaron diferencias entre los grupos. Por estas razones se concluye que los animales mantuvieron una velocidad comparable, que tendió a aumentar hacia el final del entrenamiento pero que no fue significativamente diferente. (Anexo 1.F).

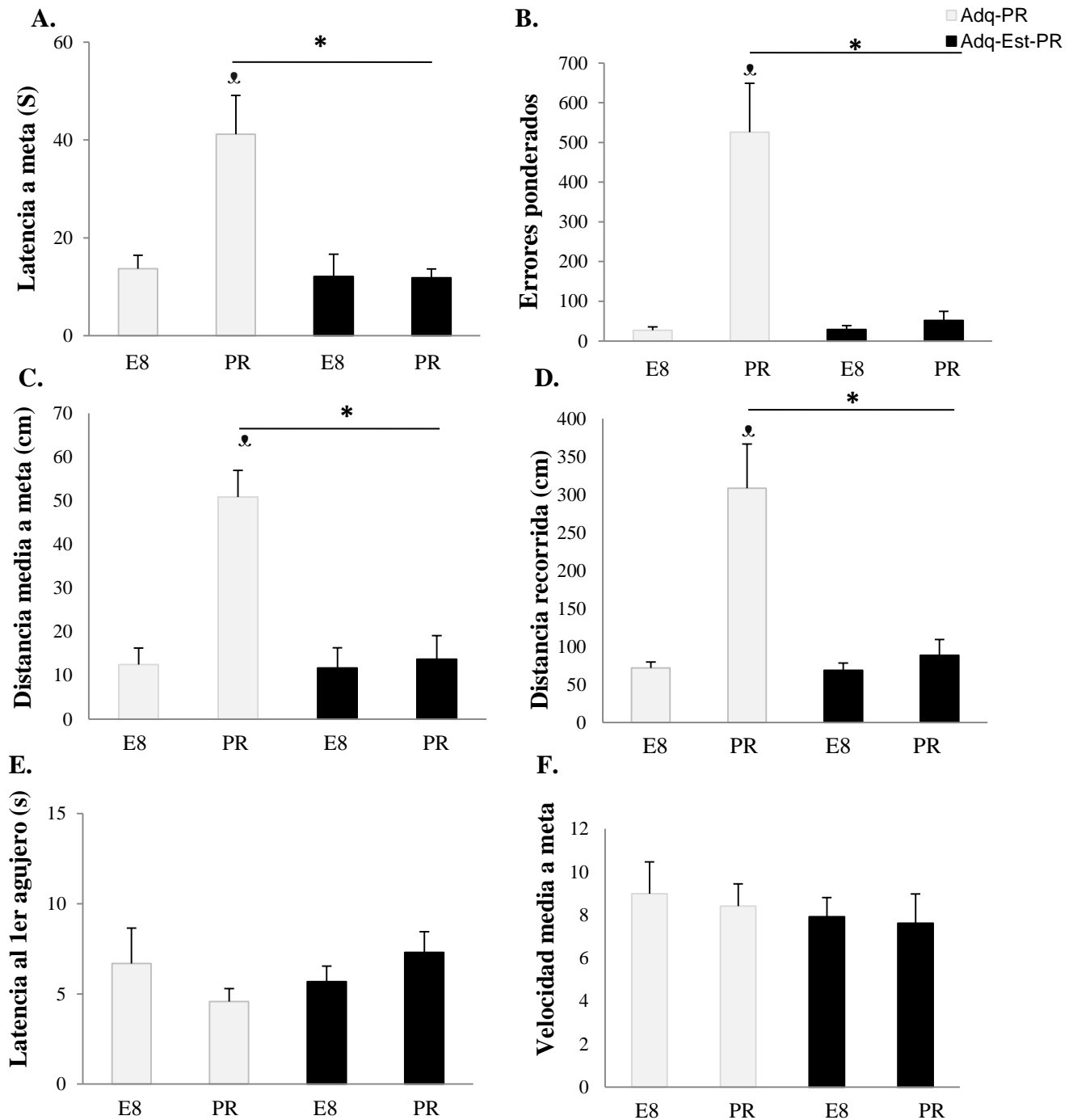
En conjunto, los datos obtenidos durante la fase de adquisición en el laberinto de Barnes demuestran que los animales no fueron significativamente diferentes antes del tratamiento y que el protocolo de entrenamiento seguido les permitió aprender la tarea de manera similar.

### 5.1.3 Prueba

En la figura 12 se presentan los datos de las variables primarias, es decir aquellas en las que se tuvo en cuenta la ejecución de los animales hasta la primera exploración al agujero meta.

En la figura 12.A se presenta la latencia de llegada a la meta. Según se observa, en comparación con el grupo control (Adq-PR) los animales con estrés (Adq-Est-PR) exhibieron una latencia a la meta significativamente menor ( $U_{(12)}=1.000$ ,  $p=0.001$ ). Un análisis adicional, en el que se comparó el desempeño de cada grupo durante la prueba, con su respectivo desempeño durante el último ensayo de adquisición, mostró que los animales control aumentaron significativamente su latencia a la meta respecto al día anterior ( $t_{(6)}=2.775$ ,  $p=0.032$ ); este efecto no se presentó en los animales con estrés ( $t_{(6)}=-0.0854$ ,  $p=0.935$ ). (Anexo 2A).

Al evaluar el número de errores ponderados (Figura 12.B), se observó que el grupo con estrés presentó significativamente menos errores que el grupo control ( $U_{(12)}=0.000$ ,  $p<0.001$ ); y en comparación con el último ensayo de adquisición respectivo, se encontró que el grupo control aumentó significativamente su nivel de error ( $t_{(6)}=4.069$ ,  $p=0.007$ ) a diferencia del grupo con estrés ( $t_{(6)}=1.255$ ,  $p=0.256$ ). (Anexo 2B).



**Figura 12:** Promedio ( $\pm$ SEM) en las variables primarias evaluadas durante la prueba de retención. **A.** Latencia a meta, **B.** Errores ponderados, **C.** Distancia media a meta, **D.** Distancia total recorrida, **E.** Latencia de inicio, **F.** Velocidad media (\*): Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos (control: Adq-PR; estrés Adq-Est-PR). (☠) diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en comparación con el último ensayo de adquisición respectivo.

Al analizar la distancia promedio entre los agujeros explorados y el agujero meta (Figura 12.C), se observó que el grupo con estrés recorrió una distancia promedio a la meta significativamente menor en comparación con el grupo control ( $t(12)= 4.553$ ,  $p<0.001$ ). Al comparar con el último ensayo de adquisición correspondiente, se observó que los animales control presentaron una distancia media a la meta significativamente mayor ( $W(6)= -26.000$ ,  $p= 0.031$ ) a diferencia de los animales con estrés ( $t(6)= 0.444$ ,  $p=0.672$ ). (Anexo 2C).

De la misma manera, al evaluar la distancia total recorrida en la plataforma (Figura 12.D), se encontró que el grupo con estrés recorrió una distancia significativamente menor en comparación con el grupo control ( $U(12)=3.000$ ,  $p= 0.004$ ). Adicionalmente, se observó que los animales control aumentaron significativamente su distancia recorrida con relación a su último ensayo de adquisición ( $t(6)= 3.747$ ,  $p= 0.010$ ) a diferencia de los animales con estrés ( $t(6)= 1.248$ ,  $p=0.259$ ). (Anexo 2D)

Con relación a la latencia al primer agujero (Figura 11.E), se observó que no hubo diferencias significativas entre los grupos ( $t(12)= -2.026$ ,  $p = 0.066$ ), ni diferencias respecto al último ensayo de adquisición correspondiente ( $t(6) = -0.991$ ,  $p=0.360$  para el grupo Adq-PR y  $t(6)=0.955$ ,  $p=0.376$  para el grupo Adq-Est-PR). (Anexo 2E).

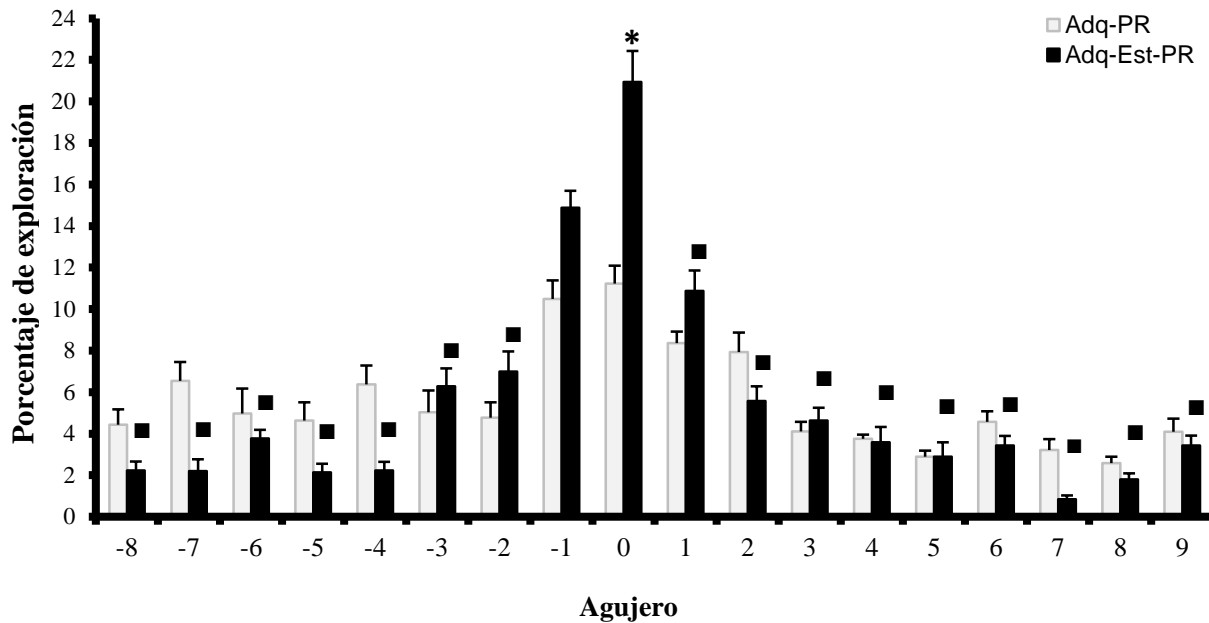
Lo mismo se observó al evaluar la velocidad promedio (Figura 12.F). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $t(12)=0.469$ ,  $p=0.647$ ), ni diferencias respecto al último ensayo de adquisición correspondiente ( $t(6)=-0.313$ ,  $p=0.765$  para el grupo Adq-PR y  $t(6)= -0.175$ ,  $p=0.867$  para el grupo Adq-Est-PR). (Anexo 2F).

Finalmente, para evaluar si los animales exhibieron una preferencia por explorar el agujero meta o el sector meta, y si fue diferente entre los grupos, se realizó un ANOVA de dos factores de medidas repetidas, con los factores grupo y agujero, o grupo y sector respectivamente y se tuvieron en cuenta los 4 minutos de la prueba.

En la Figura 13 se observa el porcentaje de exploración por agujero presentado por los animales. El análisis estadístico indicó un efecto del agujero ( $F_{(1,7)}= 9.751$ ,  $p<0.001$ ) y de la interacción ( $F_{(1,7)}= 1.955$ ,  $p=0.015$ ), pero no un efecto del grupo ( $F_{(1,7)}= 1.000$ ,



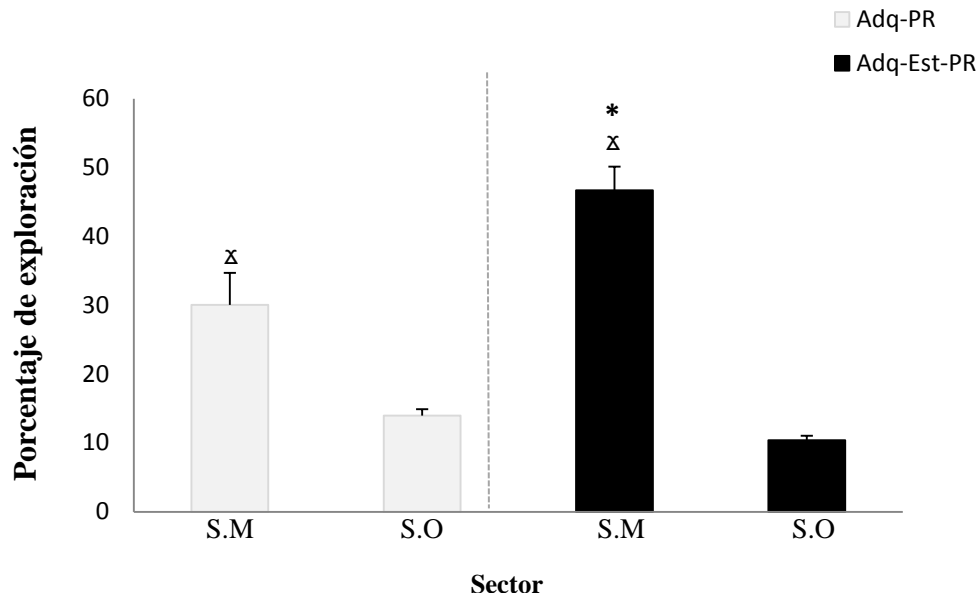
$p=0.337$ ). Sin embargo, los análisis post-hoc revelaron que a diferencia del grupo control, en el que no se observó una preferencia por algún agujero, el grupo con estrés prefirió explorar tanto el agujero meta como el agujero adyacente. Además la exploración en el agujero meta fue significativamente más alta en el grupo con estrés en comparación con el grupo control ( $t=4.192$ ,  $p<0.001$ ) (Anexo 3.A).



**Figura 13:** Porcentaje de exploración por agujero ( $\pm$ SEM) durante la prueba de retención. (\*): Diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.05$ ) entre los grupos (control: Adq-PR; estrés: Adq-Est-PR). El cuadrado indica diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.05$ ) respecto al agujero meta correspondiente (0). (■): para el grupo control; (■) para el grupo experimental.

Al hacer un análisis más general evaluando el porcentaje de exploración por sector (Figura 14) se observó un efecto del grupo ( $F_{(1,1)}= 7.771$ ,  $p=0.016$ ), del sector ( $F_{(1,1)}= 57.709$ ,  $p<0.001$ ) y de la interacción ( $F_{(1,1)}=8.579$ ,  $p=0.013$ ). El análisis post hoc reveló que ambos grupos prefirieron explorar el sector meta en comparación con el sector opuesto ( $t=3.300$ ,  $p=0.006$ , para el grupo Adq-PR; y  $t=7.443$ ,  $p<0.001$ , para el grupo Adq-Est-PR); sin embargo la exploración en el sector meta fue significativamente mayor para el

grupo con estrés ( $t=3.989$ ,  $p=0.001$ ). Al comparar la exploración en el sector opuesto entre los grupos no se observaron diferencias significativas ( $t=0.859$ ;  $p=0.400$ ). (Anexo 3.B).



**Figura 14:** Porcentaje de exploración por sector ( $\pm$ SEM) durante la prueba de retención. (\*): Diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.05$ ) entre los grupos (control: Adq-PR; estrés: Adq-Est-PR). (x) diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.05$ ) entre los sectores por grupo.

En conjunto, los datos obtenidos durante la fase de prueba en el laberinto de Barnes indican que el estrés inmediatamente después del entrenamiento facilitó la consolidación de la memoria espacial; pues en comparación con los animales entrenados que no fueron sometidos al estrés, los animales sometidos al estrés inmediatamente después del entrenamiento encontraron más rápido el agujero meta, llegaron de forma más directa y exhibieron una cantidad de error menor durante la prueba. Asimismo, no mostraron pérdida de información 24h después del entrenamiento, lo que sí se observó en los animales sin estrés; y finalmente mostraron una mayor preferencia por la exploración del agujero meta y del sector meta.

## **5.2 Efectos del estrés por restricción motora, el entrenamiento en el laberinto de Barnes y el estrés administrado durante la consolidación de la memoria sobre los niveles de H3K14ac**

Para evaluar los efectos del estrés por restricción motora, el entrenamiento en el laberinto de Barnes y el estrés administrado durante la consolidación de la memoria espacial sobre el nivel de H3K14ac, 24 ratas Wistar macho fueron distribuidas aleatoriamente en los siguientes grupos: Basal (n=4), Sólo estrés (Est) (n=4), Sólo adquisición (Adq) (n=8) y Estrés inmediatamente después de la adquisición (Adq-Est) (n=8).

Los dos últimos grupos fueron entrenados en el laberinto de Barnes e inmediatamente después del último ensayo de adquisición la mitad de los sujetos fue expuesta a estrés durante 1h y la otra mitad retornada a su caja hogar. 2h después del último ensayo de adquisición (o 1h después del estrés) los animales fueron perfundidos y se obtuvo la muestra de tejido cerebral.

Durante la adquisición se descartaron 4 animales por caerse dos veces seguidas de la plataforma, por esa razón el número final de animales en los grupos con entrenamiento es 6.

### **5.2.1 Adquisición**

Antes de realizar el procedimiento de inmunohistoquímica para la detección de H3K14ac se corroboró que los animales entrenados (Grupos Adq y Adq-Est) hubieran aprendido la tarea. Los datos de la adquisición se presentan discriminados para cada grupo con el fin de mostrar que no fueron significativamente diferentes a nivel comportamental antes del tratamiento.

Se realizó una ANOVA de dos factores de medidas repetidas; los factores seleccionados fueron grupo y ensayo; y se contrastó el desempeño de los animales con

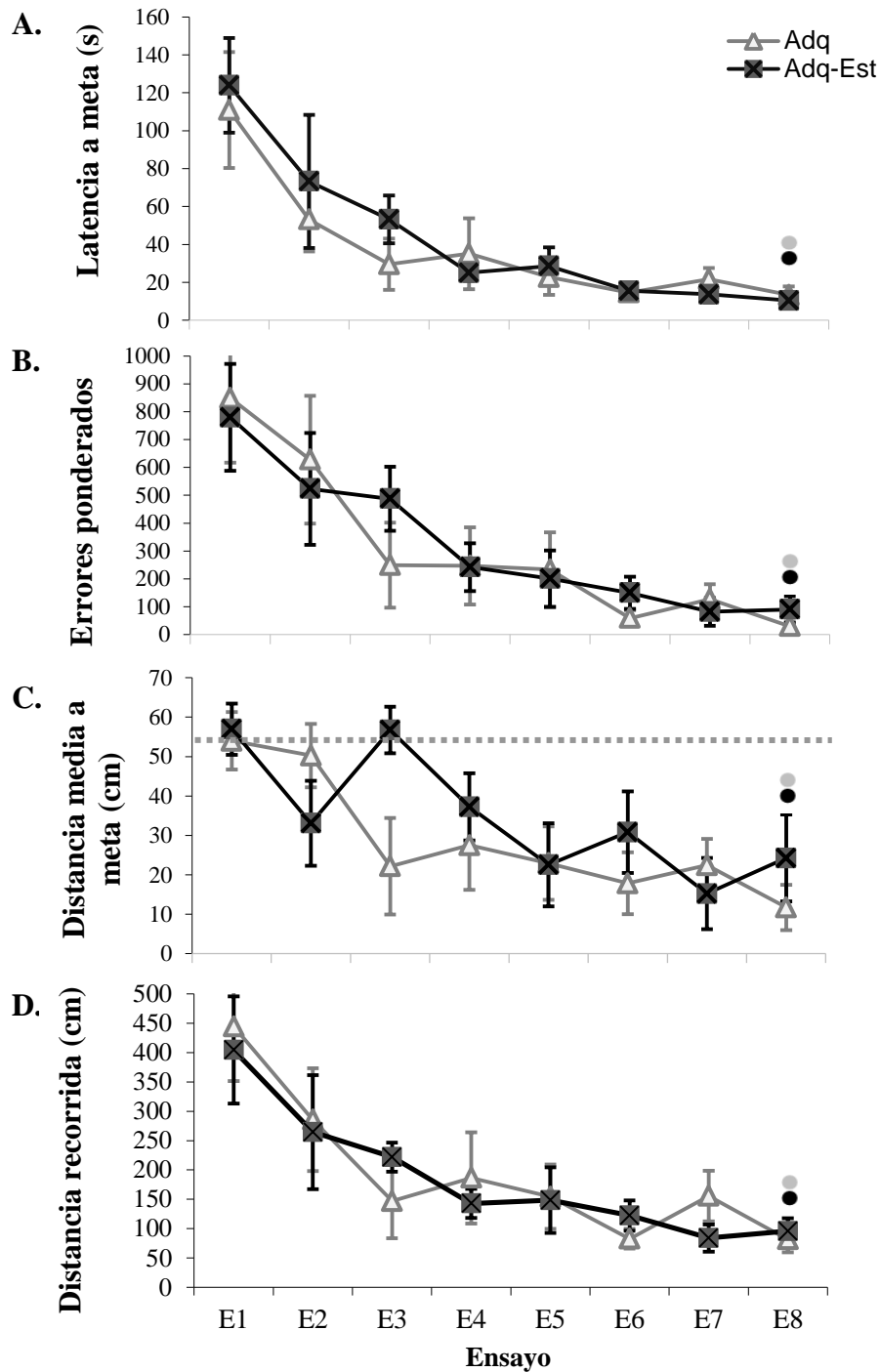
relación al primer ensayo de adquisición correspondiente. En las gráficas, para cada grupo se señalan las diferencias entre el primer y el último ensayo de entrenamiento.

En la Figura 15.A, se presenta la latencia de llegada a la meta a lo largo del entrenamiento. De acuerdo con los análisis estadísticos, se observó un efecto del ensayo ( $F_{(1,7)} = 9.930$ ,  $p < 0.001$ ), pero no un efecto del grupo ( $F_{(1,7)} = 0.406$ ,  $p = 0.538$ ) o de la interacción ( $F_{(1,7)} = 0.317$ ,  $p = 0.944$ ). Al finalizar el entrenamiento se observó que en comparación con el desempeño inicial ambos grupos de animales disminuyeron significativamente su latencia para encontrar la meta. (Anexo 4.A).

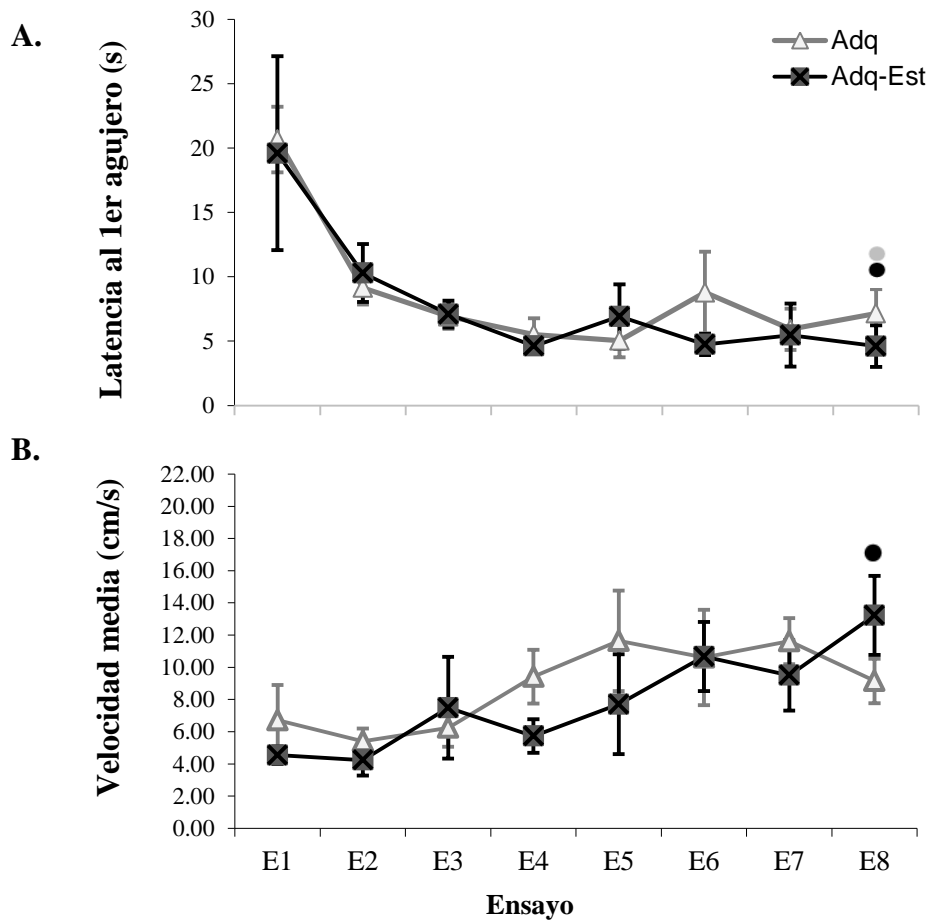
Al evaluar la frecuencia de errores ponderados a lo largo de los ensayos de entrenamiento (Figura 15.B), se observó un efecto del ensayo ( $F_{(1,7)} = 8.088$ ,  $p < 0.001$ ) pero no un efecto del grupo ( $F_{(1,7)} = 0.0490$ ,  $p = 0.829$ ) o de la interacción ( $F_{(1,7)} = 0.353$ ,  $p = 0.926$ ). Al finalizar el entrenamiento se observó que en comparación con el desempeño inicial, ambos grupos de animales redujeron significativamente la cantidad de errores cometidos. (Anexo 4.B).

Respecto a la distancia promedio entre los agujeros explorados y el agujero meta (Figura 15.C), se observó un efecto del ensayo ( $F_{(1,7)} = 4.635$ ,  $p < 0.001$ ), pero no un efecto del grupo ( $F_{(1,7)} = 1.102$ ,  $p = 0.318$ ) o de la interacción ( $F_{(1,7)} = 1.608$ ,  $p = 0.147$ ). Al finalizar el entrenamiento ambos grupos de animales recorrieron una distancia promedio a la meta significativamente diferente del nivel de azar, el cual fue dado por la ejecución de los animales durante en el primer ensayo de entrenamiento. (Anexo 4.C).

Con relación a la distancia recorrida (Figura 15.D), se observó un efecto del ensayo ( $F_{(1,7)} = 8.131$ ,  $p < 0.001$ ), pero no un efecto del grupo ( $F_{(1,7)} = 0.0278$ ,  $p = 0.871$ ) o de la interacción ( $F_{(1,7)} = 0.376$ ,  $p = 0.914$ ). En comparación con el desempeño inicial, al finalizar el entrenamiento ambos grupos de animales recorrieron una distancia significativamente menor en la plataforma. (Anexo 4.D).



**Figura 15:** Promedio ( $\pm$ SEM) durante los ensayos de adquisición en **A.** Latencia a meta. **B.** Errores ponderados. **C.** Distancia media a meta y **D.** Distancia total recorrida. El punto indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en el último ensayo de entrenamiento con relación al primero. (●): para el grupo control (Adq) (●) para el grupo experimental (Adq-Est). La línea punteada representa el nivel de azar.



**Figura 16:** Otras variables evaluadas durante la adquisición ( $\pm$ SEM) **A.** Latencia de inicio. **B.** Velocidad media. El punto indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en el último ensayo de entrenamiento con relación al primero. (●): para el grupo control (Adq) (●) para el grupo experimental (Adq-Est).

En la figura 16. Se muestra el desempeño de los animales en las otras variables evaluadas durante la adquisición. En cuanto a la latencia al primer agujero (Figura 16.A), los análisis estadísticos mostraron un efecto del ensayo ( $F_{(1,7)} = 9.033$ ,  $p < 0.001$ ), pero no un efecto del grupo ( $F_{(1,7)} = 0.140$ ,  $p = 0.716$ ) o de la interacción ( $F_{(1,7)} = 0.331$ ,  $p = 0.937$ ). Al finalizar el entrenamiento se observó que en comparación con el ensayo inicial, ambos grupos de animales disminuyeron significativamente su latencia para iniciar la exploración (Anexo4.E).

Finalmente, al evaluar la velocidad promedio de los animales a lo largo de los ensayos de entrenamiento (Figura16.B), se observó un efecto del ensayo ( $F_{(1,7)} = 3.238$ ,  $p = 0.005$ ), pero no un efecto del grupo ( $F_{(1,7)} = 0.444$ ,  $p = 0.520$ ) o de la interacción ( $F_{(1,7)} =$

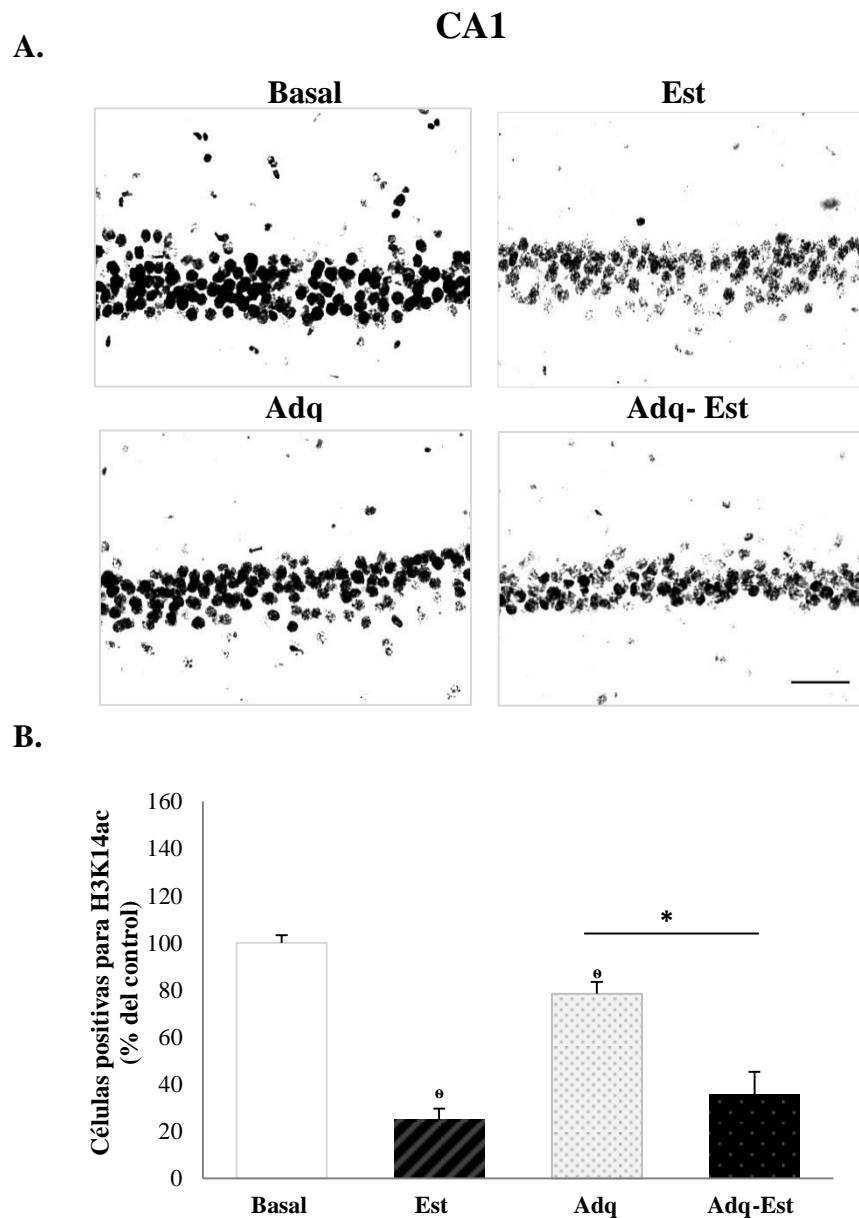
0.957,  $p=0.469$ ). (Anexo4.E). Sólo en el ensayo 8 el grupo experimental (Adq-Est) fue más veloz en comparación con su respectivo ensayo 1, sin embargo no fue diferente del grupo control(Adq-Est) en este o en cualquier ensayo. Por esta razón se concluye que los animales mantuvieron una velocidad comparable, que tendió a aumentar hacia el final del entrenamiento pero que en general no fue significativamente diferente.

En conjunto, los datos obtenidos durante la fase de adquisición en el laberinto de Barnes demuestran que los animales no fueron significativamente diferentes antes del tratamiento y que el protocolo de entrenamiento seguido les permitió aprender la tarea de manera similar.

### **5.2.2 Análisis del nivel de H3K14ac por inmunohistoquímica**

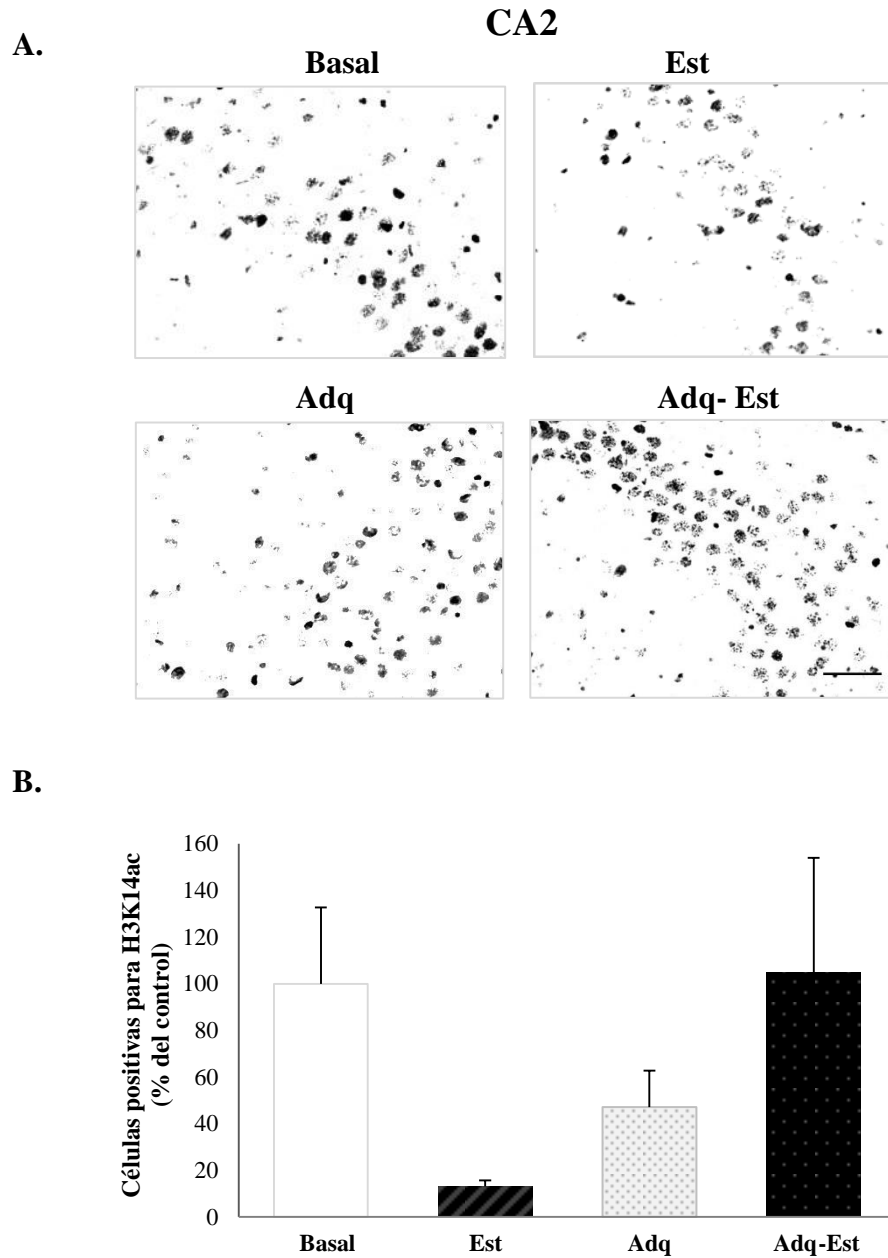
El porcentaje de células inmunoreactivas para H3K14ac se analizó con un ANOVA de dos factores para grupos independientes, los factores seleccionados fueron adquisición y estrés y se tuvieron en cuenta las siguientes comparaciones: 1) grupo basal y grupo con sólo estrés (Basal vs. Est) para evaluar el efecto del estrés por restricción motora, 2) grupo basal y grupo con sólo adquisición (Basal vs. Adq) para evaluar el efecto del entrenamiento en el laberinto de Barnes y 3) grupo con sólo adquisición y grupo con estrés administrado inmediatamente después de la adquisición (Adq vs. Adq-Est) para evaluar el efecto del estrés durante la consolidación de la memoria.

En la figuras 17, 18 y 19 se observa el porcentaje de células inmunoreactivas para H3K14ac en las distintas regiones del hipocampo. En la figura 17 se observa el área CA1; de acuerdo con los análisis estadísticos se observó un efecto del estrés ( $F_{(1,1)}=79.722$ ,  $p<0.001$ ) y de la interacción ( $F_{(1,1)}=5.971$ ,  $p <0.035$ ), pero no un efecto de la adquisición ( $F_{(1,1)}= 0.684$ ,  $p=0.428$ ). Sin embargo, el análisis post-hoc reveló que a diferencia del grupo basal, los animales con sólo adquisición exhibieron una menor cantidad de células inmunoreactivas para H3K14ac ( $t=2.313$ ,  $p=0.043$ ), al igual que los animales con sólo estrés ( $t=8.041$ ,  $p<0.001$ ). Al comparar a entre los animales con sólo adquisición y los animales con estrés inmediatamente después de la adquisición, se observó que los últimos presentaron significativamente menos células inmunoreactivas para H3K14ac ( $t=4.586$ ,  $p=0.001$ ). (Anexo 5.A).

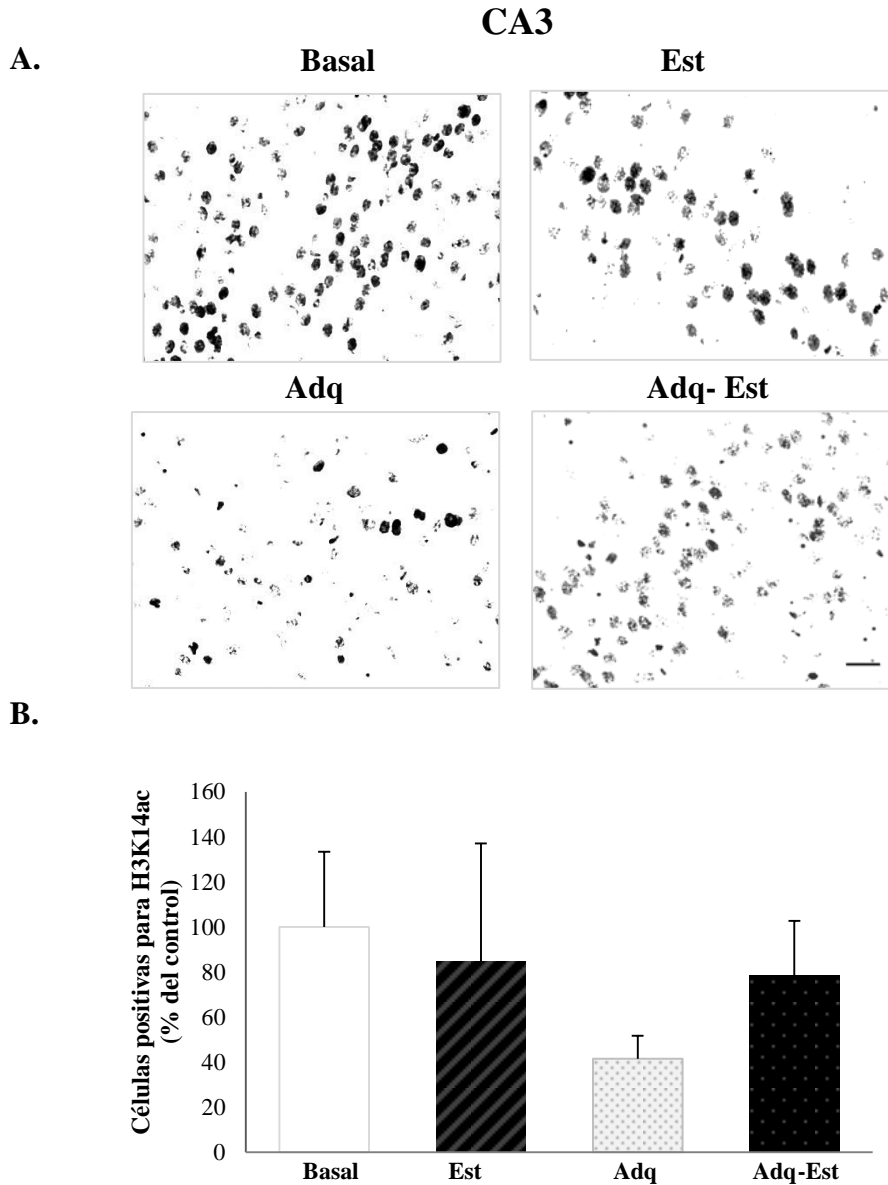


**Figura 17:** Células inmunoreactivas para H3K14ac ( $\pm$ SEM) en el área CA1 del hipocampo **A.** Imágenes representativas por grupo. **B.** Cuantificación. ( $\theta$ ) diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con relación al grupo Basal (control). (\*): Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo Adq y el grupo Adq-Est. Barra de escala 50 $\mu$ m.





**Figura 18:** Células inmunoreactivas para H3K14ac ( $\pm$ SEM) en el área CA2 del hipocampo **A.** Imágenes representativas por grupo. **B.** Cuantificación. ( $\theta$ ) diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con relación al grupo Basal (control). (\*): Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo Adq y el grupo Adq-Est. Barra de escala 50 $\mu$ m.



**Figura 19:** Células inmunoreactivas para H3K14ac ( $\pm$ SEM) en el área CA3 del hipocampo **A.** Imágenes representativas por grupo. **B.** Cuantificación. ( $\ominus$ ) diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con relación al grupo Basal (control). (\*): Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo Adq y el grupo Adq-Est. Barra de escala  $50\mu\text{m}$ .

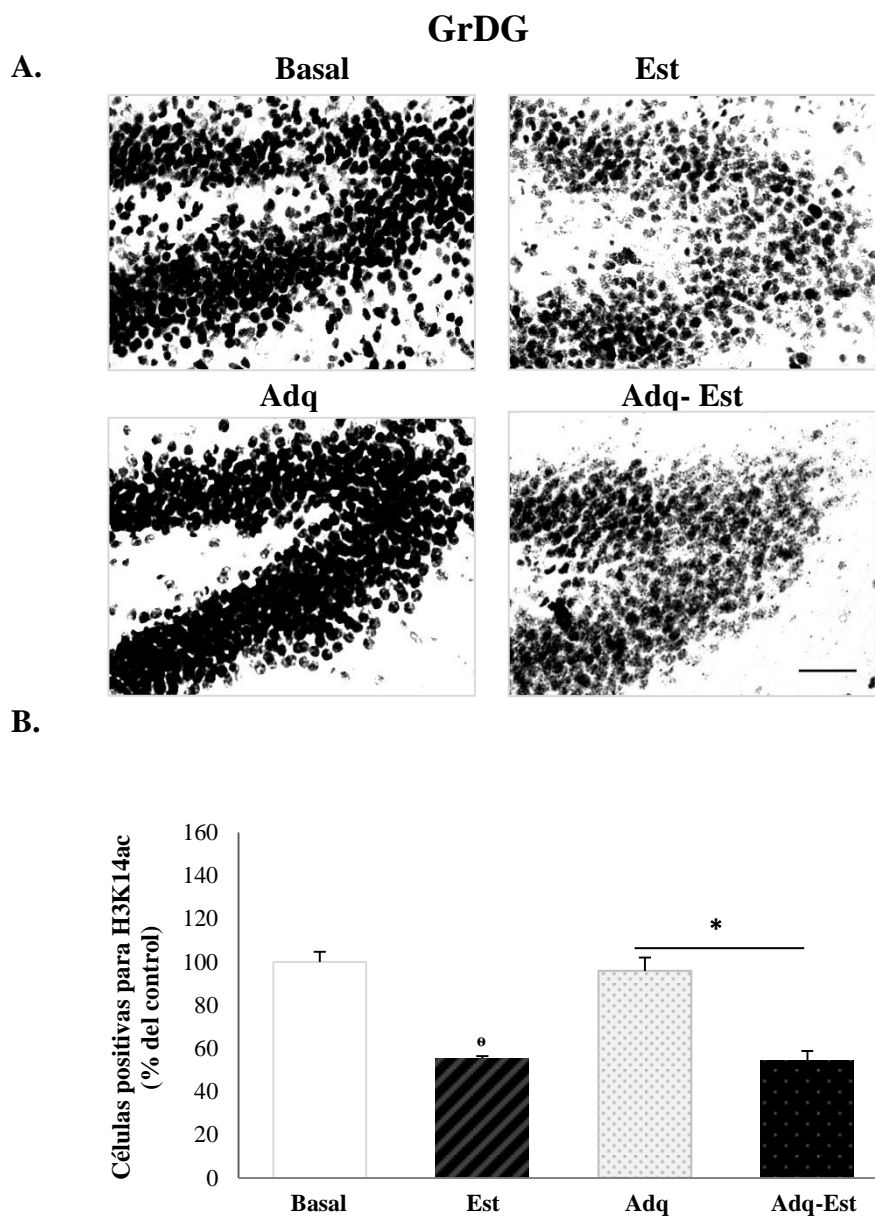
En la figura 18 se presenta el porcentaje de células inmunoreactivas para H3K14ac en el área CA2 del hipocampo. De acuerdo con los análisis estadísticos no se observó un efecto significativo de la adquisición ( $F_{(1,1)} = 0.292$ ,  $p = 0.601$ ), del estrés ( $F_{(1,1)} = 0.170$ ,

$p=0.689$ ) o de la interacción ( $F_{(1,1)}= 4.099$ ,  $p=0.070$ ). Tampoco se observaron diferencias significativas al analizar separadamente las tendencias observadas (Basal vs Est,  $t=2.245$ ,  $p=0.075$ ; Basal vs Adq,  $t=1.297$ ,  $p= 0.251$ ; y Adq vs Adq-Est,  $t=-0.960$ ,  $p=0.381$ ). (Anexo 5. B).

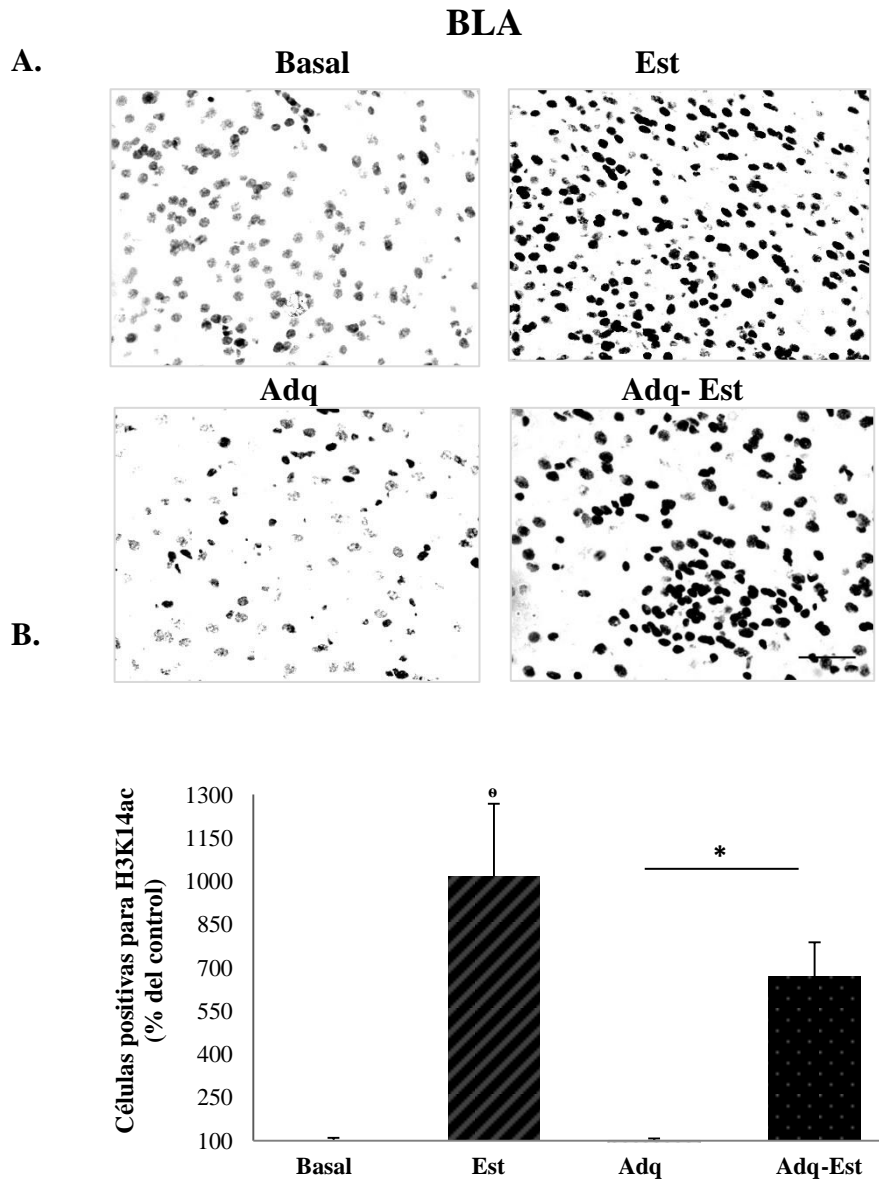
Igualmente, al evaluar el área CA3 del hipocampo (Figura 19) no se encontraron efectos significativos de la adquisición ( $F_{(1,1)}= 0.965$ ,  $p=0.349$ ), el estrés ( $F_{(1,1)}= 0.0109$ ,  $p=0.748$ ) o de la interacción ( $F_{(1,1)}= 0.623$ ,  $p=0.448$ ); y tampoco se observaron diferencias significativas al analizar separadamente las tendencias observadas (Basal vs Adq,  $t=1.446$ ,  $p=0.208$ ; y Adq vs Adq-Est,  $U=9.000$ ,  $p=0.400$ ). (Anexo 5. C).

En la figura 20 se muestra el porcentaje de células inmunoreactivas para H3K14ac en la capa granular del giro dentado (GrDG). De acuerdo con los análisis estadísticos se observó un efecto del estrés ( $F_{(1,1)}= 86.242$ ,  $p<0.001$ ) pero no un efecto de la adquisición ( $F_{(1,1)}= 0.304$ ,  $p=0.594$ ) o de la interacción ( $F_{(1,1)}= 0.122$ ,  $p=0.734$ ). El análisis post-hoc reveló que los animales con sólo estrés exhibieron significativamente menos células inmunoreactivas para H3K14ac en comparación con el grupo basal ( $t=6.814$ ,  $p<0.001$ ); y no se observaron diferencias entre el grupo basal y el grupo con sólo adquisición ( $t=0.637$ ,  $p=0.539$ ). Al comparar entre los animales con sólo adquisición y los animales con estrés inmediatamente después de la adquisición, se encontró que los últimos presentaron significativamente menos células inmunoreactivas para H3K14ac ( $t=6.320$ ,  $p<0.001$ ). (Anexo 5.D).

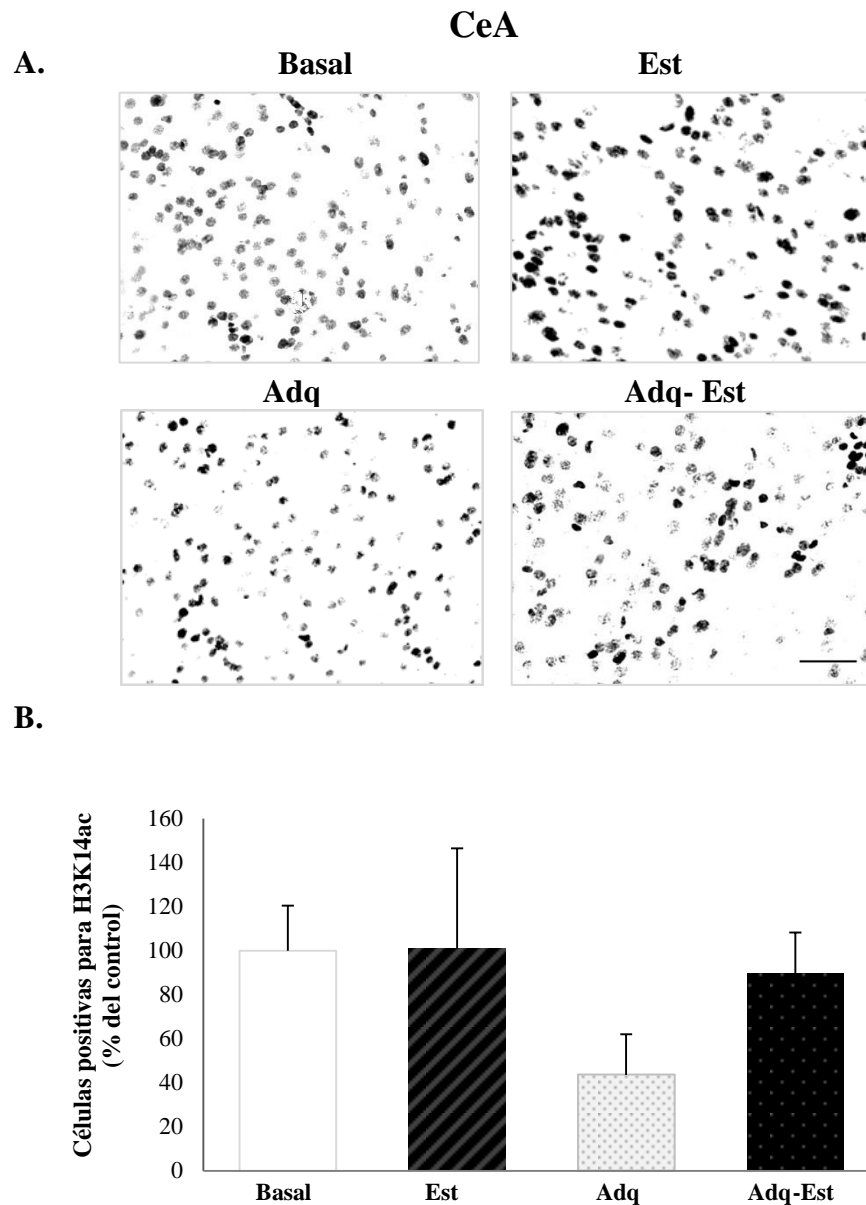
En la figura 21 se observa el porcentaje de células inmunoreactivas para H3K14ac en el núcleo basolateral de la amígdala (BLA). De acuerdo con los análisis estadísticos se observó un efecto del estrés ( $F_{(1,1)}=41.309$ ,  $p<0.001$ ) pero no un efecto de la adquisición ( $F_{(1,1)}= 2.357$ ,  $p=0.156$ ) o de la interacción ( $F_{(1,1)}= 2.115$ ,  $p=0.176$ ). El análisis post-hoc reveló que los animales con sólo estrés exhibieron mayores niveles de H3K14ac en comparación con el grupo basal ( $t=5.573$ ,  $p<0.001$ ); y no se observaron diferencias entre el grupo basal y el grupo con sólo adquisición ( $t=0.0617$ ,  $p=0.952$ ). Asimismo, se observó que los animales con estrés inmediatamente después de la adquisición presentaron una cantidad de células inmunoreactivas para H3K14ac significativamente mayor en comparación con los animales con sólo adquisición ( $t=3.516$ ,  $p=0.006$ ) (Anexo 5.E).



**Figura 20:** Células inmunoreactivas para H3K14ac ( $\pm$ SEM) en el giro dentado **A.** Imágenes representativas por grupo. **B.** Cuantificación. ( $\ominus$ ) diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con relación al grupo Basal (control). (\*): Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo Adq y el grupo Adq-Est. Barra de escala 50 $\mu$ m.



**Figura 21:** Células inmunoreactivas para H3K14ac ( $\pm$ SEM) en el núcleo basolateral de la amígdala (BLA) **A.** Imágenes representativas por grupo. **B.** Cuantificación. ( $\theta$ ) diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con relación al grupo Basal (control). (\*): Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo Adq y el grupo Adq-Est. Barra de escala 50 $\mu$ m.



**Figura 22:** Células inmunoreactivas para H3K14ac ( $\pm$ SEM) en el núcleo central de la amígdala (CeA) A. Imágenes representativas por grupo. B. Cuantificación. (e) diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con relación al grupo Basal (control). (\*): Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo Adq y el grupo Adq-Est. Barra de escala 50 $\mu$ m.

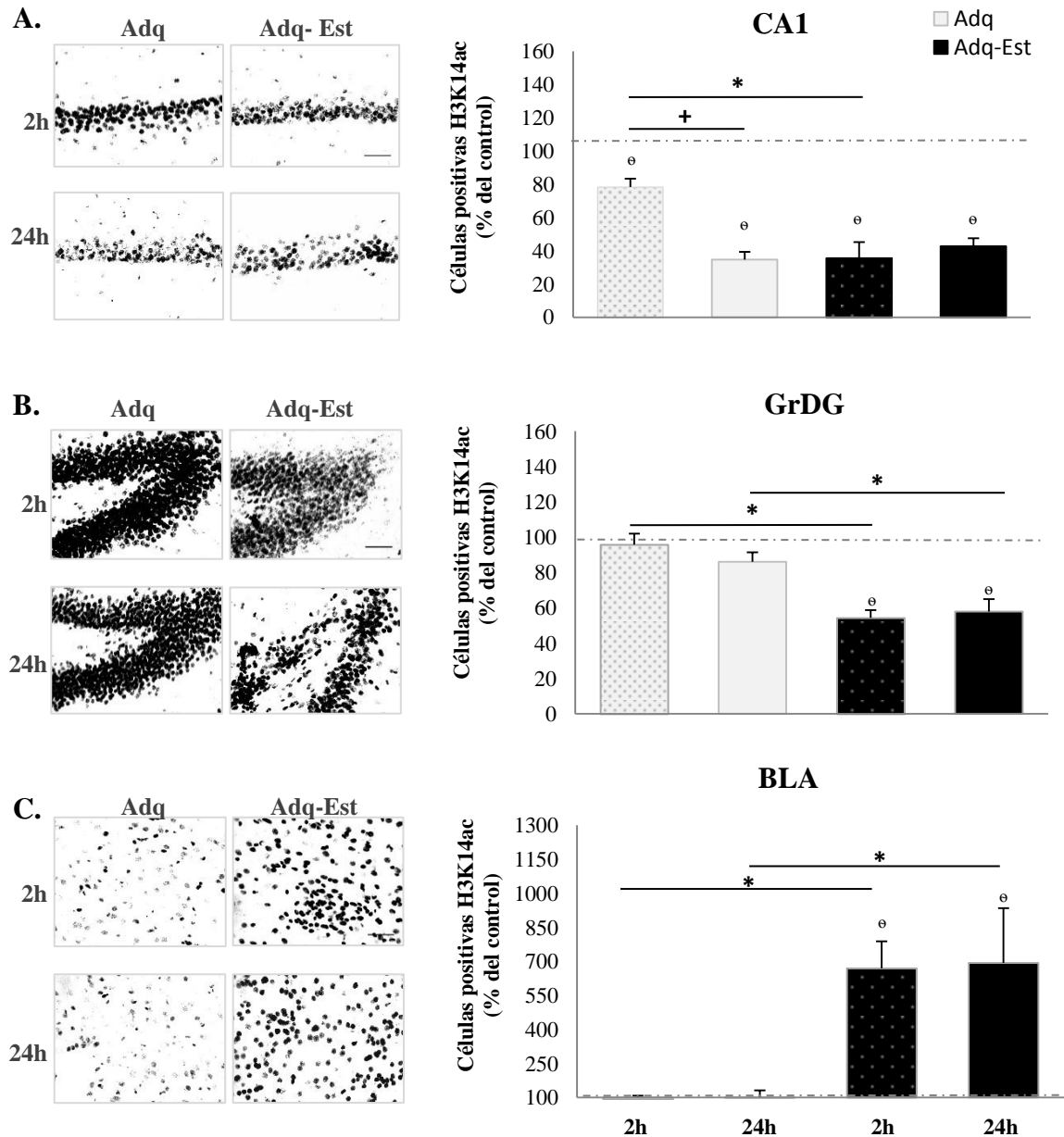
Finalmente, en la figura 22 se observa el porcentaje de células inmunoreactivas para H3K14ac en el núcleo central de la amígdala (CeA). De acuerdo con los análisis estadísticos no se observó un efecto significativo de la adquisición ( $F_{(1,1)}= 1.688$ ,  $p=0.223$ ), del estrés ( $F_{(1,1)}= 0.802$ ,  $p=0.391$ ) o de la interacción ( $F_{(1,1)}= 0.730$ ,  $p=0.413$ ); y tampoco se observaron diferencias significativas al analizar separadamente las tendencias observadas (Basal vs Adq,  $U=2.000$ ,  $p=0.114$ ; y Adq vs Adq-Est,  $t=1.710$ ,  $p=0.148$ ). (Anexo 5. F).

### **5.2.3 Análisis del nivel de H3K14ac 24h después del entrenamiento o del estrés administrado durante la consolidación de la memoria**

Para evaluar si los cambios observados a las 2h post-entrenamiento variaron 24h después, se decidió realizar una comparación adicional entre el porcentaje de células inmunoreactivas para H3K14ac de los grupos con entrenamiento sin prueba (i.e. Grupos Adq y Adq-Est en los que la muestra se tomó 2h después de la adquisición) y los grupos con entrenamiento y prueba (i.e. Grupos Adq-PR y Adq-Est-PR, en los que la muestra se tomó 24h después de la adquisición).

Aunque idealmente para estas comparaciones ninguno de los grupos debió ser expuesto a una prueba de retención, se aprovecharon los cerebros de los animales con prueba porque la duración de la misma (4min) y el tiempo de obtención del tejido (inmediatamente después) fueron lo suficientemente cortos para excluir una influencia de la prueba sobre los niveles de H3K14ac (Chandramohan, Droste, Arthur et al., 2008), de modo que los resultados observados podrían atribuirse al entrenamiento o al estrés que tuvo lugar 24h antes.

Para realizar las comparaciones entre los grupos se utilizó un ANOVA de un factor para grupos independientes (incluyendo al grupo basal) y se analizaron las estructuras previamente mencionadas. Los grupos Adq y Adq-Est fueron designados como Adq 2h y Adq-Est 2h respectivamente; y los grupos Adq-PR y Adq-Est-PR fueron designados como Adq 24h y Adq-Est 24h respectivamente. En la Figura 21 se presentan los resultados obtenidos en las estructuras donde se hallaron diferencias significativas; el análisis estadístico de las demás estructuras analizadas se presenta en el anexo 6.A.



**Figura 23:** Células inmunoreactivas para H3K14ac 2h y 24h después del entrenamiento ( $\pm$ SEM) en **A.** Área CA1 del hipocampo, **B.** Capa granular del giro dentado GrDG, y **C.** Núcleo basolateral de la amígdala (BLA). Izquierda: imágenes representativas por grupo; derecha: Cuantificación. ( $\ominus$ ) diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con relación al grupo basal (control), representado en la línea punteada. (\*): Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos. (+): Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) intra grupo. Barra de escala 50 $\mu$ m.



En la parte A de la figura 23 se observa el área CA1 del hipocampo; en esta estructura el análisis estadístico indicó diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(4)}=24.267$ ,  $p<0.001$ ). Al realizar el análisis post-hoc se observó que en comparación con el grupo basal, los grupos con adquisición y con estrés inmediatamente después de la adquisición tuvieron un porcentaje de células inmunoreactivas para H3K14ac significativamente menor tanto a las 2h como a las 24h después del entrenamiento (Basal vs Adq 2h  $t=2.423$ ,  $p=0.0307$ ; Basal vs Adq 24h  $t=7.931$ ,  $p<0.001$ ; Basal vs Adq-Est 2h  $t=7.808$ ,  $p<0.001$  y Basal vs Adq-Est 24h  $t=6.430$ ,  $p<0.001$ ). (Anexo 6.B).

Asimismo se observó que a las 2 h post-entrenamiento los animales con estrés inmediatamente después de la adquisición presentaron un porcentaje de células inmunoreactivas para H3K14ac significativamente menor en comparación con los animales entrenados que no tuvieron estrés ( $t=4.806$ ,  $p<0.001$ ); sin embargo a las 24h post-entrenamiento esas diferencias no fueron observadas ( $t=0.912$ ,  $p=0.378$ ).

Al comparar dentro de los grupos con adquisición sin exposición al estrés, se observó que a las 24h el porcentaje de células inmunoreactivas para H3K14 fue significativamente menor en comparación con el observado a las 2h post-entrenamiento ( $t=4.919$ ,  $p<0.001$ ). Estas diferencias no se observaron dentro de los grupos con estrés inmediatamente después de la adquisición ( $t=0.799$ ,  $p=0.439$ ).

En la parte B de la figura 23 se observa la capa granular del giro dentado (GrDG); en esta estructura el análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(4)}=15.378$ ,  $p<0.001$ ). Al realizar el análisis post-hoc se observó que en comparación con el grupo basal, sólo los grupos con estrés inmediatamente después de la adquisición tuvieron un porcentaje de células inmunoreactivas para H3K14ac significativamente menor tanto a las 2h como a las 24h después del entrenamiento (Basal vs Adq 2h,  $t=0.529$ ,  $p=0.606$ ; Basal vs Adq 24h,  $t=1.914$ ,  $p=0.0779$ ; Basal vs Adq-Est 2h,  $t=6.245$ ,  $p<0.001$  y Basal vs Adq-Est 24h,  $t=5.331$ ,  $p<0.001$ ). (Anexo 6.C).

Asimismo se observó que los animales con estrés inmediatamente después de la adquisición presentaron un porcentaje de células inmunoreactivas para H3K14ac significativamente menor en comparación con los animales entrenados sin exposición al

estrés; tanto a las 2h ( $t=5.252$ ,  $p<0.001$ ) como a las 24h post-entrenamiento ( $t=3.559$ ,  $p<0.001$ ).

Al comparar dentro de los grupos con adquisición sin exposición al estrés no se observaron diferencias en el porcentaje de células inmunoreactivas para H3K14 a las 24h del entrenamiento en comparación con el porcentaje observado a las 2h ( $t=1.243$ ,  $p=0.236$ ) y tampoco se observaron diferencias dentro de los grupos con estrés inmediatamente después de la adquisición ( $t=0.451$ ,  $p=0.660$ ).

Finalmente, en la parte C de la figura 23 se observa el número de células inmunoreactivas para H3K14ac en el núcleo basolateral de la amígdala (BLA). El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(4)}= 9.929$ ,  $p<0.001$ ) y el análisis post- hoc reveló que en comparación con el grupo basal, sólo los grupos con estrés tuvieron un porcentaje de células inmunoreactivas para H3K14ac significativamente mayor tanto a las 2h como a las 24h post-entrenamiento (Basal vs Adq 2h,  $t=0.0717$ ,  $p=0.944$ ; Basal vs Adq 24h  $t=0.00896$ ,  $p=0.993$ ; Basal vs Adq-Est 2h  $t=4.016$ ,  $p=0.001$ ; y Basal vs Adq-Est 24h  $t=4.182$ ,  $p=0.001$ ).

Asimismo se observó que los animales con estrés inmediatamente después de la adquisición presentaron un porcentaje de células inmunoreactivas para H3K14ac significativamente mayor en comparación con los animales entrenados sin exposición al estrés; tanto a las 2 h ( $t=4.083$ ,  $p=0.001$ ) como a las 24h ( $t=4.191$ ,  $p=0.001$ ) después del entrenamiento.

Al comparar dentro de los grupos con adquisición no se observaron diferencias en el porcentaje de células inmunoreactivas para H3K14ac a las 24h del entrenamiento, en comparación con el porcentaje el observado a las 2h ( $t=0.0627$ ,  $p=0.951$ ); ni se observaron diferencias dentro de los grupos con estrés inmediatamente después de la adquisición ( $t=0.155$ ,  $p=0.879$ ).



## **6. Discusión y conclusiones**

El presente trabajo tuvo como objetivos evaluar los efectos del estrés agudo sobre la consolidación de la memoria espacial y su posible relación con cambios en la acetilación de la histona 3 cerebral; evaluar los efectos del entrenamiento en una tarea espacial alternativa al laberinto acuático de Morris sobre la acetilación de dicha histona y evaluar los efectos de un estresor agudo moderado, alternativo al nado forzado o a la novedad sobre el mismo marcador. Para realizar dichas evaluaciones se plantearon dos experimentos, cuyos resultados se resumen y discuten a continuación.

### **6.1 Efectos del estrés por restricción de movimientos sobre la consolidación de la memoria espacial a largo plazo**

En el primer experimento dos grupos de ratas fueron entrenados en la tarea del laberinto de Barnes; inmediatamente después uno de ellos fue sometido a estrés por restricción de movimientos y 24h más tarde se comparó su desempeño en una prueba de retención. Los resultados mostraron que los animales no fueron significativamente diferentes antes del estrés y que aprendieron eficientemente la tarea, encontrando la meta cada vez más rápido y limitando progresivamente su exploración a esta o a agujeros cercanos a la misma. Estos resultados son consistentes con el cambio de estrategia de navegación que tiene lugar durante el aprendizaje y el establecimiento de la memoria espacial (i.e el cambio de una estrategia aleatoria a una estrategia de lugar) (Harrison, et al., 2006), asimismo son consistentes con estudios previos del grupo de neurofisiología comportamental donde se usó el mismo protocolo de entrenamiento masivo en la misma tarea (Prado, 2009; Troncoso, et al., 2010; Urueña-Méndez & Lamprea, 2015; Vargas-López, et al., 2011).

Al evaluar el desempeño de los animales durante la prueba de retención se observó que aquellos con estrés inmediatamente después del entrenamiento tuvieron un mejor desempeño en comparación con los animales sin estrés, pues tardaron menos tiempo en encontrar el agujero meta, recorrieron una distancia significativamente menor al mismo y exhibieron una cantidad de error menor en comparación. Adicionalmente, en dichos animales no fue evidente alguna pérdida de información 24h después del esentrenamiento y se observó una preferencia por la exploración tanto del agujero meta como del sector meta.

Estos efectos del estrés no pueden ser atribuidos a diferencias en la motivación para explorar o a cambios motores en los animales, pues la latencia para iniciar la exploración así como la velocidad de recorrido no fueron significativamente diferentes entre los grupos, ni significativamente diferentes en comparación con su respectivo desempeño durante el último ensayo de entrenamiento; asimismo, dado que la restricción de movimientos tuvo lugar inmediatamente después del aprendizaje, aproximadamente 24h antes de la prueba de recobro, los efectos de dicho estresor no pueden ser explicados por diferencias en la codificación durante la adquisición, ni por efectos inespecíficos sobre la fase de recuperación (Abel & Lattal, 2001). Por estas razones se concluye que el protocolo de estrés por restricción de movimientos durante 1h, administrado inmediatamente después del entrenamiento en el laberinto de Barnes ejerce efectos facilitadores específicos a la consolidación de la memoria.

Los efectos facilitadores observados en este trabajo concuerdan con los estudios realizados en humanos, en los cuales la administración post-entrenamiento de estresores físicos como el frío o estresores psicológicos como la exposición a situaciones sociales evaluativas mejoraron la consolidación de la memoria dependiente del hipocampo (evaluada tanto en tareas apetitivas como aversivas) (Cahill, Gorski, & Le, 2003; Domes, Heinrichs, Reichwald, & Hautzinger, 2002; Jelici Geraerts, Merckelbach, & Guerrieri, 2004; Smeets, Giesbrecht, et al., 2007; Smeets, Otgaar, et al., 2008); asimismo concuerdan con los estudios en humanos en los cuales la administración sistémica post-entrenamiento de dosis moderadas de glucocorticoides o la administración de otras hormonas segregadas durante los episodios de estrés, como la adrenalina, mejoraron la consolidación de la información declarativa (Cahill & Alkire, 2003; Preuß & Wolf, 2009; Wolf, 2009).

Efectos facilitadores similares a los presentados en este estudio también se han reportado en tareas de evitación inhibitoria, en la tarea espacial del laberinto acuático de Morris, y en tareas de condicionamiento de temor contextual en roedores; así como en tareas de reconocimiento de objetos y tareas de condicionamiento apetitivo (Zorawski & Killcross, 2002) tras la administración sistémica post-entrenamiento de hormonas segregadas durante los episodios de estrés como la corticosterona o la noradrenalina (Roosendaal & McGaugh, 1997; Roosendaal, 2003; Schwabe, et al., 2011); de la misma manera se han reportado efectos facilitadores sobre la consolidación de la memoria dependiente del hipocampo tras la administración aguda de agonistas sintéticos de glucocorticoides como la dexametasona o de agonistas para receptores noradrenérgicos (Roosendaal, 2000; Zorawski & Killcross, 2002).

Aunque se han reportado consistentemente efectos facilitadores sobre la consolidación de la memoria utilizando como estrategia la administración exógena de hormonas relacionadas con el estrés, pocos estudios en roedores han evaluado los efectos directos del estrés sobre la consolidación de la memoria dependiente del hipocampo (Almaguer-Melian et al., 2012; Jodar, et al., 1995) lo cual es interesante en la medida que el estrés conduce a la producción de distintas hormonas cuya interacción podría generar efectos diferentes a los observados al administrar sólo una de ellas. Por ejemplo, estudios *in vitro* han mostrado que la administración de corticosterona en células del hipocampo es inefectiva para alterar la fosforilación de la subunidad GluA1 de los receptores tipo AMPA, los cuales se han involucrado en la cascada de señalización activada tras el aprendizaje; sin embargo la administración conjunta de corticosterona y un agonista para receptores  $\beta$ -adrenérgicos (i.e. isoproterenol, el cual simula la acción de la noradrenalina) aumenta dicha fosforilación, aumenta el anclaje de los receptores en la membrana y aumenta la transmisión excitatoria (efectos que no se observan tras administración individual del agonista) (Zhou, Hoogenraad, Joëls & Krugers, 2012).

Hasta donde se sabe existen sólo dos estudios publicados en roedores donde se han evaluado los efectos del estrés en la consolidación de la memoria dependiente del hipocampo; en el primer estudio Jodar, et al., (1995) entrenaron a un grupo de ratones en la tarea de evitación inhibitoria (en la cual el animal debe inhibir su tendencia natural a

ubicarse en ambientes oscuros para evitar un estímulo nocivo) y 10 minutos después del entrenamiento sometieron a los animales a un protocolo de estrés, que consistió en la exposición a un choque eléctrico inescapable en las patas (i.e 2mA por 1 segundo), a una sesión de nado forzado (5 minutos) o a la observación y escucha de un conoespecífico mientras era expuesto a un choque eléctrico; 24h después evaluaron la memoria y observaron que la exposición a un choque eléctrico mejoró la consolidación, pues los animales se demoraron más en cruzar al ambiente oscuro en comparación con los animales no estresados; el nado forzado tuvo un efecto perjudicial, pues los animales tuvieron una latencia menor de cruce en comparación con los animales control; y la observación del conoespecífico no tuvo efectos significativos.

En el segundo estudio, Almaguer-Melian et al., (2012) sometieron a un grupo de ratas a una sesión de 4 ensayos de entrenamiento en el laberinto acuático de Morris, en los cuales los animales debían encontrar una plataforma para escapar a la situación de nado forzado; y 5 minutos después les administraron un estresor intenso, que consistió en 5 choques eléctricos inescapables en las patas (i.e 1mA por 2 segundos cada uno y un intervalo entre choques de 10s); al evaluar la memoria 24h más tarde se observó que en comparación con los animales control aquellos sometidos al estresor tuvieron un peor desempeño, pues presentaron mayores latencias de escape.

Los resultados de facilitación en la consolidación de la memoria espacial observados en el presente estudio, concuerdan con los resultados obtenidos por Jodar, et al., (1995) al utilizar un choque eléctrico como estresor post-entrenamiento, pero contrastan con los resultados obtenidos en el mismo trabajo al utilizar el nado forzado como estresor o al utilizar 5 choques eléctricos después del entrenamiento en el laberinto de Morris (Almaguer-Melian et al., 2012).

Teniendo en cuenta que las tres tareas dependen del hipocampo (Roesler, 2003; Broadbent, et al., 2004; Fox, et al., 1998) y que en esta estructura se han demostrado relaciones de U invertida entre la intensidad de los estresores (evaluada en términos de la cantidad de glucocorticoides segregada) y los efectos observados (Conrad, 2005; Diamond,

et al., 1992) estas diferencias en los resultados podrían obedecer a diferencias en la intensidad de los estresores.

Aunque son pocos los estudios donde se ha comparado el nivel de estrés promovido por la restricción motora y otros estresores, se ha demostrado que la restricción incluso durante un tiempo 3 veces mayor al nado forzado (i.e. 100 minutos en lugar de 30 minutos respectivamente) genera aumentos significativamente menores en los niveles de corticosterona, así se ha observado que en comparación con animales control quienes exhiben niveles basales de corticosterona alrededor de los 35ng/ml, los animales con restricción de movimientos alcanzan niveles de corticosterona alrededor de los 400ng/ml; mientras que los animales sometidos a estrés por nado forzado alcanzan niveles superiores, alrededor de los 800 ng/ml (Kirby, et al., 1997). Al someter a los animales a un tiempo inferior de restricción (60 minutos) se observan niveles de corticosterona menores (250 ng/ml) (Acosta, 2008) en relación con los animales expuestos al nado forzado; lo cual se mantiene incluso al reducir a 5 minutos la exposición al nado forzado (pues aún en este caso se observa un nivel de corticosterona sobre los 800 ng/ml) (Gong, et al., 2015); estas observaciones permiten suponer que la restricción de movimientos utilizada en el presente estudio resultó menos estresante para los animales en comparación con la exposición al nado forzado utilizada en el estudio de Jodar, et al., (1995).

De manera similar, algunos estudios en ratas han reportado que la administración de 3 choques eléctricos inescapables (i.e 1mA por 1 segundo cada uno y un intervalo entre choques de 60s) en menos de 5 minutos induce elevaciones en los niveles de corticosterona alrededor de 250 ng/ml, el mismo nivel observado luego de 1 hora de estrés por restricción de movimientos (Cordero, Merino, & Sandi, 1998); teniendo en cuenta que al aumentar la intensidad de los choques eléctricos incrementan los niveles de corticosterona (Kant, Mougey, Pennington, & Meyerhoff, 1983), y que en el estudio de Almaguer-Melian et al., (2012) no sólo el tiempo y la cantidad de choques eléctricos fue mayor, sino que los animales estuvieron previamente sometidos al nado forzado que implica el laberinto de Morris, es probable que en ese estudio las elevaciones en los niveles de corticosterona fueran significativamente altas en comparación con las generadas por el protocolo de estrés por restricción de movimientos utilizado en el presente trabajo y que por esa razón los



autores observaran déficits en la consolidación de la memoria espacial. No obstante, una confirmación posterior implicará medir los niveles de corticosterona promovidos por la exposición conjunta al nado forzado y a la estimulación inducida por 5 choques eléctricos en las patas.

Teniendo en cuenta las observaciones anteriores se puede concluir entonces que los resultados obtenidos en el presente estudio favorecen la hipótesis inicialmente planteada según la cual un estresor moderado administrado inmediatamente después del entrenamiento en una tarea dependiente del hipocampo tendría efectos facilitadores sobre la consolidación de la memoria.

## **6.2 Efectos del estrés por restricción motora, el entrenamiento en el laberinto de Barnes y el estrés administrado durante la consolidación de la memoria sobre los niveles de H3K14ac**

En el segundo experimento se evaluó el nivel de acetilación de H3K14 en algunas estructuras cerebrales de animales que sólo recibieron manipulación (basales), animales sometidos a estrés por restricción de movimientos, animales entrenados en la tarea del laberinto de Barnes y animales entrenados con estrés inmediatamente después de la adquisición; y se tuvieron en cuenta las comparaciones entre los siguientes grupos: el grupo basal y el grupo con sólo estrés para determinar el efecto de la restricción de movimientos; el grupo basal y el grupo con sólo adquisición para determinar el efecto del entrenamiento en el laberinto de Barnes, y finalmente, el grupo con adquisición y el grupo con estrés inmediatamente después de la adquisición para evaluar los efectos del estrés durante la consolidación de la memoria.

En el caso de los grupos con entrenamiento antes de realizar las comparaciones en los niveles de acetilación de H3K14 se corroboró que los animales hubieran aprendido la tarea, y de manera similar a los resultados obtenidos en el experimento anterior se observó que los animales no fueron significativamente diferentes entre ellos.

Al determinar el nivel de acetilación de H3K14 entre los diferentes grupos se observó que en comparación con los animales del grupo basal los animales con sólo estrés por restricción motora exhibieron disminuciones significativas en la acetilación de H3K14 en el área CA1 del hipocampo y en el giro dentado; tuvieron aumentos significativos en la acetilación de H3K14 en el núcleo basolateral de la amígdala y no fueron significativamente diferentes en el núcleo central de la amígdala o en las otras áreas del hipocampo. Del mismo modo, en comparación con los animales del grupo basal se observó que los animales con sólo adquisición exhibieron disminuciones significativas en la acetilación de H3K14 en el área CA1 del hipocampo y no fueron significativamente diferentes en otras áreas de esta estructura, en el giro dentado, en el núcleo basolateral o en el núcleo central de la amígdala.

Finalmente, al comparar el nivel de acetilación de H3K14 entre los animales entrenados sin exposición al estrés y los animales entrenados con estrés inmediatamente después del entrenamiento se observó que los últimos presentaron niveles significativamente menores de H3K14ac en el área CA1 del hipocampo y en el giro dentado; al igual que aumentos significativos en el núcleo basolateral de la amígdala; y no se observaron diferencias en el núcleo central de la amígdala o en las demás áreas del hipocampo.

En el análisis adicional, al evaluar el nivel de acetilación de H3K14 presentado por estos grupos a las 24h post-entrenamiento, se observó que el grupo con estrés inmediatamente después de la adquisición mantuvo el mismo patrón de acetilación, es decir niveles bajos de H3K14ac en el área CA1 del hipocampo y en el giro dentado, niveles altos de H3K14ac en el núcleo basolateral de la amígdala y ausencia de cambios en el núcleo central de la amígdala o en las demás áreas del hipocampo; mientras que el grupo con entrenamiento sin exposición al estrés exhibió una reducción significativa adicional en la acetilación de H3K14 en el área CA1 del hipocampo, hasta alcanzar un nivel similar al observado en los animales entrenados que fueron sometidos al estrés; sin embargo, en línea con los resultados previos no presentaron modificaciones en las demás áreas del hipocampo, en el giro dentado, en el núcleo basolateral o en el núcleo central de la amígdala.

## **Efectos del estrés agudo sobre la acetilación de H3K14**

Estudios previos donde se evaluó el efecto del estrés agudo sobre el nivel de H3K14ac en la región granular del giro dentado mostraron que el estrés por exposición a la novedad (30min) y el estrés por nado forzado (15min) indujeron un aumento significativo en dicho marcador, alcanzando niveles máximos a las 2h desde el inicio de la exposición y retornando al nivel basal a las 4h. (Chandramohan, Droste, & Reul, 2007; Gutiérrez-Mecinas, et al., 2011; Chandramohan, Droste, Arthur, et al., 2008). Aunque en el presente estudio la medición de H3K14ac inducida por la restricción motora (1h) se realizó en el momento de máxima expresión reportado en los estudios anteriores, de manera llamativa no se observó el incremento esperado en la acetilación, sino se observó una disminución significativa (hipoacetilación).

Estas diferencias observadas no pueden ser atribuidas a una pérdida de marcaje en los tejidos o a fallas en la técnica de inmunohistoquímica, pues en la estructura de control positivo (i.e. la región periventricular) se observó una marcación similar en todos los grupos y en los controles negativos (en los cuales no se administró el anticuerpo) no se observó marcación (datos no mostrados). Sin embargo, es probable que las diferencias observadas estén relacionadas con el estresor administrado.

Distintas investigaciones han mostrado que estresores diferentes pueden tener un impacto diferente sobre la transcripción, por ejemplo, se ha observado que el estrés agudo por nado forzado (6 min en ratones) puede activar genes específicos en el hipocampo (e.g. *Sgk1* y *Per1*) que no son activados por la exposición aguda a la restricción motora (6 min en ratones) (Bohacek, Manuella, Roszkowski & Mansuy, 2015); asimismo, al comparar el efecto del estrés agudo por exposición a la novedad (30min) y el efecto del estrés agudo por inmovilización (30min) sobre la expresión del mismo gen (i.e. *Arc*) se ha observado que en algunas estructuras la novedad aumenta la expresión de ese gen pero la inmovilización no tiene efectos (e.g. el núcleo caudado o CA), en otras estructuras se presenta la relación contraria (e.g. el núcleo accumbens) y aun en otras regiones (e.g. el séptum lateral) se observa que ambos estresores aumentan la expresión, pero uno de ellos (i.e. la inmovilización) ejerce un efecto significativamente mayor (Ons, Martí & Armario,

2004). Estos y otros ejemplos sobre los efectos del estrés en la transcripción (Cullinan, Herman, Battaglia, Akil & Watson, 1995; Derks, Gaszner, Tilburg-Ouwens, Roubos, & Kozicz, 2008; Nair, et al., 2007; Pacák & Palkovits, 2001; Sabban & Kvetnanský, 2001;) indican que estresores diferentes (incluso con la misma duración) pueden afectar de manera particular el tipo de genes activados, el área cerebral en la que se activan y la cantidad de activación promovida.

Teniendo en cuenta que el estado de acetilación de las histonas afecta la transcripción, es probable que las diferencias observadas entre los resultados previos y el resultado actual reflejen que el estrés por restricción de movimientos tuvo un impacto diferente sobre dicho proceso. Dado que la hipoacetilación se ha asociado con la represión de la actividad transcripcional (Covington, et al., 2009; Rei et al., 2015), una posibilidad es que el estrés por restricción motora utilizado hubiera perjudicado la transcripción; sin embargo, la evidencia del resultado comportamental, la evidencia proveniente de estudios donde se evalúa la expresión de varios genes y la evidencia proveniente de un estudio donde se evalúan otros marcadores de actividad transcripcional no apoyan dicha interpretación.

Si el estrés agudo por restricción de movimientos hubiera tenido un efecto represor de la transcripción, entonces al administrarlo durante el proceso de consolidación (el cual requiere la activación de algunos genes que son afectados por el estrés) se hubiera observado un efecto perjudicial o una falta de efecto; sin embargo, como se discutió previamente el estrés por restricción de movimientos administrado se relacionó con un efecto de mejora sobre el proceso de consolidación de la memoria, así que no es probable que hubiera perjudicado la transcripción. Asimismo, distintos estudios han reportado que la exposición aguda a estrés por restricción motora induce la expresión de varios genes como *C-Fos*, *Zif268*, *5-HT*, *CRH* entre otros (Chowdhury, Fujioka & Nakamura, 2000; Cullinan, et al., 1995; Lombardo, et al., 2001; Yau, Noble & Seckl, 2001), sugiriendo como improbable que tuviera un efecto represor sobre la transcripción.

En el mismo sentido, en un estudio reciente donde se evaluaron dos marcadores epigenéticos asociados con la activación transcripcional (i.e. H3S28p y H3S10p) en animales sometidos a estrés por inmovilización (durante 30min), se observó que

inmediatamente después de finalizado el estresor hubo un incremento significativo en ambos marcadores; sin embargo 1h después se observó una reducción (Rotllant, Pastor-Ciurana & Armario, 2013). Dado que la restricción de movimientos es similar a la inmovilización (respecto al componente físico y psicológico que implica) dicho estudio sugiere que la restricción motora utilizada en presente trabajo no habría tenido un impacto negativo sobre la transcripción; es decir, que la hipacetilación observada probablemente no fue un efecto directo del estrés.

Estudios electrofisiológicos recientes han evidenciado que los cambios en la actividad neuronal en respuesta a diferentes estímulos (como el estrés agudo) desencadenan a su vez procesos opuestos cuya función es mantener la actividad neuronal dentro de ciertos límites funcionales (Corrêa, et al., 2012; Guzman-Karlsson, Meadows, Gavin, Hablitz, & Sweatt, 2014; Hartman, Burrone, & Murthy, 2006; Pozo & Goda, 2010). Por ejemplo, en cortes del hipocampo se ha observado que la administración de bicuculina (i.e. un antagonista de receptores GABA), aumenta significativamente la transmisión excitatoria, así como la transcripción génica (Gass, Herdegen, Bravo, Kiessling, 1992), sin embargo, al cabo de unas horas, esa elevación en la actividad induce una reducción compensatoria en la transcripción y asociado a ello una reducción en la excitabilidad (Turrigiano 2008; 2012).

Aunque en la actualidad no se conocen los mecanismos moleculares que subyacen dicha compensación, un estudio reciente sugiere que los cambios dinámicos en la acetilación de las histonas ejercerían un papel importante. En dicho estudio células del hipocampo fueron expuestas a varios tratamientos que elevan la actividad neuronal (e.g bicuculina), y se observó que en respuesta a dicha elevación ciertas proteínas del citoplasma (i.e. Arc) se trasladaron al núcleo de la célula; donde inhibieron la transcripción de ciertos genes (i.e. GluA1) a través del reclutamiento de proteínas (i.e. PML) que afectan la acetilación, bien sea degradando a las enzimas histonas acetiltransferasas (HATs) o reclutando a las enzimas desacetilasas (HDACs). (Korb, Wilkinson, Delgado, Lovero & Finkbeiner, 2013). Este estudio sugiere que probablemente un aumento inicial en la actividad transcripcional como resultado de ciertos tipos de estimulación

podría disparar la desacetilación como un mecanismo compensatorio para normalizar la transcripción.

Evidencia proveniente de estudios en otros modelos biológicos (e.g. fibroblastos, hepatocitos etc.) ha indicado consistentemente que ante un incremento en la acetilación de las histonas y consecuentemente un incremento en la transcripción se dispara la desacetilación en dichas proteínas como parte de un proceso de compensación (cuyos mecanismos moleculares hasta la fecha son desconocidos), donde la tasa de inducción puede ser muy rápida (e.g. 15 minutos para H3) en función de la cantidad de la acetilación previamente generada y en función de la presencia de otras modificaciones posttraduccionales en las mismas histonas, así, por ejemplo, se ha observado que la desacetilación de H4 es mayor cuando se encuentra en un estado de tetra-acetilación en contraste con un estado de mono-acetilación y se ha sugerido que la desacetilación de H3K14 puede ser mayor cuando la lisina 9 (K9) de la misma histona también está acetilada (Katan-Khaykovich & Struhl, 2002; Shahbazian & Grunstein, 2007; Waterborg, 2002).

Teniendo en cuenta dichos estudios, es probable que el estrés agudo por restricción motora utilizado en el presente trabajo tuviera un impacto diferente sobre la transcripción en el giro dentado en comparación con los estresores previamente evaluados, pero no en el sentido de una represión transcripcional, sino contrariamente, en el sentido de una mayor elevación, que consecuentemente disparó un proceso más rápido de desacetilación. Esta posibilidad explicaría que al medir en el mismo momento (2h a partir del inicio del estresor) en el estudio actual no se observara un nivel alto de acetilación en H3K14; sin embargo, aún deja abierta la pregunta de por qué se observó hipoacetilación en lugar de una desacetilación hasta el nivel basal.

Aunque son escasos, existen algunos reportes mostrando cambios compensatorios en el nivel de acetilación de las histonas, desviándose del nivel basal (bien sea incrementando o disminuyendo). Por ejemplo, en un estudio de 2009, Covington et al., evaluaron el efecto del estrés crónico sobre la acetilación de H3K14 en el núcleo accumbens. Para ello, sometieron un grupo de ratones (C57BL/6J) a la presencia de un ratón agresor (CD1) durante 5 minutos diarios por 10 días (estrés crónico por derrota social) y observaron que en comparación con el grupo basal los animales sometidos al

estrés crónico exhibieron una disminución en la preferencia por la sacarosa y una reducción en la interacción social (comportamientos de tipo depresivo). Al medir el nivel de H3K14ac poco después de finalizado el estresor (i.e. a los 10 días) observaron una marcada hipoacetilación; la cual se esperaba, en tanto dicho protocolo disminuye la expresión génica y tiene un impacto negativo sobre el comportamiento; sin embargo, de manera llamativa al evaluar el nivel de H3K14 horas después del estrés observaron un aumento en la acetilación, que fue significativamente mayor al nivel basal y se mantuvo durante 10 días. Al favorecer dicho incremento en la acetilación administrando un inhibidor de las HDACs (durante 5 días a partir del día 1 post estrés) se observó que la reducción en la expresión génica y los comportamientos de tipo depresivo fueron revertidos (de manera similar a los efectos de un fármaco antidepressivo) (Covington et al., 2009). Dichos resultados mostraron que después de una hipoacetilación relacionada con la disminución en la expresión génica, se desencadena el proceso opuesto de acetilación incluso por encima de los niveles basales (hiperacetilación), como un mecanismo compensatorio de las células que facilita el restablecimiento de la transcripción a unos niveles normales.

Dado que los procesos de compensación son bidireccionales, dicho estudio plantea que probablemente un aumento en la acetilación de las histonas y -consecuentemente en la actividad transcripcional- podría desencadenar un proceso opuesto de hipoacetilación como parte de un mecanismo compensatorio para facilitar el retorno de la transcripción a unos límites normales. Sin embargo, esta posibilidad sólo se ha evaluado directamente en algunos cultivos celulares (e.g. células del hepatoma HTC, linfoblastoides etc.) al exponer a las células durante varias horas a un inhibidor de las HDACs (e.g TSA o NaBut) y al medir la acetilación en varios momentos post exposición. En dichos estudios se reportó que los inhibidores de las HDACs aumentaron significativamente la acetilación; no obstante, horas después de la exposición se observó una desacetilación gradual que alcanzó un nivel significativamente inferior al basal (hipoacetilación) y se mantuvo durante varias horas (i.e. 18-24h), antes de retornar definitivamente a los niveles basales (Covault, Sealy, Schnell, Shires & Chalkley, 1982; Waterborg & Kapros, 2002) asimismo, se observó que la administración de los inhibidores de las HDAC (i.e. SAHA o ácido valpróico por 2h)

disminuyeron la expresión de genes que codifican proteínas con actividad HAT, como parte de un mecanismo compensatorio que evita el exceso de acetilación (Halsall, Turan, Wiersma, Turner, 2015).

Estos estudios permiten reconocer que ante los cambios en el nivel de acetilación de las histonas las células -eucariotas- en general disparan mecanismos compensatorios que pueden desviarse transitoriamente del nivel basal. Dado que hasta la fecha existen pocos estudios reportando esos cambios compensatorios diferentes del nivel basal, se desconoce bajo qué condiciones se inducen; sin embargo, evidencia indirecta de otros estudios sugiere que podrían relacionarse con el nivel de cambio inicial. Por ejemplo, al evaluar el patrón de transcripción de un gen específico (i.e. *ctgf*) ante dos estímulos diferentes (i.e. suero o TGF- $\beta$ 1) se observa que el estímulo que desencadena una mayor activación transcripcional (i.e. suero) a su vez induce un estado refractario durante varias horas (i.e. un periodo en el cual el gen es insensible a la estimulación); mientras que el estímulo que desencadena una menor activación transcripcional (TGF- $\beta$ 1) no induce en ningún momento dicho estado refractario (Molina, et al., 2013). Es probable entonces que a mayor desviación inicial del nivel basal los cambios compensatorios sean mayores, excediendo transitoriamente dichos límites basales.

Como se mencionó previamente, hasta el momento no se han reportado estudios sobre los efectos del estrés agudo en la acetilación de H3K14 en estructuras adicionales al giro dentado, por esta razón en el presente estudio se evaluó el efecto del estrés por restricción de movimientos sobre dicho marcador en el hipocampo y en dos regiones de la amígdala: el núcleo basolateral y el núcleo central; los cuales se relacionan respectivamente con la evaluación de la experiencia de estrés y con la coordinación de las respuestas autonómicas asociadas (e.g. la respuesta de congelamiento) (LeDoux, 2007).

Al evaluar el nivel de H3K14ac en el hipocampo, se observó una reducción significativa en el área CA1, de manera similar a lo reportado en el giro dentado. Adicionalmente, se observó una tendencia no significativa a la reducción en el área CA2 y no se presentaron cambios en el área CA3. Este resultado es consistente con estudios previos que sugieren una susceptibilidad mayor al estrés en el área CA1/2 en comparación con el área CA3; la cual se refleja en un cambio estructural mayor ante diferentes



estresores (Michaelis, 2012) y en una transcripción significativamente mayor para genes de respuesta al estrés (e.g. genes anti-oxidantes) o para IEGs como C-Fos y Zif268 (Cullinan, et al., 1995; Teather, Packard, Smith, Ellis-Behnke & Bazan, 2005; Wang & Michaelis, 2010).

De manera interesante al evaluar el nivel de H3K14ac en la amígdala se observó una hiperacetilación en el núcleo basolateral y no se observaron cambios en el núcleo central. Estos resultados son consistentes con diversas investigaciones en las cuales se reporta que la administración aguda de estresores psicológicos (e.g el estrés por restricción de movimientos) en contraposición a la administración aguda de estresores biológicos (e.g. una hemorragia) afecta principalmente a las neuronas del núcleo basolateral sin inducir cambios significativos en las neuronas del núcleo central (Dayas, Buller, Crane, Xu & Day, 2001). Por ejemplo, se ha observado que la exposición aguda a un estresor prolongado (i.e. 2h de restricción motora, seguida de 20min de nado forzado) aumenta la arborización dendrítica de las neuronas del núcleo basolateral, pero no tiene efectos sobre las neuronas del núcleo central (Cui, Sakamoto, Higashi & Kawata, 2008), asimismo, se ha observado que la administración de corticosterona aumenta la excitabilidad en las células del núcleo basolateral, mas no afecta la excitabilidad de las células del núcleo central (Karst, Berger, Erdmann, Schütz & Joëls, 2010), y de manera similar se ha observado que la administración de estrés agudo por inmovilización o por restricción de movimientos aumenta la marcación de la proteína C-Fos así como el ARNm para CRH en el núcleo basolateral sin afectar significativamente dicha expresión en el núcleo central (Pacák & Palkovits, 2001).

Dado que en función del área cerebral evaluada el estrés puede tener un impacto diferente sobre la transcripción y de manera relacionada sobre los marcadores epigenéticos (Ferland & Schrader, 2011; Kenworthy, 2014), no es extraño encontrar diferencias en el nivel de acetilación en H3K14 entre las distintas estructuras evaluadas; de hecho el patrón de cambios presentado se relaciona con evidencia previa.

Diversos estudios han mostrado que el estrés agudo y los glucocorticoides tienen un efecto particular sobre el núcleo basolateral de la amígdala; así, se ha observado que la

exposición aguda a un choque eléctrico inescapable (i.e. 0.5mA, por 0.5segundos, en gatos) aumenta la tasa de disparo en las neuronas del núcleo basolateral (a partir de 1h post estimulación) incluso 10 veces por encima del nivel basal; y se ha observado que dicho nivel de actividad se mantiene durante varias horas (Pelletier, Likhtik, Filali & Paré, 2005). De forma similar se ha observado que la exposición a un estresor agudo durante 30 minutos aumenta la potenciación a largo plazo (LTP)<sup>1</sup> en el núcleo basolateral, manteniendo dicha elevación durante varios días (i.e. 7 días) (Vouimba, Yaniv, Diamond & Richter-Levin, 2004); asimismo, se ha observado que la administración de corticosterona aumenta excitabilidad de las neuronas del núcleo basolateral y del área CA1; pero en el núcleo basolateral esa elevación es más lenta y se mantiene por el doble de tiempo (Karst, Berger, Erdmann, Schütz & Joëls, 2010; Sarabdjitsingh & Joëls, 2014). Dichos resultados se pueden relacionar con el aumento observado en la acetilación de H3K14 en el núcleo basolateral, en tanto el aumento de la actividad neuronal que se reportó depende de un aumento en la transcripción (Lee, Cohen, Becker & Fields, 2005) asimismo, dichos resultados sugieren que los efectos del estrés sobre el nivel de H3K14ac en núcleo basolateral pueden seguir un curso temporal distinto.

Estudios electrofisiológicos, farmacológicos y comportamentales han sugerido que el aumento en la actividad neuronal del núcleo basolateral de la amígdala es un factor modulador de la actividad neuronal del giro dentado y del área CA1 (Kim, Lee, Han & Packard, 2001; Packard & Teather, 1998; Roozendaal & McGaugh, 1997; Roozendaal 2000; McGaugh, 2000; Schwabe, et al., 2011). Así, se ha demostrado que la activación del núcleo basolateral bien sea por la estimulación eléctrica o por la administración de un estresor agudo aumenta la excitabilidad de las neuronas del giro dentado cuando se evalúa poco después de esa activación; sin embargo, si se evalúa entre 1 y 4 horas post activación se observa el efecto contrario (Akirav & Richter-Levin 1999; Nakao, Matsuyama, Matsuki

---

<sup>1</sup> La potenciación a largo plazo o LTP se refiere al fortalecimiento de una sinapsis como consecuencia de la estimulación breve y de alta frecuencia en los terminales excitatorios presinápticos (Barrett et al., 2011). Al realizar este tipo de estimulación las neuronas postsinápticas disminuyen su umbral de excitación, mostrando una respuesta potenciada ante la siguiente estimulación, por ejemplo, aumentando el número de potenciales de acción.

& Ikegaya, 2004; Richter-Levin , 2004; Szyrka, Danielewicz & Hess, 2011; Yamada, McEwen & Pavlides, 2003). Igualmente, se ha observado que la activación del núcleo basolateral de la amígdala inhibe el aumento en la excitabilidad de las neuronas del área CA1 cuando se evalúa 1h después de la activación, y se ha observado que dicho efecto puede durar alrededor de 24 a 48 horas (Garcia, Musleh, Tocco, Thompson & Baudry, 1997; Yamada, et al., 2003). Asimismo, se ha observado que la inhibición farmacológica del núcleo basolateral inhibe el incremento en IEGs como C-Fos y Arc que normalmente se induce en el hipocampo y en el giro dentado después de la exposición aguda a un estresor, y se ha observado que aumentar la transmisión noradrenérgica en el núcleo basolateral induce el efecto contrario, es decir promueve la expresión en ambas regiones (Huff, et al., 2006; McIntyre, et al., 2005; Sheth, Berretta, Lange & Eichenbaum, 2008).

Teniendo en cuenta esta evidencia una posible explicación al patrón de cambios reportado en el presente estudio es que la hipoacetilación evidenciada en el giro dentado y en el área CA1 del hipocampo refleje un efecto modulador del núcleo basolateral de la amígdala. Así, el estrés podría promover la activación del giro dentado y del área CA1 del hipocampo conduciendo a un aumento en la acetilación de las histonas y en consecuencia favoreciendo la transcripción; del mismo modo, la activación del núcleo basolateral de la amígdala (dada la situación de estrés) a través de conexiones directas (i.e. a CA1), o a través de otras estructuras, induciría un aumento mayor en la actividad del giro dentado y de CA1, promoviendo un incremento adicional en la transcripción. Después de cierto nivel de actividad transcripcional (en la actualidad no se sabe cómo las células establecen ese “valor”) (Turrigiano, 2012) las neuronas del giro dentado y de CA1 podrían disparar un proceso de desacetilación (que podría alcanzar un nivel de hipoacetilación), reduciendo así su expresión génica y disminuyendo transitoriamente su tasa de respuesta ante la estimulación, como parte de un proceso normal de compensación que favorece su funcionamiento.

Al respecto un estudio reciente con humanos mostró que al favorecer el incremento en los niveles circulantes de cortisol aumentó la actividad del hipocampo y de otras estructuras moduladas por la amígdala (e.g. la corteza pre-frontal); sin embargo, al aumentar el nivel de cortisol conjuntamente con la transmisión noradrenérgica a nivel

central, se observó que esa actividad hipocampal se redujo significativamente (desactivación) y se observó que esa reducción se relacionó con un efecto de mejora sobre algunos procesos regulados por dicha región (Van Stegeren, Roozendaal, Kindt, Wolf & Joëls, 2010). Lo que parece indicar que no siempre la reducción en la actividad del hipocampo se relaciona con un efecto perjudicial del estrés (e.g. represión sostenida en la actividad transcripcional y déficits a nivel comportamental), sino que puede hacer parte de un mecanismo normal de ajuste.

En conclusión, este es el primer estudio donde se evalúa el efecto del estrés agudo por restricción de movimientos sobre H3K14ac, un marcador epigenético asociado a la actividad transcripcional. Como se pudo observar, de manera sorpresiva el estrés indujo una reducción significativa en dicho marcador en el giro dentado y en el área CA1 del hipocampo, de manera similar a la reducción que se suele reportar en los casos de estrés crónico. Sin embargo, a diferencia del estrés crónico el estresor utilizado se ha relacionado con un aumento de la expresión génica en las regiones evaluadas y con un ajuste comportamental; haciendo que los resultados no puedan ser explicados como un efecto directo de represión transcripcional. Aunque son muy recientes, algunas investigaciones han reportado (con evidencia experimental y no solo teórica) que los cambios en la actividad neuronal inducidos por el estrés u otros estímulos disparan procesos opuestos como un mecanismo de compensación, sugiriendo que los efectos observados podrían hacer parte de una función cerebral normal de ajuste. Al evaluar el mismo marcador en el núcleo basolateral de la amígdala, una región relacionada con la modulación de los efectos del estrés en las demás regiones mencionadas, se observó un incremento en la acetilación de H3K14 (un resultado que no ha sido reportado hasta el momento) y se hipotetizó que el patrón de cambios observado en las demás estructuras podría relacionarse con un efecto modulador ejercido por dicha región.

Como resultado de este estudio varias ideas y preguntas quedan abiertas a la investigación. Por ejemplo:

- Si el estrés por restricción de movimientos indujo una hipoacetilación compensatoria en el giro dentado y del área CA1 del hipocampo, entonces en algún momento debió promover -entre otras modificaciones- un aumento en la acetilación de

H3K14. Para evaluar si esto es así, en qué momento se presentó y cuánto duró dicha modificación es necesario exponer a grupos de animales ante el estrés por restricción de movimientos (1h) y medir la acetilación de H3K14 en distintos intervalos desde el inicio del estresor.

-Asimismo, se podría determinar experimentalmente si la hipoacetilación de H3K14 observada en el giro dentado y en el área CA1 del hipocampo es influenciada por la actividad del núcleo basolateral de la amígdala, por ejemplo inactivándolo y evaluando si el patrón de cambios se modifica.

-Dado que se desconoce si la hipoacetilación observada tiene algún efecto sobre los ciclos subsecuentes de transcripción se podría evaluar cómo se modifican los patrones de acetilación/desacetilación para H3K14 en el CA1 y el giro dentado ante una segunda exposición al estresor. Asimismo se podría evaluar cómo se modifica el patrón de acetilación/desacetilación en el núcleo basolateral de la amígdala.

-Al comparar el nivel de H3K14ac entre un estresor intenso, corto y con un componente físico alto (el nado forzado) y un estresor leve, de mayor duración y con un componente físico bajo (la exposición a un ambiente novedoso), se observó un incremento en la acetilación que duró hasta 4h. Sin embargo, al evaluar el efecto de un estresor moderado, de mayor duración y con un componente físico moderado (la restricción motora); -durante el momento de máxima expresión reportado- se presentó el proceso opuesto. Una pregunta que queda abierta a la investigación es qué características del estrés por restricción de movimientos podrían dar cuenta de esas diferencias. Así, se podría evaluar el efecto de la duración, la intensidad, el nivel de activación del núcleo basolateral, el tipo de marcadores epigenéticos adicionales que afecta, entre otras.

-Una de las conclusiones de la evidencia presentada es que probablemente el estrés por restricción de movimientos promovió un aumento significativamente mayor en la transcripción del giro dentado, en comparación con los estresores previamente utilizados, no obstante, para demostrar esa afirmación es necesario evaluar qué tipo de genes están siendo regulados por cada estresor y cuál es la dirección de esa regulación.

## **Efectos del entrenamiento en el laberinto de Barnes sobre la acetilación de H3K14**

En el presente estudio se evaluó por primera vez el efecto del entrenamiento en el laberinto de Barnes sobre la acetilación de H3K14 en distintas estructuras cerebrales. Los resultados mostraron que después del entrenamiento el nivel de H3K14ac fue significativamente diferente del nivel basal en el área CA1 del hipocampo y no se evidenciaron diferencias significativas en las áreas CA2, CA3, en el giro dentado o en la amígdala. Estos resultados son consistentes con diversos estudios que reportan una participación del área CA1 del hipocampo en los procesos de consolidación de la memoria, en tareas como la evitación inhibitoria, el condicionamiento de temor contextual y la tarea espacial del laberinto acuático de Morris (Abrari et al., 2009; Daumas, Halley, Francés & Lassalle, 2005; De Lima, Luft, Roesler & Schröder, 2006; Okuda, et al., 2004; Roozendaal, 2002; Wang, Hu & Tsien, 2006); asimismo, los resultados presentados son consistentes con estudios en humanos donde se reporta que la actividad del área CA1 es crítica para la consolidación de la memoria episódica (Bartsch, Döhring, Rohr, Jansen & Deuschl, 2011; Haist, Bowden, Gore & Mao, 2001; Maguire, 2014).

De forma similar, los resultados obtenidos en el presente estudio se relacionan con estudios previos donde se sugiere que la participación del giro dentado y del área CA3 no se requiere para consolidar información sobre la configuración espacial de los objetos. Por ejemplo, se ha observado que ante la exposición a varios objetos similares, los animales con lesiones en el giro dentado, en el área CA3 o en el área CA1 exhiben una exploración normal, es decir, aumentan su exploración dado que la situación es novedosa y progresivamente van reduciendo su exploración a medida que la situación deja de serlo. Si en una sesión posterior se modifica la localización de algunos objetos (de modo que la situación se vuelve novedosa otra vez) se observa que los animales lesionados en el giro dentado y los animales lesionados en el área CA3 dirigen su exploración a los objetos en la nueva localización, de manera similar a un animal control; sin embargo, los animales con lesión en el área CA1 no exploran de manera diferente los distintos objetos, es decir se comportan como en la primera sesión (Kesner, 2007; Aimone, Deng & Gage, 2011);

sugiriendo que la actividad del área CA1, pero no la actividad del giro dentado o del área CA3 es indispensable para la consolidación de la memoria espacial.

De acuerdo, con Kesner (2007) en algunas situaciones experimentales el aprendizaje espacial puede requerir la actividad del giro dentado; por ejemplo, en la tarea espacial del laberinto de Morris se observa que los animales con lesiones en el giro dentado tienen dificultades para aprender la ubicación de la plataforma cuando el punto de partida varía entre cada ensayo; sin embargo, si los animales con lesión parten del mismo punto a lo largo del entrenamiento esas dificultades no se presentan. Este y otros ejemplos sugieren que el giro dentado se activa significativamente cuando en una misma situación espacial los aspectos métricos (i.e. la distancia entre los elementos pero no su ubicación) varían entre cada ensayo (Kesner, 2007). Dado que en la tarea espacial del laberinto de Barnes los animales parten desde el mismo lugar (i.e. el centro del laberinto); la distancia entre ese punto y los agujeros es la misma y la distancia entre las claves o entre las claves y el laberinto no se modifica en ningún ensayo, es probable que este tipo de tarea espacial no implique una activación significativa del giro dentado y por lo tanto no se observen diferencias en el nivel de H3K14.

En el mismo sentido, la ausencia de cambios significativos en el nivel de H3K14ac en la amígdala concuerda con estudios previos en los cuales se observó que esta estructura se activa significativamente sólo si la situación de aprendizaje involucra un componente significativo de estrés; en contraste con el área CA1 que se activa por el entrenamiento espacial independientemente del componente de estrés en la tarea. Por ejemplo, al entrenar a los animales en la tarea espacial del laberinto acuático de Morris, bajo dos condiciones de estrés (i.e. estrés leve: con agua a 25°C o estrés elevado: con agua a 19°C), se observó que la fosforilación de ERK2 (una señal de activación neuronal) sólo aumentó significativamente en la amígdala de los animales entrenados en la condición de estrés elevado; mientras que la fosforilación de ERK2 aumentó en el área CA1 del hipocampo de los animales entrenados independientemente de la condición (Akirav, Sandi & Richter-Levin, 2001). Dado que el entrenamiento en el laberinto de Barnes es menos estresante para los animales en comparación con el entrenamiento en el laberinto acuático de Morris

(Harrison et al., 2009) se podía esperar una ausencia de cambios significativos sobre el nivel de H3K14ac en la amígdala, en comparación con el área CA1 del hipocampo.

Al evaluar el nivel de H3K14ac en el área CA1 del hipocampo estudios previos indicaron un incremento significativo en dicho marcador después del entrenamiento en tareas asociativas como la tarea de reconocimiento de objetos (Fontán-Lozano, et al., 2008), la tarea de condicionamiento de temor al contexto (Levenson et al., 2004) y la tarea espacial del laberinto acuático de Morris (Bousiges et al., 2010; Dagnas & Mons, 2013); sin embargo, al evaluar el mismo marcador después del entrenamiento en el laberinto de Barnes se observó una reducción significativa.

Esa reducción significativa del nivel de H3K14ac en el área CA1 del hipocampo como resultado del entrenamiento en el laberinto de Barnes no puede ser explicada como un efecto global de represión transcripcional, puesto que el grupo de Neurofisiología Comportamental de la Universidad Nacional de Colombia ha demostrado que el entrenamiento de 8 ensayos en dicha tarea induce un aumento significativo en la expresión de proteínas que catalizan la fosforilación de distintos factores de transcripción y participan en la cascada de señalización activada durante la consolidación de la memoria (e.g Erk 1/2) (Ortiz, 2011); asimismo, este grupo de investigación ha evidenciado que el entrenamiento de 8 ensayos en el laberinto de Barnes induce un incremento significativo en la expresión de distintas proteínas, como Fos-B (Cerón, 2011), Arc y Bdnf en dicha región (datos no publicados) sugiriendo que el entrenamiento en la tarea favorece la transcripción; así que probablemente la diferencia de resultados está relacionada con otro factor.

Al comparar entre los estudios presentados se observó que todos midieron la acetilación de H3K14ac 1h después del entrenamiento; excepto un estudio donde la medición se realizó a las 24h. En dicho estudio un grupo de ratones (C57Bl/6) fue expuesto a dos sesiones de habituación y a una sesión de entrenamiento en la tarea de reconocimiento de objetos (5 ensayos x 5min cada uno); a las 24h del entrenamiento se evaluó el desempeño de los animales y después de la prueba se midió el nivel de H3K14ac en el hipocampo, reportando un aumento significativo (Gräff, et al., 2012). Sin embargo, dado que en dicho estudio no se aclara cuál fue la duración de la prueba ni cuánto tiempo



después de la misma se realizó la medición, no se puede descartar que el efecto observado refleje una influencia de la prueba de retención. Asimismo, dado que el reconocimiento de objetos (al menos su consolidación) parece involucrar una participación limitada del hipocampo (Winters, Forwood, Cowell, Saksida & Bussey, 2004; Broadbent, Gaskin, Squire, Clark, 2009), en contraste con el condicionamiento de temor al contexto y las tareas espaciales, donde su participación es indispensable; no se descarta que los resultados reportados a las 24h en ese estudio puedan reflejar una respuesta transcripcional diferente del hipocampo ante la tarea de reconocimiento de objetos en comparación con las demás tareas. Teniendo en cuenta esta observación es probable que el incremento en la acetilación de H3K14 inducido por el entrenamiento se vea generalmente hasta 1h después del mismo, y a continuación, se dispare un proceso de desacetilación compensatorio como consecuencia de los cambios en la transcripción inducidos por el aprendizaje.

De forma relacionada, al comparar las tareas dependientes del hipocampo utilizadas en los estudios previos y en el estudio actual, se observa una diferencia en la duración del entrenamiento, así; mientras el entrenamiento en la tarea de temor condicionado al contexto dura alrededor de 5 minutos (Levenson et al., 2004) y el entrenamiento en la tarea espacial del laberinto de Morris dura aproximadamente 10min cuando se realiza en una única sesión (Dagnas & Mons, 2013); el entrenamiento en el laberinto de Barnes dura alrededor de 1h (Troncoso, et al., 2010; Vargas-López, et al., 2011). Esta observación sugiere que al medir 1-2h después del entrenamiento en cada tarea, probablemente no se detecta la misma etapa del proceso de acetilación/desacetilación. Sin embargo, dado que no se han realizado estudios midiendo el nivel de H3K14ac en distintos intervalos a partir del inicio del entrenamiento, y no se han realizado comparaciones entre los niveles de H3K14ac inducidos por cada tarea se desconoce si los patrones de acetilación/desacetilación seguidos en cada caso son similares o varían en función de las características particulares de las tareas; por ejemplo, el estrés intrínseco que involucran, la duración de los ensayos u otros aspectos particulares.

En conclusión, este es el primer estudio donde se reportan cambios en un marcador epigenético de actividad transcripcional como consecuencia del entrenamiento en el laberinto de Barnes. En correspondencia con estudios previos se observó un efecto

significativo del entrenamiento sobre dicho marcador en el área CA1 del hipocampo, pero en contraste con dichos estudios el efecto se presentó en la dirección opuesta (i.e. se observó una hipoacetilación en lugar de una hiperacetilación en H3K14). Teniendo en cuenta que el efecto presentado no puede ser explicado como un efecto global de represión transcripcional directamente promovido por el entrenamiento en el laberinto de Barnes, puesto que este favorece la transcripción; se propuso que el efecto observado podía reflejar un proceso de desacetilación compensatorio. Dado que en la actualidad no existen estudios comparativos sobre los patrones de acetilación/desacetilación promovidos por el entrenamiento en las distintas tareas, se desconoce si el efecto reportado en el presente estudio representa un curso temporal común al aprendizaje espacial-contextual o representa un curso temporal particular a la tarea espacial utilizada.

Como resultado del presente este estudio algunas preguntas que quedan abiertas a la investigación son: ¿Cómo son los patrones de acetilación/desacetilación de H3K14 en las tareas dependientes del hipocampo? , ¿Qué influencia podría tener la duración del entrenamiento sobre dichos patrones? , ¿Qué influencia podría tener el nivel de estrés intrínseco a la tarea? ¿El patrón de cambios sería diferente en tareas apetitivas? ¿Qué genes están siendo regulados por los cambios en H3K14ac y si varían en función de la tarea? y finalmente ¿los cambios en H3K14ac como resultado del entrenamiento en el laberinto de Barnes modifican la expresión posterior de dichos genes al re exponer a los animales a la misma tarea?

### **Efectos del estrés agudo administrado durante la consolidación de la memoria sobre los niveles de H3K14ac**

En el presente estudio se evaluó por primera vez si los efectos facilitadores del estrés sobre la consolidación de la memoria espacial podrían involucrar mecanismos epigenéticos como la acetilación de H3K14. Para ello dos grupos de ratas fueron entrenados en la tarea espacial del laberinto de Barnes, e inmediatamente después del entrenamiento un grupo fue sometido a estrés por restricción de movimientos durante 60 minutos, y 2h después del último ensayo de adquisición se midió el nivel de H3K14 en diferentes regiones cerebrales. Los resultados mostraron que los cambios promovidos por

el entrenamiento fueron aumentados por el estrés, de modo que en el área CA1 del hipocampo se observó una reducción significativamente mayor en el nivel de H3K14ac en los animales entrenados que fueron sometidos al estresor. Adicionalmente, estos animales exhibieron una reducción significativa de H3K14ac en el giro dentado y una hiperacetilación en el núcleo basolateral de la amígdala (un patrón similar al observado en los animales con sólo estrés), y de forma consistente con los resultados previamente discutidos no se observaron diferencias significativas entre los grupos en las demás regiones evaluadas.

Como se esperaba, en el presente estudio se encontraron diferencias significativas en el nivel de H3K14ac entre los animales entrenados que fueron expuestos al estresor y los animales que sólo tuvieron entrenamiento; sin embargo la dirección de los efectos observados fue supresiva. En estudios previos, al impedir la acetilación de las histonas bloqueando la actividad HAT por medio de fármacos inhibidores o bloqueando la expresión de CBP, P300 o PCAF se reportó una disminución significativa en la acetilación de H3K14ac, una disminución en la expresión de genes como C-fos y consistentemente se reportó un déficit en la consolidación de la memoria asociativa (Alarcón, et al., 2004; Korzus, et al., 2004; Barrett et al., 2011 Gräff, et al., 2012). En el mismo sentido, en los estudios previos donde se favoreció la acetilación de las histonas utilizando inhibidores de las HDACs se observó que los déficits de memoria fueron revertidos (Haettig, et al., 2011; Peleg, et al., 2010; Vecsey, et al., 2007) y se observó que al administrar los inhibidores inmediatamente después del entrenamiento en diferentes tareas (e.g. la tarea espacial del laberinto acuático de Morris) hubo un efecto de mejora en la consolidación de la memoria (Dash, Orsi, y Moore, 2009; Levenson, et al., 2004; Roozendaal, et al., 2010).

Teniendo en cuenta los estudios previos, se esperaba entonces que el estrés agudo al mejorar la memoria (como se observó en el experimento 1), indujera un aumento significativo en la acetilación de H3K14, en lugar del efecto contrario. Sin embargo, aunque el resultado fue inesperado, de forma interesante, en un estudio reciente se reportó un resultado similar. En dicho estudio un grupo de ratas fue entrenado en la tarea de reconocimiento de objetos e inmediatamente después la mitad de los animales recibió una infusión bilateral de noradrenalina en el núcleo basolateral de la amígdala; 1h después

algunos animales fueron perfundidos y 24h después del entrenamiento el resto de los animales fue sometido a una prueba de recobro. Los resultados mostraron que en comparación con los animales entrenados que recibieron la infusión de salina, los animales que recibieron la infusión de noradrenalina mostraron un mejor desempeño durante la prueba de recobro, pero sorpresivamente al evaluar el nivel de H3K14ac en la corteza insular (una estructura particularmente involucrada en el reconocimiento de objetos) mostraron una reducción significativa por debajo del nivel basal (Beldjoud, Barsegyan & Roozendaal, 2015).

A pesar de las diferencias en los procedimientos experimentales (i.e. el tipo de tarea, el área evaluada, etc.) ambos estudios comparten 4 características interesantes, primero, en los animales con mejor desempeño (i.e. el grupo experimental) se evidencia una activación del núcleo basolateral de la amígdala, segundo, en los animales con mejor desempeño se observó una reducción significativa en H3K14ac (en comparación con los animales entrenados que no fueron sometidos a los tratamientos); tercero, la reducción en H3K14ac se evidenció en un área activada por el entrenamiento y cuarto, en ambos casos el área afectada exhibe conexiones directas bidireccionales con el núcleo basolateral de la amígdala (Olucha-Bordonau, Fortes-Marco, Otero-García, Lanuza, Martínez-García, 2015; Pitkänen, Pikkarainen, Nurminen & Ylinen, 2000).

Distintos estudios han evidenciado que la actividad del núcleo basolateral de la amígdala ejerce efectos moduladores sobre la consolidación de la memoria, así, se ha observado que la estimulación de la amígdala (e.g. administrando glucocorticoides, agonistas de receptores de norepinefrina o estresores como un choque eléctrico) inmediatamente después del entrenamiento facilita la consolidación de la memoria a largo plazo para la evitación inhibitoria (Huff, Miller, Deisseroth, Moorman & LaLumiere, 2013; Huff, et al., 2006; McIntyre, et al., 2005; Sheth, et al., 2008) el reconocimiento de objetos (Bass & Manns, 2015; Roozendaal, Okuda, Van der Zee & McGaugh, 2006); el temor condicionado al contexto y la información espacial (Packard, Cahill, & McGaugh, 1994; Roozendaal & McGaugh, 1997; Roozendaal, 2000; Schwabe, et al., 2011); y se ha observado que ese efecto de mejora depende principalmente de la convergencia temporal entre la situación de aprendizaje y el evento activador (e.g. el estrés) (De Kloet, Oitzl &

Joëls, 1999; Krugers, Karst & Joels, 2012); pues, se cree en los casos donde la administración del estresor es cercana a la situación del aprendizaje, las hormonas (e.g. glucocorticoides) y los neurotransmisores (e.g. la norepinefrina) liberados en respuesta a ambas situaciones (de Kloet, et al, 2005) (Sandi & Pinelo-Nava, 2007) actuarían sobre las mismas áreas cerebrales, favoreciendo su activación y probablemente promoviendo el fortalecimiento de las sinapsis activadas (Izquierdo, et al., 2008).

Con relación a lo anterior se ha observado que inhibir la activación concurrente de noradrenalina y glucocorticoides previene los efectos de mejora sobre la consolidación de la memoria en diferentes tareas. Por ejemplo, se ha observado que si la situación de aprendizaje posee un componente de estrés intrínseco muy bajo (e.g. no induce un incremento en la noradrenalina), -lo que ocurre cuando los animales están habituados a la tarea-, la inyección de corticosterona inmediatamente después del aprendizaje no aumenta la memoria para dicha tarea (i.e. evitación inhibitoria)(Roozendaal, et al., 2006); asimismo se ha evidenciado que inhibir la transmisión noradrenérgica en el núcleo basolateral o impedir la acción de los glucocorticoides utilizando antagonistas selectivos para GRs (e.g. RU38486) en la misma región, bloquea el aumento en la consolidación de la memoria espacial inducido por la administración de corticosterona en el hipocampo (Roozendaal & McGaugh, 1997; Roozendaal 2000; McGaugh, 2000; Schwabe, et al., 2011).

De forma similar, otros estudios en los que se evalúa el efecto modulador de la amígdala sobre la consolidación de la memoria han sugerido que la activación del núcleo basolateral altera los patrones de disparo en las neuronas de otras áreas, así como favorece la expresión génica y favorece la síntesis de proteínas inducidas ante ciertas situaciones. Por ejemplo, se ha observado que la estimulación eléctrica breve en el núcleo basolateral de la amígdala inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de reconocimiento de objetos facilita la sincronización de la actividad eléctrica en el hipocampo y de manera relacionada mejora la consolidación de la memoria para dicha tarea (Bass & Manns, 2015). Asimismo, algunos estudios han evidenciado que favorecer la actividad de la amígdala al administrar agonistas de receptores noradrenérgicos favorece el incremento en la expresión de IEGs como C-fos y la expresión de proteínas como Arc inducido por el entrenamiento en la tarea de temor contextual; y se ha observado que impedir su actividad administrando

fármacos como la lidocaína previene dicho incremento. (Huff, et al., 2006; McIntyre, et al., 2005; Sheth, et al., 2008).

Como se puede observar distintas investigaciones relacionan la activación del núcleo basolateral de la amígdala con una mejora en la consolidación de la memoria en diferentes tareas, con cambios en la actividad eléctrica de otras áreas y con alteraciones en la expresión génica y la síntesis de proteínas que se inducen como consecuencia del aprendizaje; sin embargo, a pesar del alto número de estudios reportando esos efectos en la actualidad se desconoce qué mecanismos moleculares están involucrados en dicha modulación. Una hipótesis interesante que surge de los resultados presentados en este estudio y que estaría relacionada con el estudio de Beldjoud, et al., (2015), es que la activación del núcleo basolateral de la amígdala, inducida por el estrés, potenciara los cambios promovidos por el aprendizaje en regiones como CA1 (directamente o a través de otras estructuras); facilitando la acetilación de las histonas y la transcripción génica. Sin embargo, como resultado de esa influencia de la amígdala (probablemente a través de proyecciones glutamatérgicas) en algún momento la actividad de las células de CA1 (y otras regiones) superarían un cierto valor homeostático, disparando (a través de vías que en el momento se desconocen) un proceso compensatorio que les permitiría contrarrestar la influencia proveniente de la amígdala. Como se describió previamente, ese proceso compensatorio involucraría entre otras acciones, la desacetilación en las histonas y dependiendo de qué tanta actividad deban contrarrestar las células, o en otras palabras de qué tan activa esté la amígdala, ese proceso de desacetilación podría derivar en un estado de hipoacetilación.

En el estudio actual, el aprendizaje en el laberinto de Barnes probablemente aumentó la acetilación de H3K14 y la transcripción en el área CA1 de los animales entrenados, e indujo consecuentemente un proceso compensatorio de desacetilación (como se describió previamente). En el caso de los animales que adicionalmente fueron sometidos a la restricción motora es probable que el aumento en la actividad de la amígdala (como resultado del estrés) promoviera un aumento mayor en la actividad de esas células de CA1, reflejado en un incremento en el nivel de H3K14ac y un incremento en la transcripción; los

cuales al ser probablemente mayores en comparación con los animales entrenados sin estrés, dispararon un proceso compensatorio más rápido o más eficiente.

Respecto al giro dentado los cambios en dicha estructura parecen responder sólo al estrés. Previamente se indicó que una de las funciones del giro dentado tiene que ver con la codificación de aspectos métricos en una situación, (a qué distancia están los objetos) (Kesner, 2007); en el caso del laberinto de Barnes es probable que no se viera una participación por las razones mencionadas previamente (porque todo estuvo siempre en el mismo lugar) pero además porque los animales fueron expuestos previamente a esa situación (y probablemente podían reconocer que la distancia entre los elementos relevantes no se había alterado). Sin embargo, al administrar el estrés los animales fueron trasladados a una nueva cabina, que si bien era similar, no se descarta que algunos elementos hubieran favorecido la actividad de esta estructura. Una vez activada; es probable que su actividad se viera potenciada por el efecto directo de los glucocorticoides y otras hormonas segregadas durante el estrés y por la acción indirecta de la actividad del núcleo basolateral de la amígdala.

Para finalizar, dado que se tenía el tejido de los animales en del experimento 1, es decir los animales que fueron perfundidos 24h después del entrenamiento (inmediatamente después de la prueba); se decidió evaluar si los cambios en H3K14ac variaban a las 24h. Al evaluar a los animales con entrenamiento que fueron sometidos al estresor se observó que la hipoacetilación se mantuvo sin modificaciones significativas a las 24h, un resultado que extrapolando los estudios ex vivo disponibles podría esperarse en tanto la exposición a un episodio de estrés agudo (30 minutos) aumenta la LTP en el núcleo basolateral durante varios días (Vouimba, et al., 2004); y se ha mostrado que la LTP en el área CA1 como consecuencia de la activación del núcleo basolateral se puede inhibir por ~48h (Garcia, 1997). Sin embargo al evaluar el efecto del entrenamiento se observó que la hipoacetilación observada a las 2h se redujo más a las 24h hasta quedar al nivel de los animales con estrés. Este resultado es interesante en tanto abre varias preguntas; por ejemplo, ¿ese resultado podría reflejar que la desacetilación compensatoria llega hasta cierto valor máximo pero en el caso de los animales con estrés el proceso fue más rápido? ¿Podría ser un efecto de la prueba? ¿Cuánto tiempo se mantienen los cambios? ¿La tasa de

“re-acetilación” varía en función del tratamiento? ¿Qué genes están siendo regulados? ¿Cómo afectan esos cambios la efectividad de la transmisión sináptica?

En conclusión, este es el primer estudio reportado en el que se evalúa el efecto del estrés agudo sobre la consolidación de la memoria y su relación con cambios epigenéticos. Como se esperaba el estrés mejoró la consolidación de la memoria e indujo cambios en el marcador epigenético de actividad transcripcional evaluado, sin embargo la dirección de los efectos fue inesperada; pues la mejora en el comportamiento se relacionó con una hipoacetilación en el área CA1 contrario a todos los reportes donde se administran inhibidores de HDACs. Sin embargo, en un estudio reciente donde se evaluó una estructura involucrada en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos (i.e. la corteza insular) se observó un resultado similar, una mejora en la consolidación de la memoria asociada a una hipoacetilación en H3K14. Dado que en ambos estudios la hipoacetilación se asoció a un incremento en la actividad del núcleo basolateral de la amígdala se planteó que los resultados podrían obedecer a una acción moduladora de esta región sobre estructuras activadas por la tarea, donde los cambios inducidos por el aprendizaje de la tarea serían aumentados y en función de una actividad elevada se dispararía un proceso de desacetilación compensatorio mayor al observado en los animales entrenados que no fueron expuestos al estresor.

## **Discusión y conclusión general**

Recordar las señales que indican la presencia de un depredador, la disponibilidad de un alimento, la presencia de compañero sexual etc. tiene consecuencias inmediatas y futuras sobre la supervivencia y el éxito reproductivo de los organismos. Dado el valor adaptativo de recordar esas señales, probablemente como resultado de un proceso de selección natural, se han desarrollado mecanismos específicos filogenéticamente compartidos entre los vertebrados cuya función es facilitar la consolidación de esa información (Gal-Ben-Ari, et al., 2012; Joëls, Fernandez, Roozendaal, 2011).

Se ha observado que el proceso de consolidación de la memoria involucra la participación de muchas moléculas y complejas cascadas de señalización (e.g. la activación postsináptica de receptores AMPA, NMDA, la activación de las proteínas quinasas de la



vía MAPK, ERK1/2 entre otras) que derivan en cambios en la transcripción génica, en la expresión de nuevas proteínas y finalmente en la modificación de los terminales sinápticos de las neuronas (Izquierdo, et al., 2006; Sweatt, 2004) afectando la efectividad de la transmisión o en otras palabras modificando el umbral de disparo, la tasa de disparo o el tiempo durante el cual las células permanecen activas. Se cree que ese incremento en la actividad neuronal facilitaría los procesos de memoria al favorecer el establecimiento de conexiones sinápticas entre las células que se activaron durante la situación de aprendizaje; de modo que en una situación futura (e.g. la prueba de recobro) la reactivación de algunas células de esa red sería suficiente para activar a las otras células (que ahora tienen un menor umbral de disparo) y recobrar esa información previamente adquirida (Ryan, Roy, Pignatelli, Arons & Tonegawa, 2015).

Distintos estudios han evidenciado que inhibir algún elemento de esa cascada de señalización (e.g. impedir la síntesis de proteínas, la activación de los receptores NMDA etc) perjudica la consolidación de la memoria en diferentes tareas (Igaz, et al., 2002) sin embargo, promover esos cambios tiene un efecto de mejora. Por ejemplo, se ha demostrado que las hormonas y neurotransmisores liberados en respuesta al estrés (e.g. la noradrenalina y los glucocorticoides) facilitan la excitabilidad de sus células diana así como el aumento en la transcripción génica al unirse a receptores específicos en el cerebro (e.g. receptores  $\beta$ -adrenérgicos, GRs, MRs) (Akirav & Richter-Levin 1999; Richter-Levin, 2004; Schwabe, et al., 2011); y se ha evidenciado que promover esas respuestas inmediatamente después del entrenamiento mejora la consolidación de la memoria en diferentes tareas (Roozendaal 2000; McGaugh, 2000); lo cual se refleja en una respuesta más persistente (duradera en el tiempo), más resistente (menos susceptible a la disrupción), más exacta o una combinación de las anteriores opciones, durante la prueba de recobro (Richter-Levin, 2004).

Asimismo, en dichos estudios se ha demostrado que los efectos facilitadores de esas hormonas y neurotransmisores liberados en respuesta al estrés son modulados por la actividad del núcleo basolateral de la amígdala, una región relacionada con la evaluación de la experiencia de estrés, que recibe información multimodal y que tiene conexiones bidireccionales con diversas estructuras importantes para la consolidación de la memoria,

como el área CA1 del hipocampo (Olucha-Bordonau, et al., 2015; Pitkänen, et al., 2000). Aunque no se sabe cómo la actividad de la amígdala afecta esas estructuras se ha mostrado que su inhibición bloquea los efectos facilitadores promovidos por los glucocorticoides así como bloquea los cambios en la actividad neuronal promovida por la exposición a la tarea; en el mismo sentido, se ha demostrado que su activación promueve los efectos de los glucocorticoides y promueve los efectos del entrenamiento (e.g. el aumento en la transcripción génica y en la excitabilidad neuronal (Akirav & Richter-Levin 1999; Huff, et al., 2006; McIntyre, et al., 2005; Nakao, et al., 2004; Richter-Levin, 2004; Sheth, et al., 2008; Yamada, et al., 2003)

Investigaciones recientes han sugerido que la transcripción génica puede ser regulada por mecanismos epigenéticos; es decir aquellos mecanismos que afectan el estado de la cromatina, favoreciendo o reprimiendo la transcripción sin afectar la secuencia de nucleótidos en el ADN. En el contexto del aprendizaje y la memoria uno de los mecanismos epigenéticos que se ha estudiado por estar relacionado con la actividad transcripcional es la acetilación de las histonas y se ha observado que las tareas dependientes del hipocampo favorecen la acetilación de la histona 3 en la lisina 14 (H3K14ac) en el área CA1, al medir 1h o 24h después del aprendizaje. Asimismo se ha evidenciado que la administración de fármacos inhibidores de la desacetilación en dicha región mejora la consolidación de la memoria (Dash, Orsi, y Moore, 2009; Gräff, et al., 2012; Levenson, et al., 2004; Roozendaal, et al., 2010). De forma similar, aunque existen menos trabajos evaluando los efectos del estrés agudo sobre la acetilación de las histonas se ha mostrado que el estrés por nado forzado y el estrés por exposición a la novedad aumentan la acetilación de H3K14 en el giro dentado, evidenciando un pico de expresión a las 2h desde el inicio del estresor y permaneciendo elevada hasta 4h Chandramohan, Droste, & Reul, 2007; Chandramohan, Droste, Arthur, et al., 2008; Gutiérrez-Mecinas, et al., 2011).

Teniendo en cuenta que consistentemente se reportó que las hormonas segregadas por el estrés mejoraban la consolidación de la memoria, y que tanto la consolidación de la memoria, como el estrés agudo inducían cambios epigenéticos sobre H3K14, en este estudio se evaluó 1) si el estrés agudo afectaba la consolidación de la memoria espacial, 2)

si un estresor moderado diferente al nado forzado o a la novedad afectaba la acetilación de H3K14, 3) si el entrenamiento en una tarea espacial alternativa al laberinto acuático de Morris afectaba dicho marcador y 4) algo que hasta el momento ningún estudio ha explorado, si los efectos del estrés agudo sobre la consolidación de la memoria se relacionan con cambios epigenéticos.

Para evaluar posibles efectos mejoradores del estrés se utilizó un entrenamiento moderado en el laberinto de Barnes, el cual ha mostrado ser suficiente para inducir un aprendizaje estable y se ha relacionado con un aumento en la transcripción evidenciado en un incremento significativo en la expresión de proteínas involucradas en la cascada de señalización descrita (Ortiz, 2011). Como se esperaba el estrés mejoró la consolidación de la memoria espacial, pues en comparación con los animales entrenados que no fueron expuestos al estresor, aquellos sometidos a la restricción de movimientos exhibieron una menor latencia de escape, una menor cantidad de error (medidas primarias) y una preferencia por la exploración del agujero meta. Al comparar con el último ensayo de adquisición correspondiente para cada grupo se observó cierta pérdida de información en los animales control, sin embargo, en un análisis por sectores se observó que prefirieron explorar el sector meta, es decir que recordaban la tarea, pero su respuesta fue menos exacta. En otras palabras se puede concluir que el efecto de mejora en la consolidación de la memoria espacial en el laberinto de Barnes, inducido por el estrés, se reflejó en una respuesta más exacta y en una respuesta más resistente a cierta pérdida de información que ocurre 24h después del entrenamiento.

Al evaluar el nivel de H3K14ac en este estudio se reportó por primera vez que 1) el estrés agudo por restricción de movimientos durante 1h afecta significativamente dicho marcador en el giro dentado (donde previamente se reportaron efectos), en el área CA1 del hipocampo y en el núcleo basolateral de la amígdala; 2) Asimismo se demostró por primera vez que el entrenamiento en el laberinto de Barnes afecta el estado de la cromatina en CA1 sugiriendo que los cambios en el giro dentado y el núcleo basolateral de la amígdala son específicos del estresor y 3) se demostró por primera vez que los animales entrenados que fueron expuestos al estresor muestran un efecto significativamente mayor

en CA1, en el giro dentado y en el núcleo basolateral de la amígdala en comparación con los animales entrenados que no fueron expuestos al estrés.

No obstante, de manera muy llamativa pese a evaluar la acetilación en el momento donde los estudios previos sobre el estrés agudo reportaron los mayores niveles de acetilación (2h a partir del inicio del estresor), en el estudio actual no se observó la hiperacetilación esperada en el giro dentado; asimismo, al evaluar el efecto del entrenamiento no se observó la hiperacetilación esperada en CA1, sino, contrariamente se observó una hipoacetilación; y de forma aún más llamativa en el caso de los animales entrenados que fueron expuestos al estrés la hipoacetilación en CA1 fue significativamente mayor en comparación con los animales entrenados sin exposición al estresor. Estos resultados no concuerdan con los estudios previamente reportados, pues un estado global de hipoacetilación como el que se reporta en el presente estudio se suele asociar con un estado de represión transcripcional y un déficit en los procesos celulares; mientras que en el presente estudio esa hipoacetilación se asocia con un aprendizaje eficiente, que favorece la expresión de ciertas proteínas (Ortiz, 2011); con un estresor que consistentemente se ha demostrado favorece la expresión génica (Cullinan, et al., 1995; Yauet al., 2001; Lombardo, et al., 2001); y finalmente, se asocia con un efecto de mejora en la consolidación de la memoria mediado por dicha restricción. Sin embargo, un resultado muy interesante también, y que no ha sido publicado hasta el momento es que el estrés agudo utilizado en el presente trabajo promovió una hiperacetilación en el núcleo basolateral de la amígdala.

Estudios electrofisiológicos recientes en neuronas sugieren que ante incrementos en la efectividad de la transmisión sináptica las neuronas activan mecanismos compensatorios que impiden que el funcionamiento de las redes neuronales derive en una actividad eléctrica desenfrenada. Si bien no se conocen los mecanismos moleculares implicados; recientemente se han involucrado algunos elementos de la cascada de señalización activada durante el proceso de consolidación, por ejemplo, el aumento de calcio, la activación de la vía ERK y el aumento en proteínas como Arc (Turrigiano 2008; 2012); y se ha sugerido que ese proceso podría involucrar a la desacetilación de las histonas (Korb, et al., 2013). Así, se ha sugerido que tras el aumento en la acetilación de las histonas y

consecuentemente en la transcripción se puede disparar un proceso de desacetilación compensatorio que puede iniciar rápidamente y que probablemente en función del nivel de activación previa podría derivar en una hipoacetilación (Waterborg, 2002; Halsall, et al 2015).

Sin embargo, hasta la fecha sólo un trabajo publicado meses atrás ha evidenciado que un proceso de hipoacetilación no necesariamente se relaciona con un déficit en los procesos celulares. En dicho estudio se administró norepinefrina directamente en el núcleo basolateral de la amígdala y se observó que los animales que recibieron la infusión inmediatamente después del entrenamiento mostraron una mejora en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos pero exhibieron una hipoacetilación de H3K14 en la corteza insular, una región asociada a la consolidación de ese tipo de tarea.

Una hipótesis interesante que surge de los resultados presentados en este estudio es que la activación del núcleo basolateral de la amígdala, podría potenciar la actividad que el mismo estrés o el aprendizaje inducen sobre las células de otras estructuras, promoviendo una mejora en la consolidación (e.g. en CA1). No obstante, al cabo de un tiempo como consecuencia de la misma actividad elevada de la amígdala, es probable que las células dispararen un proceso desacetilación, como parte de un mecanismo normal para contrarrestar esa influencia de la amígdala, de modo que entre mayor sea la actividad de la amígdala sobre esa estructura (o sobre una vía indirecta) mayor sea el grado de compensación. Sin embargo, dado que la mayoría de evidencia presentada es indirecta o muy reciente, esta hipótesis y algunas ideas presentadas en las secciones previas quedan abiertas a la evaluación experimental.



# **Ginna Paola Urueña Méndez**

[gpuruenam@unal.edu.co](mailto:gpuruenam@unal.edu.co)

Bogotá, Colombia

+57 2985341

---

## **EDUCACIÓN**

- 2013 – Actualidad      MA en Psicología, Universidad Nacional de Colombia.  
Título de la tesis: efectos del estrés agudo en la consolidación de la memoria espacial y la acetilación de la histona 3 en el cerebro.  
Supervisor: Marisol Lamprea. M.Sc., Ph.D.
- 2007 – 2012              BA en Psicología, Universidad Nacional de Colombia.  
Título de la tesis: efecto del bloqueo del receptor de glucocorticoides sobre el daño rápido en la memoria inducido por la corticosterona.  
Supervisor: Marisol Lamprea. M.Sc., Ph.D.

## **MÉRITOS Y GALARDONES**

- 2015                      Ganadora en convocatoria del Programa Nacional de Proyectos para el Fortalecimiento de la Investigación, la Creación y la Innovación en Posgrados, Universidad Nacional de Colombia.
- 2014                      Beca jóvenes investigadores e innovadores, COLCIENCIAS/ Universidad Nacional de Colombia.
- 2013                      Excención de pago de derechos académicos correspondientes a la matrícula de postgrado por mejor promedio aritmético ponderado acumulado, Universidad Nacional de Colombia.
- 2013                      Beca profesor asistente, Universidad Nacional de Colombia.
- 2013                      Beca Women in World Neuroscience-IBRO, International Brain Research Organization.
- 2012                      Ganadora en convocatoria de investigación “Orlando Fals Borda”, Universidad Nacional de Colombia.

- 2012 Ganadora en convocatoria semilleros de investigación y creación de la dirección de investigación de Bogotá (DIB), cuarto corte, modalidad 2, Universidad Nacional de Colombia.
- 2008 Matrícula de Honor, Universidad Nacional de Colombia.
- 2007 Excención del pago de derechos de matrícula, Universidad Nacional de Colombia.

### INTERESES DE INVESTIGACIÓN

- Neuroepigenética
- Formación de la memoria a largo plazo
- Efectos del estrés sobre los procesos de memoria
- Mecanismos de acción de los glucocorticoides
- Psicología comparada

### EXPERIENCIA EN INVESTIGACIÓN

- 2015 **Asistente de investigación**, Laboratory of Neuroepigenetics, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suiza.

**Proyecto:** Physiological and cellular underpinnings of remote traumatic fear memory extinction

**Líder del Proyecto:** Johannes Gräff.

Actividades desarrolladas:

- Asistencia en el entrenamiento de ratones en la tarea del condicionamiento de temor contextual
- Administración sistémica de fármacos
- Cortes de tejido cerebral
- Uso de técnicas de microscopía confocal y de luz
- Realización de análisis histológicos
- Análisis de imagen con image J
- Adquisición de bases teóricas sobre técnicas de cell sorting
- Preparación de soluciones de trabajo
- Participación en seminarios y presentaciones del grupo de investigación.

- 2013 **Asistente de investigación**, Universidad Nacional de Colombia.



**Proyecto:** Participación del neuropéptido CRF (factor liberador de corticotropina) en la modulación de los efectos del estrés en la memoria.

**Líder del Proyecto:** Marisol Lamprea. M.Sc., Ph.D.

Actividades desarrolladas:

- Realización y análisis de experimentos con modelos animales
- Administración central y sistémica de fármacos
- Extracción de tejido cerebral
- Realización de análisis histológicos

2012 **Asistente de investigación,** Universidad Nacional de Colombia.

**Proyecto:** Efectos del estrés sobre la persistencia y la reconsolidación de la memoria espacial

**Líder del Proyecto:** Marisol Lamprea. M.Sc., Ph.D.

Actividades desarrolladas:

- Registro de datos comportamentales de los sujetos experimentales

2012 **Asistente de investigación,** Universidad Nacional de Colombia.

**Proyecto:** Participación del septum medial en modular los efectos del estrés agudo en la tarea especial del laberinto de Barnes

**Líder del Proyecto:** Marisol Lamprea. M.Sc., Ph.D.

Actividades desarrolladas:

- Administración central y sistémica de fármacos

2009 **Asistente de investigación,** Universidad Nacional de Colombia.

**Proyecto:** Contraste sucesivo negativo en el sistema de conducta sexual de la rata macho

**Líder del Proyecto:** Germán Gutierréz, PhD

Actividades desarrolladas:

- Realización de experimentos y registro de datos comportamentales

2008 **Asistente de investigación,** Universidad Nacional de Colombia.

**Proyecto:** Cooperación en ratas

**Líder del Proyecto:** Arturo Clavijo. M.Sc, PhD.

Actividades desarrolladas:

- Registro de datos comportamentales

## **EXPERIENCIA DOCENTE**

- 2013                    **Asistente docente**, Universidad Nacional de Colombia.  
• Curso dictado: Introducción a la psicología  
• Sesiones magistrales  
• Instrucción y evaluación a estudiantes
- 2011                    **Instructor**, pasantía de investigación en comportamiento animal,  
Universidad Nacional de Colombia  
• Presentaciones sobre el uso de modelos animales en la  
investigación en Psicología  
• Enseñanza a estudiantes de pregrado sobre el comportamiento,  
manipulación y mantenimiento de los animales de laboratorio.  
• Enseñanza sobre manejo y registro de datos comportamentales  
usando el fftware xplorat.

## **ENTRENAMIENTO ADICIONAL**

- 2013                    Pasantía de investigación, Grupo de Neurociencias,  
Universidad de Antioquia  
Líder del Proyecto: Gloria Patricia Cardona. Bsc, Ph.D.  
Actividades desarrolladas:  
• Entrenamiento en técnicas de aislamiento de proteínas  
• Entrenamiento en técnicas de inmunomarcaje
- 2013                    Curso de Neurobiología de la ansiedad y la depresión: Aspectos  
básicos y clínicos. Asociación Colombiana de Neurociencias  
(COLNE)
- 2014                    Curso de neurociencia experimental, Universidad del Tolima  
“Microdiálisis cerebral: de la teoría a la práctica. Universidad del  
Tolima
- 2012                    Curso de Neurociencias y etología. Asociación Colombiana de  
Neurociencias (COLNE)

- 2011 Curso de entrenamiento en bioterios y modelos animales en la investigación. Fundación Universitaria Konrad Lorenz. Dirección de salud y bienestar animal
- 2011 Neurociencia cognoscitiva de la memoria. Universidad Nacional de Colombia.

## **PUBLICACIONES**

### **Presentaciones de posters**

Estrés y recobro de la memoria de evitación inhibitoria en el laberinto en T elevado. The 17th Biennial Meeting of the International Society for Comparative Psychology. Septiembre 10–12, 2014. Bogotá.

Efectos del estres agudo en dos periodos de consolidacion sobre el recobro de la memoria espacial en ratas wistar. IX Congreso nacional / Seminario de neurociencias internacional. Mayo 15-17. 2014. Cartagena de Indias.

Bloqueo del receptor de glucocorticoides (GR) y déficit en la recuperación de la memoria inducido por la corticosterona. III congreso de psicología COLPSIC – ASCOFAPSI. Septiembre 5-7. 2013. Bogotá.

## **MEMBRESÍAS PROFESIONALES**

- 2010- Presente Grupo de investigación de Neurofisiología comportamental, Universidad nacional de Colombia

## **LENGUAJE**

Habilidades intermedias en inglés

## **HABILIDADES TÉCNICAS**

Cirugía estereotáxica en ratas  
Farmacología básica  
Administración intracerebral and sistémica de fármacos  
Evaluación y análisis de datos comportamentales en diferentes tareas  
Análisis por inmunohistoquímica



## Bibliografía

- Abel, T., & Lattal, M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, *11*, 180–187.
- Abrari K1, Rashidy-Pour A, Semnanian S, Fathollahi Y, Jadid M. (2009). Post-training administration of corticosterone enhances consolidation of contextual fear memory and hippocampal long-term potentiation in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *91*(3), 260-265. doi: 10.1016/j.nlm.2008.10.008
- Acosta, M. A (2008). *Determinación de niveles de corticosterona en rattus norvegicus sometidas a estrés agudo por restricción de movimientos*. Manuscrito no publicado, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Adwan, L., & Zawia, N. (2013). Epigenetics: A novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacology & Therapeutics*, *139*, 41–50
- Aguado, L. (2001). Aprendizaje y Memoria. *Revista de Neurología*, *32*, 373-381.
- Aimone, J. B., Deng, W., & Gage, F. H. (2011). Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron*, *70*, 589-596. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.010.
- Akirav, I., & Richter-Levin, G. (1999). Biphasic modulation of hippocampal plasticity by behavioral stress and basolateral amygdala stimulation in the rat. *The Journal of Neuroscience*, *19*(23), 10530–10535.

- Akirav, I., Sandi, C., & Richter-Levin, G. (2001). Differential activation of hippocampus and amygdala following spatial learning under stress. *European Journal of Neuroscience*, *14*, 719-725.
- Alarcón J. M., Malleret, G., Touzani, K., Vronskaya, S., Ishii, S., Kandel, E.R., Barco, A. (2004) Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP<sup>+/-</sup> mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron*, *42*(6), 947-959.
- Almaguer-Melian, W., Bergado-Rosado, J., Pavón-Fuentes, N., Alberti-Amador, E., Mercerón-Martínez, D. & Frey, J.U. (2012). Novelty exposure overcomes foot shock-induced spatial-memory impairment by processes of synaptic-tagging in rats. *PNAS*, *109*(3), 953-958.
- Amaral, D., & Lavenex, P. (2007). Hippocampal Neuroanatomy. En Andersen, P., Morris, R., Amaral, D; Bliss, T., & O'Keefe, J. (Eds.). *The Hippocampus Book*. (pp. 37-109). New York: Oxford University Press, Inc.
- Anisman, H., Hayley, S., Kelly, O., Borowski, T., Merali, Z. (2001). Psychogenic, neurogenic and systemic stressor effects on plasma corticosterone and behavior: mouse strain-dependent outcomes. *Behavioral Neuroscience*, *115*, 443-454.
- Antle, M., Mistlberger, R. (2005). Circadian rhythms. En Whishaw, I., & Kolb, B. *The behavior of the laboratory rat. A handbook with test*. (pp. 183-194). New York: Oxford University Press.
- Astur, R., Taylor, L., Mamelak, A., Philpott, L., & Sutherland, R. (2002). Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task. *Behavioural Brain Research*, *132*, 77-84.
- Atkinson, R.C., Shiffrin, R.M. (1968). Human Memory: A proposed system and its control processes. En Spence, K.W., & Spence, J.T. *The psychology of learning and motivation*. Vol. 2. (pp. 89-195). New York: Academic Press.

- 
- Babb, S.J., & Crystal, J.D. (2005). Discrimination of what, when, and where: Implications for episodic-like memory in rats. *Learning and Motivation*, *36*, 177–189.
- Baddeley, A.D. (2004). The psychology of memory. In Baddeley, D., Kopelman, M., & Wilson, B. (Eds.). *The essential handbook of memory disorders for clinicians*. (pp. 1-13). England: John Wiley & sons Ltd.
- Barnes, C. A. (1979). Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, *93*, 74–104.
- Barrett, R.M., Malvaez, M., Kramar, E., Matheos, D.P., Arrizon, A., Cabrera, S.M.,... Wood, M.A. (2011). Hippocampal focal knockout of CBP affects specific histone modifications, long-term potentiation, and long-term memory. *Neuropsychopharmacology*, *36*, 1545-1556. doi: 10.1038/npp.2011.61.
- Bartsch, T., Döhring, J., Rohr, A., Jansen, O., & Deuschl, G. (2011). CA1 neurons in the human hippocampus are critical for autobiographical memory, mental time travel, and auto-noetic consciousness. *PNAS*, *108*(42), 17562–17567. doi: 10.1073/pnas.1110266108
- Bass, D. I. & Manns, J. R. (2015). Memory-Enhancing Amygdala Stimulation Elicits Gamma Synchrony in the Hippocampus. *Behavioral Neuroscience* *129* (3), 244-256
- Beldjoud, H., Barsegyan, A., & Roozendaal, B. (2015). Noradrenergic activation of the basolateral amygdala enhances object recognition memory and induces chromatin remodeling in the insular cortex. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *9*(108), 1-11. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00108.
- Berger, S.L., Kouzarides, T., Shiekhhattar, R., & Shilatifard, A. (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes & Development*, *23*, 781-783.

- Beylin, A., Shors, T. (2003). Glucocorticoids are necessary for enhancing the acquisition of associative memories after acute stressful experience. *Hormones and Behavior*, 43, 124–131.
- Bilang-Bleuel, A., Ulbricht, S., Chandramohan, Y., De Carli, S., Droste, S. K., & Reul, J. M. (2005). Psychological stress increases histone H3 phosphorylation in adult dentate gyrus granule neurons: involvement in a glucocorticoid receptor-dependent behavioural response. *European Journal of Neuroscience*, 22(7), 1691-1700.
- Bird, L.R., Roberts, W.A., Abroms, B., Kit, K.A. & Crupi, C. (2003) Spatial memory for hidden food by rats (*Rattus norvegicus*) on the radial maze: studies of memory for where, what, and when. *Journal of Comparative Psychology*, 117(2), 176–187.
- Blaze, J., & Roth, T. (2013). Epigenetic mechanisms in learning and memory. *WIREs Cognitive Science*. 4, 105–115. doi: 10.1002/wcs.1205.
- Bohacek, J., Manuella, F., Roszkowski, M., & Mansuy, I.M. (2015). Hippocampal gene expression induced by cold swim stress depends on sex and handling. *Psychoneuroendocrinology*, 52, 1-12. doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.10.026.
- Bousiges, O., Vasconcelos, AP., Neidl, R., Cosquer, B., Herbeaux, K., Panteleeva, I.,...Boutillier, AL. (2010). Spatial Memory Consolidation is Associated with Induction of Several Lysine-Acetyltransferase (Histone Acetyltransferase) Expression Levels and H2B/H4 Acetylation-Dependent Transcriptional Events in the Rat Hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, 35, 2521–2537.
- Bridi, M., & Abel, T. (2013). Histone Modifications in the nervous system and neuropsychiatric disorders. En Sweatt, J.D., Nestler, E. J., Meaney, M. J., & Akbarian, S (Ed.), *Epigenetic regulation in the nervous system* (pp. 3-33). Oxford, UK: Elsevier Inc.
- Broadbent, N., Squire, L., & Clark, R. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *PNAS*, 101(40), 14515–14520.



- 
- Broadbent, N. J., Gaskin, S., Squire, L. R., Clark, R. E. (2009). Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learning & Memory*, 17, 5-11
- Buchanan, T. W., & Lovallo, W. R. (2001). Enhanced memory for emotional material following stress-level cortisol treatment in humans. *Psychoneuroendocrinology*, 26, 307–317.
- Burgess, N. (2006). Spatial memory: how egocentric and allocentric combine. *Trends in Cognitive Sciences*, 10(12), 551-557.
- Cahill, L., Gorski, L., & Le, K. (2003). Enhanced human memory consolidation with post-learning stress: Interaction with the degree of arousal at encoding. *Learning & Memory*, 10(4), 270-274.
- Cahill, L., & Alkire, M. T. (2003). Epinephrine enhancement of human memory consolidation: Interaction with arousal at encoding. *Neurobiology of Learning & Memory*, 79(2), 194-198.
- Cao, L., Hudson, C., & Moynihan, J. (2007). Chronic foot shock induces hyperactive behaviors and accompanying pro- and anti-inflammatory responses in mice. *Journal of Neuroimmunology*, 186, 63 – 74.
- Capaldi E.A., Robinson, G. E., & Fahrbach S.E. (1999). Neuroethology of spatial learning: The birds and the bees. *Annual Review of Psychology*, 50, 651-682
- Carlson, N. (2006). *Fisiología de la conducta*. (8va ed.). Madrid, España: Pearson/Addison Wesley.
- Carrillo-Mora, P., Giordano, M., Santamaría, A. (2009). Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural Brain Research*, 203, 151 – 164.
- Cerón, J.M. (2011). *Marcación de la proteína FosB en animales expuestos a entrenamiento o sobre-entrenamiento en el laberinto circular de Barnes*.

Manuscrito no publicado, Departamento de Psicología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

- Chamizo, V. (1990). Ratas en el Laberinto: memoria espacial y mapas cognitivos. En Aguado, L. (Ed). *Cognición comparada. Estudios Experimentales sobre la mente animal*. (pp. 117–199). Madrid: Editorial Alianza.
- Chandramohan, Y., Droste, S.K., & Reul, J.M. (2007). Novelty stress induces phospho-acetylation of histone H3 in rat dentate gyrus granule neurons through coincident signalling via the N-methyl- D -aspartate receptor and the glucocorticoid receptor: relevance for c-fos induction. *Journal of Neurochemistry*, *101*(3), 815-828.
- Chandramohan, Y., Droste, S.K., Arthur, J. S., & Reul, J. (2008). The forced swimming-induced behavioural immobility response involves histone H3 phospho-acetylation and c-Fos induction in dentate gyrus granule neurons via activation of the N-methyl- d -aspartate/extracellular signal-regulated kinase/mitogen- and stress-activated kinase signalling pathway. *European Journal of Neuroscience*, *27*, 2701-2713.
- Chowdhury, G. M., Fujioka, T., & Nakamura, S. (2000). Induction and adaptation of Fos expression in the rat brain by two types of acute restraint stress. *Brain Research Bulletin*, *52*(3), 171-182.
- Clayton, N., Bussey, T. J. & Dickinson, A. (2003). Can animals recall the past and plan for the future? *Nature Reviews Neuroscience*, *4*(8), 685-91.
- Clayton, N., & Dickinson, A. (1999). Scrub jays (*Aphelocoma coerulescens*) remember the relative time of caching as well as the location and content of their caches. *Journal of Comparative Psychology*, *113*, 403–416.
- Clayton, N., Yu, K., & Dickinson, A. (2001). Scrub jays (*Aphelocoma coerulescens*) form integrated memories of the multiple features of caching episodes. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *27*, 17–29.

- 
- Conrad, C. D. (2005). The relationship between acute glucocorticoid levels and hippocampal function depends upon task aversiveness and memory processing stage. *Nonlinearity in Biology, Toxicology, and Medicine*, 3, 57-78
- Conrad, C. (2010). A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 34, 742-755.
- Cordero, M. I., Merino, J. J., & Sandi, C. (1998). Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 112(4), 885-891.
- Corrêa, S. A., Hunter, C. J., Palygin, O., Wauters, S. C., Martin, K. J., McKenzie, C., ... Frenguelli, B. G. (2012). MSK1 regulates homeostatic and experience-dependent synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience*, 32(38), 13039-13051.
- Covault, J., Sealy, L., Schnell, R., Shires, A., & Chalkley, R. (1982). Histone Hypoacetylation Following Release of HTC Cells from Butyrate. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(10), 5809-5815
- Covington, H. E., Maze, I., LaPlant, Q. C., Vialou, V. F., Ohnishi, Y. N., Berton O, ... Nestler, E. J. (2009). Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. *The Journal of Neuroscience* 29, 11451-11460.
- Crosio, C., Heitz, E., Allis, C.D., Borrelli, E., Sassone-Corsi, P. (2003). Chromatin remodeling and neuronal response: multiple signaling pathways induce specific histoneH3 modifications and early gene expression in hippocampal neurons. *Journal of Cell Science*, 116(24), 4905-4914.
- Crystal, J. D. (2010). Episodic-like memory in animals. *Behavioural Brain Research*, 215(2), 235-243. doi:10.1016/j.bbr.2010.03.005.

- Cui, H., Sakamoto, H., Higashi, S., & Kawata, M. (2008). Effects of single-prolonged stress on neurons and their afferent inputs in the amygdala. *Neuroscience*, *152*, 703-712. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.12.028.
- Cullinan, W. E., Herman, J. P., Battaglia, D. F., Akil, H., & Watson, S. J. (1995). Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*, *64*(2), 477-505.
- Dagnas, M., & Mons, N. (2013). Region- and age-specific patterns of histone acetylation related to spatial and cued learning in the water maze. *Hippocampus*, *23*(7), 581-591. doi: 10.1002/hipo.22116.
- Dayas, C. V., Buller, K. M., Crane, J. W., Xu, Y., & Day, T. A. (2001) Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *European Journal of Neuroscience*, *14*(7), 143-1152.
- Dash, P.K., Orsi, S.A., & Moore, A.N. (2009).Histone deactylase inhibition combined with behavioral therapy enhances learning and memory following traumatic brain injury. *Neuroscience*, *163*(1),1-8. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.06.028.
- Daumas, S., Halley, H., Francés, B., & Lassalle, J. M. (2005). Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learning & Memory*, *12*, 375-382.
- De Kloet, E. (2013). Functional profile of the binary brain corticosteroid receptor system: Mediating, multitasking, coordinating, integrating. *European Journal of Pharmacology*, *719*(1-3), 53-62
- De Kloet, E., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: From adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*, 463 – 475.
- De Kloet, E., Oitzl, M., & Joëls M. (1999). Stress and cognition: Are corticosteroids good or bad guys? *Trends in Neurosciences*, *22* (10), 422-426.

- 
- De Quervain, D. J., Roozendaal, B., Nitsch, R. M., McGaugh, J. L., & Hock, C. (2000). Acute cortisone administration impairs retrieval of long-term declarative memory in humans. *Nature Neuroscience*, 3(4), 313-4.
- De Lima, M., Luft, T., Roesler, R., & Schröder, N. (2006). Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neuroscience Letters*, 405, 142–146.
- De Rijk, R., Kitraki, E., & De Kloet, E. (2010). Corticosteroid hormones in stress and anxiety-role of receptor variants and environmental inputs. En Soreq, H., Friedman, A., & Kaufer, D. (Eds.). *Stress- From Molecules to Behavior* (pp.119-150). Alemania: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Derks, N. M., Müller, M., Gaszner, B., Tilburg-Ouwens, D. T., Roubos, E. W., & Kozicz, L. T. (2008). Housekeeping genes revisited: different expressions depending on gender, brain area and stressor. *Neuroscience*, 156, 305-309.
- Diamond, D. M., Bennett, M. C., Fleshner, M., & Rose, G. M. (1992). Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. *Hippocampus*, 2(4), 421-430.
- Dibner, C., Schibler, U., & Albrecht, U. (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual Review of Physiology*, 72, 517-49. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135821
- Dielenberg, R., Carrive, P; & McGregor, I. (2001). The cardiovascular and behavioral response to cat odor in rats: unconditioned and conditioned effects. *Brain Research*, 897, 228–237.
- Domes, G., Heinrichs, M., Reichwald, U., & Hautzinger, M. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity to psychological stress and memory in middle-aged women: High responders exhibit enhanced declarative memory performance. *Psychoneuroendocrinology*, 27(7), 843-853.

- Domjan, M. (2010). *Principles of learning and behavior*. (6th ed.). USA: Cengage/Wadsworth.
- Donley, M.P., Schulkin, J., & Rosen, J.B. (2005). Glucocorticoid receptor antagonism in the basolateral amygdala and ventral hippocampus interferes with long-term memory of contextual fear. *Behavioural Brain Research*, *164*(2), 197-205.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology*, *55*, 51-86.
- Duncko, R., Cornwell, B., Cui, L., Merikangas, K. R., & Grillon, C. (2007). Acute exposure to stress improves performance in trace eyeblink conditioning and spatial learning tasks in healthy men. *Learning & Memory*, *14*(5), 329-35.
- Eichenbaum, H. (2011). *The cognitive neuroscience of memory: An introduction*. (2nd ed.). USA: Oxford University Press, Inc.
- Eichenbaum, H. & Fortin, N. (2005). Bridging the gap between brain and behavior: cognitive and neural mechanisms of episodic memory. *Journal of Experimental Analysis of Behavior*, *84*, 619-629.
- Ferbinteanu, J., Ray, C., & McDonald, R. (2003). Both dorsal and ventral hippocampus contributes to spatial learning in Long-Evans rats. *Neuroscience Letters*, *345*, 131-135.
- Ferland, C. L., & Schrader, L. A. (2011). Regulation of histone acetylation in the hippocampus of chronically stressed rats: a potential role of sirtuins. *Neuroscience*, *174*, 104-114.
- Figueiredo, H., Bodie, B., Tauchi, M., Dolgas, M., Herman, J. (2003). Stress integration after acute and chronic predator stress: Differential activation of central stress circuitry and sensitization of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis. *Endocrinology*, *144*(12), 5249-5258.

- 
- Fleischmann, A., Hvalby, O., Jensen, V., Strekalova, T., Zacher, C., Layer, L.E.,...Gass, P. (2003). Impaired Long-Term Memory and NR2A-Type NMDA-Receptor-Dependent Synaptic Plasticity in Mice Lacking c-Fos in the CNS. *The Journal of Neuroscience*, 23(27), 9116–9122.
- Fontán-Lozano, A., Romero-Granados, R., Troncoso, J., Múnera, A., Delgado-García, J.M., & Carrión, A.M. (2008). Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 39(2), 193-201. doi: 10.1016/j.mcn.2008.06.009.
- Foster, D., & Knierim, J. (2012). Sequence learning and the role of the hippocampus in rodent navigation. *Current Opinion in Neurobiology*, 22, 294–300.
- Fox, G., Fan, L., LeVasseur, R. & Fadden, A. (1998). Effect of traumatic brain injury on mouse spatial and non-spatial learning in the Barnes circular maze. *Journal of neurotrauma*, 15(12), 1037-1046.
- Frankland, P. W., & Bontempi, B. (2005).The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(2):119-30.
- Fulford, A., Harbuz, M. (2005). An introduction to the HPA axis. En Whishaw, I., & Kolb, B. *The behavior of the laboratory rat. A handbook with test.* (pp. 43-65). New York. Oxford University Press.
- Gal-Ben-Ari, S., Kenney, J.W., Ounalla-Saad, H., Taha, E., David, O., Levitan, D., ... Rosenblum K. (2012). Consolidation and translation regulation. *Learning and Memory*, 19(9), 410-22. doi: 10.1101/lm.026849.112
- Galliot, E., Levailant, M., Beard, E., Millot, J., & Pourié, G. (2010).Enhancement of spatial learning by predator odor in mice: Involvement of amygdala and hippocampus. *Neurobiology of learning and memory*, 93, 196-202.

- Garcia, R., Musleh, W., Tocco, G., Thompson, R. F., Baudry, M. (1997). Time-dependent blockade of STP and LTP in hippocampal slices following acute stress in mice. *Neuroscience Letters*, 233, 41-44.
- Gass, P., Herdegen, T., Bravo, R., & Kiessling, M. (1992). Induction of immediate early gene encoded proteins in the rat hippocampus after bicuculline-induced seizures: differential expression of KROX-24, FOS and JUN proteins. *Neuroscience*, 48(2), 315-324.
- Gilbert, S. F. (1991). Epigenetic landscaping: Waddington's use of cell fate bifurcation diagrams. *Biology and Philosophy*, 6(2), 135-154.
- Gluck, M., Mercado, E., & Myers, C. (2008). *Learning and Memory: From Brain to Behavior*. New York: Worth.
- Gong, S., Miao, Y. L., Jiao, G. Z., Sun, M. J., Li, H., Lin, J., ... Tan, J. H. (2015). Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. *Plos One*, 10(2), 1-14.
- Good, M. (2002). Spatial memory and hippocampal function: where are we now? *Psicológica*, 23, 09–138.
- Gräff, J., & Tsai, L. H. (2013). Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nature reviews neuroscience*, 14, 97-111.
- Gräff, J., Woldemichael, B.T., Berchtold, D., Dewarrat, G., & Mansuy, I.M. (2012). Dynamic histone marks in the hippocampus and cortex facilitate memory consolidation. *Nature Communications*, 3, 1-8. doi: 10.1038/ncomms1997
- Groeneweg, F., Karst, H., de Kloet, R., & Joëls, M. (2011). Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *Journal of Endocrinology*, 209, 153–167.
- Guan, Z., Giustetto, M., Lomvardas, S., Kim, J.H., Miniaci, M.C., Schwartz, J.H., T...Kandel, E.R. (2002). Integration of long-term-memory-related synaptic



---

plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell*, *111*(4), 483-93.

- Gutiérrez-Mecinas, M., Trollope, A. F., Collins, A., Morfett, H., Hesketh, S. A., Kersanté, F., & Reul, J. M. (2011). Long-lasting behavioral responses to stress involve a direct interaction of glucocorticoid receptors with ERK1/2-MSK1-Elk-1 signaling. *PNAS*, *108*(33), 13806-13811.
- Guzman-Karlsson, M. C., Meadows, J.P., Gavin, C. F., Hablitz, J. J., & Sweatt, J. D. (2014). Transcriptional and epigenetic regulation of Hebbian and non-Hebbian plasticity. *Neuropharmacology*, *80*, 3-17. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.01.001
- Haettig, J., Stefanko, D. P., Multani, M. L., Figueroa, D. X., McQuown, S. C., & Wood, M. A. (2011). HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a CBP-dependent manner. *Learning & Memory*, *18*(2), 71-79. doi: 10.1101/lm.1986911.
- Haist, F., Bowden, Gore. J., & Mao, H. (2001). Consolidation of human memory over decades revealed by functional magnetic resonance imaging. *Nature Neuroscience*, *4*(11), 1139-1145.
- Han, F., Ozawa, H., Matsuda, K., Nishi, M., & Kawata, M. (2004). Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus. *Neuroscience research*, *51*, 371-381.
- Habib, K., Gold, P., & Chrousos, G. (2001). Neuroendocrinology of stress. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, *30*(3), 695-728.
- Halsall, J. A., Turan, N., Wiersma, M., Turner, B. M. (2015). Cells adapt to the epigenomic disruption caused by histone deacetylase inhibitors through a coordinated, chromatin-mediated transcriptional response. *Epigenetics & Chromatin*, 8-29. 10.1186/s13072-015-0021-9

- Harrison, F. E., Hosseini, A. & McDonald, M. (2009). Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behavioural Brain Research*, 198(1), 247-251.
- Harrison, F. E., Reiserer, R. S., Tomarken, A. J., & McDonald, M. P. (2006). Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learning & Memory*, 13(6):809-819. doi/10.1101/lm.334306.
- Hartman, K.N., Pal, S.K., Burrone, J., & Murthy, V.N. (2006). Activity-dependent regulation of inhibitory synaptic transmission in hippocampal neurons. *Nature Neuroscience*, 9, 642–649.
- Herman, J., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C., & Cullinan, W.E. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo–pituitary–adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 24, 151–180.
- Herman, J., & Cullinan, W. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. *Trends Neuroscience*, 20(2), 78-84.
- Hu, SC., Chrivia, J., & Ghosh A. (1999). Regulation of CBP-Mediated Transcription by Neuronal Calcium Signaling. *Neuron*, 22, 799–808.
- Huff, N. C., Frank, M., Wright-Hardesty, K., Sprunger, D., Matus-Amat, P., Higgins, E., & Rudy, J. W. (2006). Amygdala regulation of immediate-early gene expression in the hippocampus induced by contextual fear conditioning. *The Journal of Neuroscience* 26(5),1616-1623.
- Huff, M. L., Miller, R. L., Deisseroth, K., Moorman, D. E., & LaLumiere, R. T. (2013). Posttraining optogenetic manipulations of basolateral amygdala activity modulate consolidation of inhibitory avoidance memory in rats. *PNAS*, 110(9), 3597-3602.
- Hunter, R. G., McCarthy, K. J., Milne, T.A., Pfaff, D. W., & McEwen, B. S. (2009). Regulation of hippocampal H3 histone methylation by acute and chronic stress. *PNAS*, 106(49), 20912- 20917. doi: 10.1073/pnas.0911143106

- Igaz, L.M., Vianna, M.R., Medina, J.H., & Izquierdo I. (2002). Two Time Periods of Hippocampal mRNA Synthesis Are Required for Memory Consolidation of Fear-Motivated Learning. *The Journal of Neuroscience*, 22(15), 6781–6789.
- Izquierdo, I., Bevilacqua, L.R., Rossato, J. I., Bonini, J. S, Medina, J. H., & Cammarota, M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in Neurosciences*, 29(9), 496-505.
- Jablonka, E., & Lamb, M. J. (2005). *Evolution in Four Dimensions. Genetic, epigenetic, behavioral, and symbolic variation in the history of life*. USA: The MIT Press
- Jacobs, L.F. (2003). The evolution of the cognitive map. *Brain, Behavior and Evolution*, 62(2), 128-39.
- Jelici, M., Geraerts, E., Merckelbach, H., & Guerrieri, R. (2004). Acute stress enhances memory for emotional words, but impairs memory for neutral words. *International Journal of Neuroscience*, 114(10), 1343-1351.
- Jenuwein, T., Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*. 293(5532), 1074-80.
- Jodar, L., Takahashi., M., & Kaneto., H. (1995). Effects of footshock-, psychological- and forced swimming-stress on the learning and memory processes: involvement of opioidergic pathways. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 67(2), 143-147.
- Joëls, M. (2006). Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. *Trends in pharmacological sciences*, 27(5), 243-250.
- Joëls, M., Pu, Z., Wiegert, O., Oitzl, M., & Krugers, H. (2006). Learning under stress: How does it work? *Trends in Cognitive Sciences*, 10 (4), 152 – 158.
- Johansen, J., Cain, C., Ostroff, L., & LeDoux, J. E. (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, 147, 509-524.

- Kandel, E.R, Schwartz, J., & Jessell, T. (Eds.). (2000). *Principles of Neural Science* (4th ed.). USA: MGrav-Hill.
- Kant, G. J., Mougey, E. H., Pennington, L. L., & Meyerhoff, J. L. (1983). Graded footshock stress elevates pituitary cyclic AMP and plasma beta-endorphin, beta-LPH corticosterone and prolactin. *Life Sciences*, 33, 2657-2663.
- Karst, H., Berger, S., Erdmann, G., Schütz, G., & Joëls, M. (2010). Metaplasticity of amygdalar responses to the stress hormone corticosterona. *PNAS*, 107(32),14449-14454. doi: 10.1073/pnas.0914381107
- Katan-Khaykovich, Y., & Struhl, K. (2002). Dynamics of global histone acetylation and deacetylation in vivo: rapid restoration of normal histone acetylation status upon removal of activators and repressors. *Genes & Development* 16(6), 743-752.
- Kellogg, R.T. (2003). Learning, knowing and remembering. En Kellogg, R.T. *Cognitive psychology*. (2nd ed.). (pp. 147-232). USA: Sage publications, Inc.
- Kenworthy, C. A., Sengupta, A., Luz, S. M., Ver Hoeve, E. S., Meda, K., Bhatnagar, S., & Abel, T. (2014). Social defeat induces changes in histone acetylation and expression of histone modifying enzymes in the ventral hippocampus, prefrontal cortex, and dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*, 264, 88-98. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.01.024.
- Kesner, R. P. (2007). A behavioral analysis of dentate gyrus function. *Progress in Brain Research*, 163, 567-576.
- Khaksari, M., Rashidy-Pour, A., & Vafae, A. (2007). Central mineralocorticoid receptors are indispensable for corticosterone-induced impairment of memory retrieval in rats. *Neuroscience*, 149,729–738.
- Kim, J., & Diamond, D. (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 3, 453 – 462.

- Kim, J. J., Lee, H. J., Han, J. S., & Packard, M.G. (2001). Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. *The Journal of Neuroscience*, 19,1887-1894.
- Kirby, L.G., Chou-Green, J.M., Davis, K., & Lucki, I. (1997). The effects of different stressors on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Research*, 760, 218–230.
- Koolhaas, J., de Boer, S, & Buwalda, B. (2005). Stress. En Whishaw, I., & Kolb, B. (Eds.). *The behavior of the laboratory rat. A handbook with test.* (pp. 236-244). New York: Oxford University Press.
- Korb, E., Wilkinson, C. L., Delgado, R. N., Lovero, K. L., & Finkbeiner, S. (2013). Arc in the nucleus regulates PML-dependent GluA1 transcription and homeostatic plasticity. *Nature Neuroscience*, 16(7), 874-883. doi: 10.1038/nn.3429
- Korzus, E., Rosenfeld, M. G., & Mayford, M. (2004). CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron*, 42(6), 961-72.
- Kuhlmann, S., Piel, M., & Wolf, O.T. (2005). Impaired memory retrieval after psychosocial stress in healthy young men. *The Journal of Neuroscience*, 25(11), 2977-82.
- Kumaran, D., &Maguire, E. (2005). The human hippocampus: Cognitive maps or relational Memory? *The Journal of Neuroscience*, 25(31), 7254–7259.
- Kvetnansky, R., Sabban, E. L., & Palkovits, M. (2009 ). Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiological Reviews*, 89(2), 535-606. doi: 10.1152/physrev.00042.2006.
- Landry, C., Kandel, E., & Rajasethupathy, P. (2013). New mechanisms in memory storage piRNAs and epigenetics. *Cell*, 36(9), 535-542.
- Lamprecht, R., & LeDoux, J. E. (2004). Structural plasticity and memory. *Nature Reviews of Neuroscience*, 5, 45-54.

- LeDoux, J. (2007). The amygdala. *Cell current Biology*, 17 (20), 868-874
- Lee, P. R., Cohen, J.E., Becker, K. G., Fields, R. D. (2005). Gene expression in the conversion of early-phase to late-phase long-term potentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1048, 259-271
- Levenson, J., O'Riordan, K., Brown, k, Trinh, M., Molfese, D., & Sweatt, D. (2004) Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 40545-40559.
- Levine, S. (2005). Stress: an historical perspective. En Steckler, T., Kalin, N., & Reul, J. (Eds.). *Handbook of stress and the brain*. (pp. 3-23). Amsterdam: Elsevier BV.
- Li, X., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., & O'Malley, B. W. (2003) Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Molecular and Cellular Biology*, 23(11), 3763-3773. doi: 10.1128/mcb.23.11.3763-3773.2003
- Linthorst, A. (2005). Stress, corticotropin-releasing factor and serotonergic neurotransmission. En Steckler, T., Kalin, N., & Reul, J. (Eds.). *Handbook of stress and the brain*. (pp. 503-519). Amsterdam: Elsevier BV.
- Lipsky, L. (2013). Epigenetic mechanisms regulating learning and long-term memory. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 31 (6), 353-358.
- Lithner, C. U., Lacor, P. N., Zhao, W. Q., Mustafiz, T., Klein, W. L., Sweatt, J. D., Hernandez, C. M. (2013). Disruption of neocortical histone H3 homeostasis by soluble A $\beta$ : implications for Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 34(9), 2081-2090 doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.12.028
- Lopez-Atalaya, J. P., Barco, A.2. (2014). Can changes in histone acetylation contribute to memory formation? *Trends in Genetics*, 30(12), 529-539 doi: 10.1016/j.tig.2014.09.003.

- 
- Lo, W., Trievel, R., Rojas, J., Duggan, L., Hsu, J., Allis, ... Berger, S. (2000) Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to GCN5-mediated acetylation at lysine 14. *Molecular Cell*, 5, 917–926.
- Lombardo, K. A., Herringa, R. J., Balachandran, J. S., Hsu, D. T., Bakshi, V. P., Roseboom, P. H., & Kalin, N. H. () Effects of acute and repeated restraint stress on corticotropin-releasing hormone binding protein mRNA in rat amygdala and dorsal hippocampus. *Neuroscience Letters*, 302(2-3), 81-84.
- Lubin, F., Roth, T., & Sweatt, D. (2008). Epigenetic Regulation of bdnf Gene Transcription in the Consolidation of Fear Memory. *The Journal of neuroscience*, 28(42), 10576–10586.
- Ma, Y., Wang, H., Wu, H., Wei, C., & Lee, Y. (1998). Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats. *Neuroscience*, 82(4), 957–967.
- Maguire, E.A. (2014). Memory consolidation in humans: new evidence and opportunities. *Experimental Physiology*, 99(3):471-486.
- Maguire, E., Woollett, K., & Spiers, H. (2006). London taxi drivers and bus drivers: a structural MRI and neuropsychological analysis. *Hippocampus* 16 (12), 1091–1101.
- Makino, S., Hashimoto, K., & Gold, P. (2002). Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 73, 147–158.
- Marr, D. (1970). A theory for cerebral neocortex. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 176, 161–234
- Martinez, J., Thompson, K., & Sikorsi, A. (2007). Gene expression in learning and memory. En Kesner, R.P. & Martínez, J.L. *Neurobiology of Learning and Memory*. (2dn ed.). (pp.129-153). Hong Kong: Elsevier Inc.
- McGaugh, J. L. (2000). Memory, a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248-251.

- McIntyre, C. K., Hatfield, T., & McGaugh, J.L. (2002). Amygdala norepinephrine levels after training predict inhibitory avoidance retention performance in rats. *European Journal of Neuroscience*, 16, 1223-1226.
- McIntyre, C. K., Miyashita, T., Setlow, B., Marjon, K. D., Steward, O., Guzowski, J. F., & McGaugh, J. L. (2005). Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of Arc protein in the hippocampus. *PNAS*, 102(30), 10718-10723.
- Mclay, R., Freeman, s., & Zadina, J. (1998). Chronic corticosterone impairs memory performance in the Barnes Maze. *Physiology & Behavior*, 63(5), 933–937.
- Michaelis, E. K.(2012). Selective Neuronal Vulnerability in the Hippocampus: Relationship to Neurological Diseases and Mechanisms for Differential Sensitivity of Neurons to Stress. En Bartsch, T. (Ed.). *The Clinical Neurobiology of the Hippocampus: An integrative view*. (pp.50-67). UK: Oxford University Press
- Mifsud, K.R., Gutiérrez-Mecinas, M., Trollope, A.F., Collins, A., Saunderson, E.A. & Reul, J.M. (2011). Epigenetic mechanisms in stress and adaptation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25, 1305-1315. doi: 10.1016/j.bbi.2011.06.005
- Miller, C., & Sweatt, J.D. (2007). Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron*, 53, 857–869.
- Milner, B., Squire, L.R., & Kandel, E.R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20(3), 455-468.
- Mizoguchi, K., Ishige, A., Aburada, M., & Tabira, T. (2003). Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*, 119, 887–897.
- Molina, N., Suter, D. M., Cannavo, R., Zoller, B., Gotic, I., & Naef, F. (2013). Stimulus-induced modulation of transcriptional bursting in a single mammalian gene. *PNAS*, 110(51), 20563–20568



- 
- Morris, R. G. (2001). Episodic-like memory in animals: psychological criteria, neural mechanisms and the value of episodic-like tasks to investigate animal models of neurodegenerative disease. *Philosophical transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 356, 1453-1465.
- Muñoz, P., Aspé, M., Contreras, L., & Palacios, A. (2010). Correlations of recognition memory performance with expression and methylation of brain-derived neurotrophic factor in rats. *Biological research*, 43, 251-258.
- Nadela, L., & Moscovitch, M. (1997). Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Current Opinion in Neurobiology*, 7(2), 217–227. Olton, D. (1977). *Spatial memory*. *Scientific American*, 236, 82-98.
- Nader, K., Majidishad, P., Amorapanth, P., & LeDoux, J.E. (2001). Damage to the lateral and central, but not other, amygdaloid nuclei prevents the acquisition of auditory fear conditioning. *Learning & Memory*, 8(3), 156-63.
- Nair, A., Vadodaria, K. C, Banerjee, S. B., Benekareddy, M., Dias, B. G., Duman, R. S., & Vaidya, V. A. (2007). Stressor-specific regulation of distinct brain-derived neurotrophic factor transcripts and cyclic AMP response element-binding protein expression in the postnatal and adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. 32, 1504-1519.
- Nakao, K., Matsuyama, K., Matsuki, N., & Ikegaya, Y. (2004). Amygdala stimulation modulates hippocampal synaptic plasticity. *PNAS*, 101(39), 14270-14275
- Okuda, S., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (2004). Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. *PNAS*, 101(3), 853-8
- Olucha-Bordonau, F. E., Fortes-Marco, L., Otero-García, M., Lanuza, E., Martínez-García, F. (2015). Amygdala: Structure and Function. En Paxinos, G. (Eds.). *The rat nervous system*. (441-490). China: Elsevier Inc

- Ons, S., Martí, O., & Armario, A. (2004) Stress-induced activation of the immediate early gene Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) is restricted to telencephalic areas in the rat brain: relationship to c-fos mRNA. *Journal of Neurochemistry*, 89(5):1111-8.
- Ortíz-Montero, P. (2011). Estrés agudo en ratas y su efecto en la adquisición, consolidación y extinción de la memoria espacial: papel de la proteína quinasa erk1/2 y de las proteínas fosfatasas pp1 y pp2b en el hipocampo. Manuscrito no publicado, Departamento de medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Pacák, K., & Palkovits, M. (2001). Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress- Related Disorders. *Endocrine Reviews*, 22(4), 502- 54.
- Packard, M. G., Cahill, L., & McGaugh, J. L. (1994). Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes. *PNAS* 91, 8477-8481.
- Packard, M. G., & Teather, L. A. (1998). Amygdala modulation of multiple memory systems: hippocampus and caudate-putamen. *Neurobiology of Learning and Memory*, 69, 163-203.
- Paxinos, G. & Watson, C. (2008). The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney: Academic Press.
- Peleg, S., Sananbenesi, F., Zovoilis, A., Burkhardt, S., Bahari-Javan, S., Agis-Balboa, R., ... Fischer A. (2010). Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science*. 328, 753-756. doi: 10.1126/science.1186088.
- Pelletier, J. G., Likhtik, E., Filali, M., & Paré, D. (2005). Lasting increases in basolateral amygdala activity after emotional arousal: implications for facilitated consolidation of emotional memories. *Learning & Memory*, 12(2), 96-102.

- 
- Piazza, P. V., Maccari, S., Deminière, J. M., Le Moal, M., Mormède, P., & Simon, H. (1991). Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. *PNAS*, *88*, 2088-2092.
- Pinto-Ribeiro, F., Almeida, A., Pêgo, J., Cerqueira, J., & Sousa, N. (2004). Chronic unpredictable stress inhibits nociception in male rats. *Neuroscience Letters*, *359*, 73-76
- Pitkänen, A., Pikkarainen, M., Nurminen, N., & Ylinen, A. (2000). Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *11*, 369-391.
- Pozo, K., & Goda, Y. (2010). Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron*, *66*(3), 337-351. doi: 10.1016/j.neuron.2010.04.028.
- Poucet, B., Lenck-Santini, P., Paz-Villagran, V., & Save, E. (2003). Place cells, neocortex and spatial navigation: a short review. *Journal of Physiology*, *97*, 537-546.
- Prado, M. (2009). *Efectos de la inyección sistémica de corticosterona sobre la recuperación en una tarea de memoria espacial*. Manuscrito no publicado, Departamento de Psicología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Preuß, D., & Wolf, O.T. (2009). Post-learning psychosocial stress enhances consolidation of neutral stimuli. *Neurobiology of Learning and Memory* *92*, 318-326.
- Rajasekharan, P., Fiumara, F., Sheridan, R., Betel, D., Puthanveetil, S.V., Russo, J.J., ... Kandel, E. (2009). Characterization of small RNAs in *Aplysia* reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB. *Neuron*, *63*(6), 803-817. doi10.1016/j.neuron.2009.05.029

- Reber, P. J. (2008). Cognitive neuroscience of declarative and nondeclarative memory. En Aaron S. B., De Belle, J. S., Etnyre, B., & Polk, T. A. (Eds.). *Advances in Psychology*. (pp. 113–123). North-Holland: Elsevier ltd.
- Redish, A. D. (1999). *Beyond the Cognitive Map: from place cells to episodic memory*. Massachusetts: MIT Press.
- Rei, D., Mason, X., Seo, J., Gräff, J., Rudenko, A., Wang, J., ...Tsai, L. H. (2015). Basolateral amygdala bidirectionally modulates stress-induced hippocampal learning and memory deficits through a p25/Cdk5-dependent pathway. *PNAS*, 112 (23) 7291–7296. doi: 10.1073/pnas.1415845112.
- Richter-Levin, G. (2004). The amygdala, the hippocampus, and emotional modulation of memory. *Neuroscientist*, 10(1), 31-39.
- Rodrigues, G. M., Toffoli, L. V., Manfredo, M. H., Francis-Oliveira, J., Silva, A. S., Raquel, H. A., ... Gomes, M. V. (2015). Acute stress affects the global DNA methylation profile in rat brain: modulation by physical exercise. *Behavioural Brain Research*, 279, 123-128. doi: 10.1016/j.bbr.2014.11.023.
- Rodrigues, S. M., Schafe, G.E., & LeDoux, J .E. (2004). Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron*, 44, 75-91.
- Roesler, R., Schröder, N., Vianna, M. R., Quevedo, J., Bromberg, E., Kapczinski, F., & Ferreira, M. B. (2003). Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Research*, 975(1-2), 207-213
- Rolls, E., & Stringer, S. (2005). Spatial view cells in the hippocampus, and their idiothetic update based on place and head direction. *Neural Networks*, 18, 1229–1241.
- Roosendaal, B. (2000). Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*, 25, 213 – 238.

- 
- Roozendaal, B. (2002). Stress and memory: Opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78, 578 – 595.
- Roozendaal, B. (2003). Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27, 1213-1223.
- Roozendaal, B., Hahn, E., Nathan, S., de Quervain, D., & McGaugh, J. L. (2004). Glucocorticoid effects on memory retrieval require concurrent noradrenergic activity in the hippocampus and basolateral amygdala. *The journal of neuroscience*, 24(37), 8161- 8169.
- Roozendaal, B., Hernandez, A., Cabrera, S. M., Hagewoud, R., Malvaez, M., Stefanko, D.P., ... Wood, M. A. (2010). Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *The Journal of Neuroscience*, 30(14), 5037-5046.
- Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1997). Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. *Neurobiology of learning and memory*, 67, 176-179.
- Roozendaal, B., Okuda, S., Van der Zee, E. A., & McGaugh, J. L. (2006) Glucocorticoid enhancement of memory requires arousal-induced noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *PNAS*, 103(17),6741-6746.
- Rosenkranz, J., Venheim, E., & Padival, M. (2010). Chronic stress causes amygdala hyperexcitability in Rodents. *Biological Psychiatry*, 67, 1128-1136.
- Rosenzweig, M., & Leiman, A. (1992). *Psicología Fisiológica*. México: McGraw Hill.
- Rotllant, D., Pastor-Ciurana, J., & Armario, A. (2013) Stress-induced brain histone H3 phosphorylation: contribution of the intensity of stressors and length of exposure. *Journal of Neurochemistry*, 125, 599-609. doi: 10.1111/jnc.12214.

- Rovee-Collier, C., Hayne, H., & Colombo, M. (2000). En Rovee-Collier, C., Hayne, H., & Colombo, M. *The development of implicit and explicit memory*. (pp. 7-28). Netherlands: John Benjamins B.V.
- Sabban, E. L., & Kvetnanský, R. (2001). Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends in Neurosciences*; 24(2), 91-98
- Salehi, B., Cordero, M. I., & Sandi, C. (2010). Learning under stress: The inverted-U-shape function revisited. *Learning and Memory* 17(10), 522-30. doi: 10.1101/lm.1914110.
- Sandi, C., & Pinelo-Nava, T. (2007). Stress and memory: Behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural plasticity*, 1, 1-20. doi:10.1155/2007/78970
- Schwabe, L., Joëls, M., Roozendaal, B., Wolf, O., Oitzl, M. (2011). Stress effects on memory: An update and integration. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 36(7), 1740-1749. doi:10.1016/j.neubiorev.2011.07.002
- Schwabe, L., Tegenthoff, M., Höffken, O., & Wolf, O. T. (2013). Mineralocorticoid receptor blockade prevents stress-induced modulation of multiple memory systems in the human brain. *Biological Psychiatry*, 74(11), 801-808. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.06.001
- Schilling, T. M., Kölsch, M., Larra, M. F., Zech, C. M., Blumenthal, T.D., Frings, C., & Schächinger, H. (2013). For whom the bell (curve) tolls: cortisol rapidly affects memory retrieval by an inverted U-shaped dose-response relationship. *Psychoneuroendocrinology*, 38(9), 1565-72. doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.01.001
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676-682. doi: 10.1038/nmeth.2019.
- Schwartz, B., Colon, M., Sanchez, I., Rodriguez, I., & Evans, S. (2002). Single-trial learning of “what” and “who” information in a gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*):

- implications for episodic memory. *Animal Cognition*, 5, 85–90. doi 10.1007/s10071-002-0132-0.
- Scoville, W. & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 20(1), 11-21.
- Shahbazian M. D., & Grunstein, M. (2007). Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 75-100.
- Sheth, A., Berretta, S., Lange, N., & Eichenbaum, H. (2008). The amygdala modulates neuronal activation in the hippocampus in response to spatial novelty. *Hippocampus*, 18, 169-181.
- Shimizu, E., Tang, Y.P., Rampon, C., & Tsien, J.Z. (2000). NMDA receptor dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science*, 290, 1170–1174.
- Smeets, T., Giesbrecht, T., Jelicic, M., & Merckelbach, H. (2007). Context-dependent enhancement of declarative memory performance following acute psychosocial stress. *Biological Psychology*, 76, 116-23.
- Smeets, T., Otgaar H, Candel I, Wolf, O.T. (2008). True or false? Memory is differentially affected by stress-induced cortisol elevations and sympathetic activity at consolidation and retrieval. *Psychoneuroendocrinology*, 33, 1378-1386. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.07.009.
- Spyrka, J., Danielewicz, J., & Hess, G. (2011). Brief neck restraint stress enhances long-term potentiation and suppresses long-term depression in the dentate gyrus of the mouse. *Brain Research Bulletin*, 85, 363-367.
- Squire, L.R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory* 82, 171-177.
- Steckler, T. (2005). The neuropsychology of stress. En Steckler, T., Kalin, N., & Reul, J. (Eds.). *Handbook of stress and the brain*. (pp. 25-38). Amsterdam: Elsevier BV.

- Sternberg, R.J. (2012). *Cognitive psychology*. (6th ed.). USA: Cengage/Wadsworth.
- Steunou, A-L., Rossetto, D., & Côté, J. (2014). Regulating Chromatin by Histone Acetylation. En Workman, J. L., & Abmayr, S. (Eds.). *Fundamentals of Chromatin*. (pp.147-2012). USA: Springer science business media.
- Soriano, C., Guillazo, G., Redolar, D., Torras, M., & Vale, A. (2007). Neurociencia cognitiva. Aprendizaje y memoria. En Soriano, C., Guillazo, G., Redolar, D., Torras, M., & Vale, A. *Fundamentos de neurociencia*. (pp.335-383). España: Editorial UOC.
- Stamp, J. A., Mashoodh, R., van Kampen, J. M., & Robertson, H. A. (2008). Food restriction enhances peak corticosterone levels, cocaine-induced locomotor activity, and DeltaFosB expression in the nucleus accumbens of the rat. *Brain Research*, *1204*, 94-101. doi: 10.1016/j.brainres.2008.02.019.
- Suganuma, T., & Workman, J.L. (2011). Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Annual Review of Biochemistry* *80*, 473-499.
- Summers, M., Crowe, S., & Kim, T. (2003). Memory retrieval in the day-old chick: a psychobiological approach. *Neuroscience and Biobehavioral reviews*, *27*, 219-231
- Sweatt, J.D. (2004). Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, *14*(3), 311-317.
- Sweatt, J.D. (2009). Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system. *Biological Psychiatry*, *65*, 191-197.
- Sweat, J.D., Nestler, E. J., Meaney, M. J., & Akbarian, S. (2013). An overview of the molecular basis of epigenetics. En Sweat, J.D., Nestler, E. J., Meaney, M. J., & Akbarian, S. (Eds.). *Epigenetic regulation in the nervous system* (pp. 3-33). Oxford, UK: Elsevier Inc.
- Tasker, J., Di, S., & Malcher-Lopes, R. (2006) Minireview: Rapid Glucocorticoid Signaling via Membrane-Associated Receptors. *Endocrinology*, *147*(12), 5549–5556.



- Takahashi, L., Nakashima, B., Hong, H., & Watanabe, K. (2005). The smell of danger: A behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *29*, 1157–1167.
- Taupin, P. (2007). The hippocampus. Neurotransmission and plasticity in the nervous system. In Taupin, P. *The hippocampus. Neurotransmission and plasticity in the nervous system*. (pp. 3-12). New York: Nova science publishers, Inc.
- Teather, L.A., Packard, M. G., Smith, D.E., Ellis-Behnke, R. G., & Bazan, N. G. (2005). Differential induction of c-Jun and Fos-like proteins in rat hippocampus and dorsal striatum after training in two water maze tasks. *Neurobiology of Learning and Memory*, *84*, 75-84.
- Trollope, A., Gutiérrez-Mecinas, M., Mifsud, K., Collins, A., Saunderson, E., & Reul, J. (2012). Stress, epigenetic control of gene expression and memory formation. *Experimental Neurology*, *233*, 3-11.
- Troncoso, J., Lamprea, M., Cuestas, D., & Munera, A. (2010). El estrés agudo interfiere con la evocación y promueve la extinción de la memoria espacial en el laberinto de Barnes. *Acta Biológica Colombiana*, *15* (1), 207- 222.
- Tulving, E. (1972). Episodic and semantic memory. En Tulving, E., & Donaldson, W. (Eds.). *Organization of Memory*. (pp.381-402). New York: Academic Press.
- Tulving, E. (1993). What Is Episodic Memory? *Current Directions in Psychological Science*, *2* (3), 67-70.
- Turrigiano, G. G. (2008). The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell*, *135* (3), 422-435.
- Turrigiano, G. (2012). Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *4*, 1-17. doi: 10.1101/cshperspect.a005736

- Urueña-Méndez, G. P., & Lamprea, M. (2015). *Efectos de la inactivación de los receptores GR y MR sobre el daño rápido en la recuperación de la memoria espacial inducido por los glucocorticoides*. Manuscrito no publicado, Departamento de Psicología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- VandenBerghe, W., De Bosscher, K., Vermeulen, L., De Wilde, G., & Haegeman, G. (2002). Induction and repression of NF- $\kappa$ B-driven inflammatory genes. En Cato, A., Schacke, H. & Asadullah, K. (Eds.). *Recent advances in glucocorticoid receptor action*. (pp.233-278). New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Van Stegeren, A. H., Roozendaal, B., Kindt, M., Wolf, O. T., & Joëls, M.(2010). Interacting noradrenergic and corticosteroid systems shift human brain activation patterns during encoding. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93, 56-65
- Vargas -López, V., Lamprea, M. & Múnera, A. (2011). Characterizing spatial extinction in an abbreviated version of the Barnes maze. *Behavioural Processes*, 86(1), 30-38.
- Vecsey, C.G., Hawk, J. D., Lattal, K. M., Stein, J. M., Fabian, S.A., Attner, M.A.,... Wood, M.A. (2007). Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB: CBP-dependent transcriptional activation. *The Journal of Neuroscience*, 27(23), 6128–6140.
- Vouimba, R. M., Yaniv, D., Diamond, D., & Richter-Levin G. (2004). Effects of inescapable stress on LTP in the amygdala versus the dentate gyrus of freely behaving rats. *European Journal of Neuroscience*, 19(7),1887-1894.
- Wang, H., Hu, Y., & Tsien, Y. (2006). Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Progress in Neurobiology*, 79, 123–135
- Wang, S-H., & Morris, R. (2010). Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation and reconsolidation. *Annual Review of Psychology*, 61, 49–79.

- 
- Wang, X., & Michaelis, E. K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2(12), 1-13.
- Waterborg, J. H. (2002). Dynamics of histone acetylation in vivo. A function for acetylation turnover? *Biochemistry and Cell Biology*, 80(3), 363-78.
- Waterborg, J. H., Kapros, T. (2002). Kinetic analysis of histone acetylation turnover and Trichostatin A induced hyper- and hypoacetylation in alfalfa. *Biochemistry and Cell Biology*, 80(3), 279-293.
- Winters, B. D., Forwood, S. E., Cowell, R. A, Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2004). Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *The Journal of Neuroscience*, 24(26),5901-5908
- Wolf, O.T. (2009). Stress and memory in humans: twelve years of progress? *Brain Research*, 1293, 142–154.
- Yamada, K., McEwen, B. S., & Pavlides, C. (2003). Site and time dependent effects of acute stress on hippocampal long-term potentiation in freely behaving rats. *Experimental Brain Research*, 152, 52-59
- Yau, J. L., Noble, J., & Seckl, J. R. (2001). Acute restraint stress increases 5-HT<sub>7</sub> receptor mRNA expression in the rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 309(3),141-144.
- Young, E., Abelson, J., & Lightman, S. (2004). Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 25, 69–76.
- Zhou, M., Hoogenraad, C. C., Joëls, M., & Krugers, H. J. (2012). Combined  $\beta$ -adrenergic and corticosteroid receptor activation regulates AMPA receptor function in hippocampal neurons. *Journal of Psychopharmacology*, 26(4) 516-524. doi. 10.1177/0269881111424930.
- Zorawski, M. & Killcross, S. (2002). Posttraining glucocorticoid receptor agonist enhances memory in appetitive and aversive Pavlovian discrete-cue conditioning paradigms. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(2),458-64.

## Anexos

### Anexo1. Análisis estadístico de las variables evaluadas durante adquisición en los grupos de evaluación comportamental (Adq-PR y Adq-Est.PR)

#### 1. A. Latencia a meta

<b>Two Way Repeated Measures ANOVA (One Factor Repetition)</b>					
Dependent Variable: LATENCIA					
Normality Test:	Failed	(P < 0.050)			
Equal Variance Test:	Failed	(P < 0.050)			
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
GRUPO	1	2219.340	2219.340	2.136	0.170
SUJETO(GRUPO)	12	12470.144	1039.179		
ENSAYO	7	92882.717	13268.960	8.579	<0.001
GRUPO x ENSAYO	7	512.847	73.264	0.0474	1.000
Residual	84	129923.686	1546.711		
Total	111	238008.734	2144.223		
Multiple Comparisons versus Control Group (Holm-Sidak method): Overall significance level = 0.05					
Comparisons for factor: <b>GRUPO</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	8.903	1.461	0.170	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ENSAYO</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
adq 1 vs. adq 8	95.180	6.403	0.0000000832	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 7	94.655	6.368	0.0000000972	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 3	83.769	5.635	0.000000228	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 5	83.348	5.607	0.000000257	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 4	81.100	5.456	0.000000483	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 6	80.780	5.434	0.000000528	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 2	71.941	4.840	0.00000584	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq-PR</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
adq 1 vs. adq 8	101.222	4.815	0.000	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 7	95.974	4.565	0.000	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 5	85.530	4.069	0.000	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 6	83.819	3.987	0.000	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 4	83.258	3.961	0.000	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 3	83.070	3.952	0.000	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 7	6.857	3.656	0.000	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq-Est-PR</b>					

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
adq 1 vs. adq 7	93.336	4.440	0.000	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 8	89.138	4.240	0.000	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 3	84.469	4.018	0.000	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 5	81.166	3.861	0.000	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 4	78.942	3.755	0.000	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 6	77.741	3.698	0.000	0.025	Yes
adq 1 vs. adq	67.026	3.188	0.002	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 1</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	13.642	0.663	0.509	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 2</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	3.812	0.185	0.854	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 3</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	15.040	0.731	0.467	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 4</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	9.326	0.453	0.652	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 5</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	9.278	0.451	0.653	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 6</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	7.564	0.367	0.714	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 7</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	11.004	0.535	0.594	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 8</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	1.558	0.0757	0.940	0.050	No

## 1. B. Errores ponderados

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
GRUPO	1	2889.342	2889.342	0.0790	0.783
SUJETO(GRUPO)	12	438951.660	36579.305		
ENSAYO	7	2102355.160	300336.451	4.256	<0.001
GRUPO x ENSAYO	7	99195.903	14170.843	0.201	0.984
Residual	84	5927520.463	70565.720		
Total	111	8570912.526	77215.428		

Two Way Repeated Measures ANOVA (One Factor Repetition)  
 Dependent Variable: ERRORES PONDERADOS  
 Normality Test: Failed (P < 0.050)  
 Equal Variance Test: Passed (P = 0.060)

Multiple Comparisons versus Control Group (Holm-Sidak method):  
 Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor: **GRUPO**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	10.158	0.281	0.783	0.050	No

Comparisons for factor: **ENSAYO**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
------------	---------------	---	--------------	----------------	--------------

adq 1 vs. adq 8	464.136	4.623	0.0000136	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 7	442.111	4.403	0.0000312	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 3	282.970	2.818	0.00602	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 2	235.935	2.350	0.0211	0.013	No
adq 1 vs. adq 5	234.043	2.331	0.0221	0.017	No
adq 1 vs. adq 4	211.026	2.102	0.0386	0.025	No
adq 1 vs. adq 6	200.296	1.995	0.0493	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq-PR</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
adq 1 vs. adq 8	459.008	3.233	0.002	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 7	421.997	2.972	0.004	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 6	268.842	1.893	0.062	0.010	No
adq 1 vs. adq 3	242.018	1.704	0.092	0.013	No
adq 1 vs. adq 5	234.766	1.653	0.102	0.017	No
adq 1 vs. adq 2	220.160	1.551	0.125	0.025	No
adq 1 vs. adq 4	216.961	1.528	0.130	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq-Est-PR</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
adq 1 vs. adq 8	469.264	3.305	0.001	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 7	462.225	3.255	0.002	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 3	323.921	2.281	0.025	0.010	No
adq 1 vs. adq 2	251.711	1.773	0.080	0.013	No
adq 1 vs. adq 5	233.320	1.643	0.104	0.017	No
adq 1 vs. adq 4	205.090	1.444	0.152	0.025	No
adq 1 vs. adq 6	131.750	0.928	0.356	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 1</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	11.849	0.0861	0.932	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 2</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	19.701	0.143	0.887	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 3</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	70.054	0.509	0.612	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 4</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	23.721	0.172	0.864	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 5</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	13.296	0.0966	0.923	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 6</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	148.942	1.082	0.282	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 7</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	28.379	0.206	0.837	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 8</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	1.593	0.0116	0.991	0.050	No

## 1. C. Distancia media a meta

<b>Two Way Repeated Measures ANOVA (One Factor Repetition)</b>					
Dependent Variable: DISTANCIA MEDIA META					
Normality Test:	Passed (P = 0.493)				
Equal Variance Test:	Passed (P = 0.077)				
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
GRUPO	1	165.802	165.802	0.252	0.625
SUJETO(GRUPO)	12	7891.341	657.612		
ENSAYO	7	14530.229	2075.747	5.043	<0.001
GRUPO x ENSAYO	7	1666.876	238.125	0.578	0.772
Residual	84	34577.727	411.640		
Total	111	58831.974	530.018		
Multiple Comparisons versus Control Group (Holm-Sidak method): Overall significance level = 0.05					
Comparisons for factor: <b>GRUPO</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	2.433	0.502	0.625	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ENSAYO</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
adq 1 vs. adq 8	40.042	5.222	0.00000126	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 7	34.017	4.436	0.0000276	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 3	22.992	2.998	0.00357	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 4	20.101	2.621	0.0104	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 5	18.723	2.442	0.0167	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 2	16.116	2.102	0.0386	0.025	No
adq 1 vs. adq 6	15.428	2.012	0.0474	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq-PR</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
adq 1 vs. adq 8	33.493	3.088	0.003	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 7	20.914	1.929	0.057	0.009	No
adq 1 vs. adq 4	14.943	1.378	0.172	0.010	No
adq 1 vs. adq 5	13.867	1.279	0.205	0.013	No
adq 1 vs. adq 3	11.992	1.106	0.272	0.017	No
adq 1 vs. adq 2	6.983	0.644	0.521	0.025	No
adq 1 vs. adq 6	6.131	0.565	0.573	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq-Est-PR</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
adq 1 vs. adq 7	47.120	4.345	0.000	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 8	46.592	4.296	0.000	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 3	33.992	3.134	0.002	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 4	25.260	2.329	0.022	0.013	No
adq 1 vs. adq 2	25.249	2.328	0.022	0.017	No
adq 1 vs. adq 6	24.726	2.280	0.025	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 5	23.580	2.174	0.032	0.050	Yes

Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 1</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	12.341	1.098	0.275	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 2</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	5.925	0.527	0.599	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 3</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	9.659	0.859	0.393	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 4</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	2.024	0.180	0.858	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 5</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	2.628	0.234	0.816	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 6</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	6.254	0.556	0.579	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 7</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	13.865	1.233	0.221	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 8</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	0.758	0.0674	0.946	0.050	No

## 1. D. Distancia total recorrida

<b>Two Way Repeated Measures ANOVA (One Factor Repetition)</b>					
Dependent Variable: DISTANCIA TOTAL					
Normality Test: Failed (P < 0.050)					
Equal Variance Test: Failed (P < 0.050)					
<b>Source of Variation</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
GRUPO	1	17518.936	17518.936	1.780	0.207
SUJETO (GRUPO)	12	118094.968	9841.247		
ENSAYO	7	764240.601	109177.229	6.070	<0.001
GRUPO x ENSAYO	7	16850.611	2407.230	0.134	0.995
Residual	84	1510757.585	17985.209		
Total	111	2427462.702	21869.033		
Multiple Comparisons versus Control Group (Holm-Sidak method):					
Overall significance level = 0.05					
Comparisons for factor: <b>GRUPO</b>					



<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	25.014	1.334	0.207	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ENSAYO</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
adq 1 vs. adq 8	292.315	5.767	0.000000131	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 7	272.574	5.377	0.000000668	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 3	224.387	4.427	0.0000286	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 2	207.563	4.095	0.0000968	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 4	196.711	3.881	0.000206	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 6	191.776	3.783	0.000289	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 5	187.210	3.693	0.000393	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq-PR</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
adq 1 vs. adq 8	285.319	3.980	0.000	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 7	254.812	3.555	0.001	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 2	191.708	2.674	0.009	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 3	188.469	2.629	0.010	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 4	181.904	2.538	0.013	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 6	177.580	2.477	0.015	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 5	149.007	2.079	0.041	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq-Est-PR</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
adq 1 vs. adq 8	299.310	4.175	0.000	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 7	290.335	4.050	0.000	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 3	260.304	3.631	0.000	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 5	225.413	3.145	0.002	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 2	223.417	3.117	0.003	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 4	211.518	2.951	0.004	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 6	205.972	2.873	0.005	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 1</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	10.920	0.157	0.876	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 2</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	20.789	0.299	0.766	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 3</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	60.916	0.875	0.384	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 4</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	18.694	0.268	0.789	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 5</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	65.485	0.941	0.349	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 6</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	17.472	0.251	0.802	0.050	No

Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 7</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	24.603	0.353	0.725	0.050	No

Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 8</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	3.071	0.0441	0.965	0.050	No

## 1. E. Latencia al primer agujero

<b>Two Way Repeated Measures ANOVA (One Factor Repetition)</b>					
Dependent Variable: LATENCIA 1ER					
Normality Test: Failed (P < 0.050)					
Equal Variance Test: Passed (P = 0.406)					
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
GRUPO	1	60.311	60.311	1.567	0.234
SUJETO(GRUPO)	12	461.826	38.486		
ENSAYO	7	2709.050	387.007	15.623	<0.001
GRUPO x ENSAYO	7	108.811	15.544	0.628	0.732
Residual	84	2080.774	24.771		
Total	111	5420.772	48.836		
Multiple Comparisons versus Control Group (Holm-Sidak method): Overall significance level = 0.05					
Comparisons for factor: <b>GRUPO</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	1.468	1.252	0.234	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ENSAYO</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
adq 1 vs. adq 6	15.404	8.189	2.542E-012	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 4	15.232	8.097	3.873E-012	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 5	14.984	7.965	7.124E-012	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 7	14.953	7.949	7.683E-012	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 8	13.155	6.993	0.00000000601	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 3	10.974	5.834	0.0000000983	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 2	9.166	4.873	0.00000513	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq-PR</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
adq 1 vs. adq 4	17.037	6.404	0.000	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 6	16.266	6.114	0.000	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 7	16.050	6.033	0.000	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 5	15.321	5.759	0.000	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 8	14.274	5.365	0.000	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 2	11.816	4.441	0.000	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 3	10.238	3.848	0.000	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq-Est-PR</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
adq 1 vs. adq 5	14.646	5.505	0.000	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 6	14.542	5.466	0.000	0.009	Yes

adq 1 vs. adq 7	13.855	5.208	0.000	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 4	13.427	5.047	0.000	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 8	12.036	4.524	0.000	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 3	11.711	4.402	0.000	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 2	6.517	2.450	0.016	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 1</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	3.251	1.182	0.240	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 2</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	2.048	0.744	0.458	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 3</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	4.724	1.717	0.089	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 4</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	0.359	0.131	0.896	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 5</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	2.576	0.937	0.351	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 6</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	1.527	0.555	0.580	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 7</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	1.056	0.384	0.702	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 8</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	1.014	0.369	0.713	0.050	No

## 1F. Velocidad media

Two Way Repeated Measures ANOVA (One Factor Repetition)					
Dependent Variable: VELOCIDAD MEDIA					
Normality Test: Failed (P < 0.050)					
Equal Variance Test: Passed (P = 0.213)					
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
GRUPO	1	3.228	3.228	0.0640	0.804
SUJETO(GRUPO)	12	604.758	50.396		
ENSAYO	7	649.504	92.786	3.920	<0.001

GRUPO x ENSAYO	7	249.899	35.700	1.508	0.176	
Residual	84	1988.117	23.668			
Total	111	3495.505	31.491			
Multiple Comparisons versus Control Group (Holm-Sidak method): Overall significance level = 0.05						
Comparisons for factor: <b>GRUPO</b>						
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>	
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	0.340	0.253	0.804	0.050	No	
Comparisons for factor: <b>ENSAYO</b>						
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>	
adq 1 vs. adq 5	5.906	3.212	0.00187	0.007	Yes	
adq 1 vs. adq 7	5.622	3.057	0.00299	0.009	Yes	
adq 1 vs. adq 6	3.417	1.859	0.0666	0.010	No	
adq 1 vs. adq 4	2.604	1.416	0.160	0.013	No	
adq 1 vs. adq 8	2.079	1.131	0.261	0.017	No	
adq 1 vs. adq 2	1.334	0.725	0.470	0.025	No	
adq 1 vs. adq 3	0.713	0.388	0.699	0.050	No	
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq-PR</b>						
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>	
adq 1 vs. adq 5	6.906	2.656	0.009	0.007	No	
adq 1 vs. adq 4	2.334	0.897	0.372	0.009	No	
adq 1 vs. adq 6	2.196	0.845	0.401	0.010	No	
adq 1 vs. adq 8	1.917	0.737	0.463	0.013	No	
adq 1 vs. adq 2	1.694	0.651	0.517	0.017	No	
adq 1 vs. adq 7	1.317	0.506	0.614	0.025	No	
adq 1 vs. adq 3	0.898	0.345	0.731	0.050	No	
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq-Est-PR</b>						
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>	
adq 1 vs. adq 7	9.927	3.818	0.000	0.007	Yes	
adq 1 vs. adq 5	4.905	1.886	0.063	0.009	No	
adq 1 vs. adq 6	4.639	1.784	0.078	0.010	No	
adq 1 vs. adq 4	2.874	1.105	0.272	0.013	No	
adq 1 vs. adq 3	2.325	0.894	0.374	0.017	No	
adq 1 vs. adq 8	2.242	0.862	0.391	0.025	No	
adq 1 vs. adq 2	0.974	0.374	0.709	0.050	No	
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 1</b>						
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>	
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	1.393	0.502	0.617	0.050	No	
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 2</b>						
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>	
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	0.673	0.242	0.809	0.050	No	
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 3</b>						
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>	
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	1.829	0.659	0.512	0.050	No	
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 4</b>						
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>	

Adq-PR vs. Adq-Est-PR	0.852	0.307	0.760	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 5</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	3.394	1.222	0.225	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 6</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	1.050	0.378	0.706	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 7</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	7.218	2.598	0.011	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 8</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	1.068	0.385	0.702	0.050	No

## Anexo2. Análisis estadísticos de las variables primarias evaluadas durante la prueba de retención a largo plazo en los grupos de evaluación comportamental (Adq-PR y Adq-Est.PR)

### 2. A. Latencia a meta

<b>t-test</b>					
LATENCIA					
Normality Test: Failed (P < 0.050)					
Test execution ended by user request, Rank Sum Test begun					
<b>Mann-Whitney Rank Sum Test</b>					
<b>Group</b>	<b>N</b>	<b>Missing</b>	<b>Median</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>
Adq-PR(prueba)	7	0	42.103	26.270	47.635
Adq-Est-PR(prueba)	7	0	12.276	7.266	15.076
Mann-Whitney U Statistic= 1.000					
T = 76.000 n(small)= 7 n(big)= 7 P(est.)= 0.003 P(exact)= 0.001					
The difference in the median values between the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.001)					

<b>Paired t-test:</b>					
Normality Test: Passed (P = 0.406)					
<b>Treatment Name</b>	<b>N</b>	<b>Missing</b>	<b>Mean</b>	<b>Std Dev</b>	<b>SEM</b>
Adq-PR(prueba)	7	0	41.182	20.962	7.923
Adq-PR(E8)	7	0	13.674	7.272	2.749
Difference	7	0	27.507	26.225	9.912

$t = 2.775$  with 6 degrees of freedom. ( $P = 0.032$ )

95 percent confidence interval for difference of means: 3.253 to 51.762

The change that occurred with the treatment is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant change ( $P = 0.032$ )

## 2. B. Errores ponderados

### t-test

#### ERRORES PONDERADOS)

Normality Test: Passed ( $P = 0.401$ )

Equal Variance Test: Failed ( $P < 0.050$ )

Test execution ended by user request, Rank Sum Test begun

#### Mann-Whitney Rank Sum Test

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Adq-PR(prueba)	7	0	451.069	225.029	799.488
Adq-Est-PR(prueba)	7	0	16.323	4.081	110.236

Mann-Whitney U Statistic= 0.000

$T = 77.000$   $n(\text{small}) = 7$   $n(\text{big}) = 7$   $P(\text{est.}) = 0.002$   $P(\text{exact}) = < 0.001$

The difference in the median values between the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = < 0.001$ )

### Paired t-test:

Normality Test: Passed ( $P = 0.533$ )

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Adq-PR (prueba)	7	0	526.034	325.002	122.839
Adq-PR (E8)	7	0	27.278	21.829	8.251
Difference	7	0	498.756	324.335	122.587

$t = 4.069$  with 6 degrees of freedom. ( $P = 0.007$ )

95 percent confidence interval for difference of means: 198.797 to 798.716

The change that occurred with the treatment is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant change ( $P = 0.007$ )

### Paired t-test:

Normality Test: Passed ( $P = 0.705$ )

### Paired t-test:

Normality Test: Passed ( $P = 0.264$ )

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Adq-Est-PR(prueba)	7	0	11.820	4.743	1.793
Adq-Est-PR(E8)	7	0	12.116	12.000	4.536
Difference	7	0	-0.296	9.179	3.469

$t = -0.0854$  with 6 degrees of freedom. ( $P = 0.935$ )

95 percent confidence interval for difference of means: -8.786 to 8.193

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance ( $P = 0.935$ )

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Adq-Est-PR(prueba)	7	0	52.029	59.750	22.583
Adq-Est-PR(E8)	7	0	28.871	26.134	9.878
Difference	7	0	23.158	48.833	18.457

t = 1.255 with 6 degrees of freedom. (P = 0.256)  
95 percent confidence interval for difference of means: -22.005 to 68.320  
The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.256)

## 2. C. Distancia media a meta

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Adq-PR (prueba)	7	0	50.812	16.216	6.129
Adq-Est-PR (prueba)	7	0	13.707	14.212	5.372
Difference	37.105				

**t-test**  
DISTANCIA MEDIA META  
Normality Test: Passed (P = 0.561)  
Equal Variance Test: Passed (P = 0.919)

t = 4.553 with 12 degrees of freedom. (P = <0.001)  
95 percent confidence interval for difference of means: 19.348 to 54.862  
The difference in the mean values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = <0.001).

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Adq-PR(prueba)	7	0	53.755	44.382	60.661
Adq-PR(E8)	7	0	16.075	2.040	21.664

**Paired t-test:**  
Normality Test: Failed (P < 0.050)  
Test execution ended by user request, Signed Rank Test begun

**Wilcoxon Signed Rank Test**

W= -26.000 T+ = 1.000 T- = -27.000  
Z-Statistic (based on positive ranks) = -2.197  
P(est.)= 0.035 P(exact)= 0.031

The change that occurred with the treatment is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.031).

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Adq-Est-PR(prueba)	7	0	13.707	14.212	5.372
Adq-Est-PR(E8)	7	0	11.727	12.235	4.624
Difference	7	0	1.980	11.787	4.455

**Paired t-test:**  
Normality Test: Passed (P = 0.748)

t = 0.444 with 6 degrees of freedom. (P = 0.672)  
95 percent confidence interval for difference of means: -8.921 to 12.881

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.672)

## 2. D. Distancia recorrida

### t-test

#### DISTANCIA RECORRIDA

Normality Test: Failed (P < 0.050)

Test execution ended by user request, Rank Sum Test begun

### Mann-Whitney Rank Sum Test

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Adq-PR(prueba)	7	0	241.387	189.841	457.631
Adq-Est-PR(prueba)	7	0	63.323	51.081	129.571

Mann-Whitney U Statistic= 3.000

T = 74.000 n(small)= 7 n(big)= 7 P(est.)= 0.007 P(exact)= 0.004

The difference in the median values between the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.004)

### Paired t-test:

Normality Test: Passed (P = 0.408)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Adq-PR (prueba)	7	0	308.461	153.726	58.103
Adq-PR (E8)	7	0	72.017	20.012	7.564
Difference	7	0	236.444	166.942	63.098

t = 3.747 with 6 degrees of freedom. (P = 0.010)

95 percent confidence interval for difference of means: 82.049 to 390.840

The change that occurred with the treatment is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant change (P = 0.010)

### Paired t-test:

Normality Test: Passed (P = 0.224)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Adq-Est-PR(prueba)	7	0	88.490	55.404	20.941
Adq-Est-PR(E8)	7	0	68.946	24.762	9.359
Difference	7	0	19.543	41.446	15.665

t = 1.248 with 6 degrees of freedom. (P = 0.259)

95 percent confidence interval for difference of means: -18.788 to 57.875

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.259)



## 2. E. Latencia al primer agujero

### t-test

LATENCIA 1ER PSC

Normality Test: Passed (P = 0.145)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.393)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Adq-PR (prueba)	7	0	4.582	1.887	0.713
Adq-Est-PR(prueba)	7	0	7.307	3.018	1.141
Difference			-2.725		

t = -2.026 with 12 degrees of freedom. (P = 0.066)

95 percent confidence interval for difference of means: -5.657 to 0.206

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.066).

### Paired t-test:

Normality Test: Passed (P = 0.648)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Adq-PR(prueba)	7	0	4.582	1.887	0.713
Adq-PR(E8)	7	0	6.692	5.165	1.952
Difference	7	0	-2.110	5.635	2.130

t = -0.991 with 6 degrees of freedom. (P = 0.360)

95 percent confidence interval for difference of means: -7.321 to 3.101

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.360)

### Paired t-test:

Normality Test: Passed (P = 0.420)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Adq-Est-PR(prueba)	7	0	7.307	3.018	1.141
Adq-Est-PR(E8)	7	0	5.678	2.277	0.861
Difference	7	0	1.629	4.512	1.705

t = 0.955 with 6 degrees of freedom. (P = 0.376)

95 percent confidence interval for difference of means: -2.544 to 5.802

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.376)

## 2. F. Velocidad media

### T-test

#### VELOCIDAD MEDIA

Normality Test: Passed (P = 0.760)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.445)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Adq-PR(prueba)	7	0	8.411	2.712	1.025
Adq-Est-PR (prueba)	7	0	7.612	3.602	1.361
Difference	0.799				

t = 0.469 with 12 degrees of freedom. (P = 0.647)

95 percent confidence interval for difference of means: -2.914 to 4.512

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.647).

### Paired t-test:

Normality Test: Passed (P = 0.072)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Adq-PR (prueba)	7	0	8.411	2.712	1.025
Adq-PR (E8)	7	0	8.984	3.912	1.479
Difference	7	0	-0.573	4.853	1.834

t = -0.313 with 6 degrees of freedom. (P = 0.765)

95 percent confidence interval for difference of means: -5.061 to 3.915

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.765)

### Paired t-test:

Normality Test: Passed (P = 0.615)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Adq-Est-PR (prueba)	7	0	7.612	3.602	1.361
Adq-Est-PR (E8)	7	0	7.916	2.360	0.892
Difference	7	0	-0.304	4.612	1.743

t = -0.175 with 6 degrees of freedom. (P = 0.867)

95 percent confidence interval for difference of means: -4.570 to 3.961

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.867)

## Anexo3. Análisis estadístico del porcentaje de exploración por agujero y por sector durante la prueba de retención a largo plazo en los grupos de evaluación comportamental (Adq-PR y Adq-Est.PR)

### Anexo3.A. Porcentaje de exploración por agujero

<b>Two Way Repeated Measures ANOVA (One Factor Repetition)</b>					
Dependent Variable: %Exploraciones por agujero					
Normality Test: Failed (P < 0.050)					
Equal Variance Test: Passed (P = 0.127)					
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Grupo	1	0.320	0.320	1.000	0.337
Sujeto (grupo)	12	3.845	0.320		
Agujero estandarizado	17	3291.407	193.612	9.751	<0.001
Grupo x Agujero estandarizado	17	659.995	38.823	1.955	0.015
Residual	204	4050.676	19.856		
Total	251	8006.243	31.897		
Main effects cannot be properly interpreted if significant interaction is determined. This is because the size of a factor's effect depends upon the level of the other factor.					
The effect of different levels of grupo depends on what level of agujero is present. There is a statistically significant interaction between grupo and agujero. (P = 0.015)					
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):					
Overall significance level = 0.05					

Comparisons for factor: <b>Agujero estandarizado within Adq-PR</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
0.000 vs. 1.000	2.877	1.208	0.228	0.0010	No
0.000 vs. -1.000	0.747	0.314	0.754	0.0020	No
0.000 vs. 2.000	3.299	1.385	0.168	0.0010	No
0.000 vs. -2.000	6.463	2.713	0.007	0.0000	No
0.000 vs. 3.000	7.123	2.991	0.003	0.0000	No
0.000 vs. -3.000	6.194	2.601	0.01	0.0000	No
0.000 vs. 4.000	7.475	3.138	0.002	0.0000	No
0.000 vs. -4.000	4.864	2.042	0.042	0.0000	No

0.000 vs. 5.000	8.333	3.498	0.001	0.0000	No
0.000 vs. -5.000	6.606	2.773	0.006	0.0000	No
0.000 vs. 6.000	6.66	2.796	0.006	0.0000	No
0.000 vs. -6.000	6.257	2.627	0.009	0.0000	No
0.000 vs. 7.000	8.021	3.367	0.001	0.0000	No
0.000 vs. -7.000	4.683	1.966	0.051	0.0000	No
0.000 vs. 8.000	8.649	3.631	0	0.0000	No
0.000 vs. -8.000	6.791	2.851	0.005	0.0000	No
0.000 vs. 9.000	7.143	2.999	0.003	0.0000	No

Comparisons for factor: **Agujero estandarizado within Adq-Est-PR**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
0.000 vs. 1.000	10.07	4.228	0.0000	0	Yes
0.000 vs. -1.000	6.069	2.548	0.0120	0	No
0.000 vs. 2.000	15.365	6.451	0.0000	0	Yes
0.000 vs. -2.000	13.955	5.859	0.0000	0	Yes
0.000 vs. 3.000	16.31	6.847	0.0000	0	Yes
0.000 vs. -3.000	14.658	6.154	0.0000	0	Yes
0.000 vs. 4.000	17.359	7.288	0.0000	0	Yes
0.000 vs. -4.000	18.704	7.853	0.0000	0	Yes
0.000 vs. 5.000	18.053	7.579	0.0000	0	Yes
0.000 vs. -5.000	18.799	7.893	0.0000	0	Yes
0.000 vs. 6.000	17.512	7.352	0.0000	0	Yes
0.000 vs. -6.000	17.172	7.209	0.0000	0	Yes
0.000 vs. 7.000	20.1	8.439	0.0000	0	Yes
0.000 vs. -7.000	18.744	7.87	0.0000	0	Yes
0.000 vs. 8.000	19.14	8.036	0.0000	0	Yes
0.000 vs. -8.000	18.712	7.856	0.0000	0	Yes
0.000 vs. 9.000	17.507	7.35	0.0000	0	Yes

Comparisons for factor: **grupo within 9**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	0.655	0.283	0.778	0.050	No

Comparisons for factor: **grupo within -8**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	2.212	0.955	0.341	0.050	No

Comparisons for factor: **grupo within -7**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	4.353	1.879	0.062	0.050	No

Comparisons for factor: **grupo within -6**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	1.206	0.521	0.603	0.050	No

Comparisons for factor: **grupo within -5**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	2.484	1.073	0.285	0.050	No

Comparisons for factor: <b>grupo within -4</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	4.131	1.784	0.076	0.050	No
Comparisons for factor: <b>grupo within -3</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-Est-PR vs. Adq-PR	1.245	0.538	0.591	0.050	No
Comparisons for factor: <b>grupo within -2</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-Est-PR vs. Adq-PR	2.217	0.957	0.340	0.050	No
Comparisons for factor: <b>grupo within -1</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-Est-PR vs. Adq-PR	4.387	1.894	0.060	0.050	No
Comparisons for factor: <b>grupo within 0</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-Est-PR vs. Adq-PR	9.709	4.192	0.000	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>grupo within 1</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-Est-PR vs. Adq-PR	2.516	1.086	0.279	0.050	No
Comparisons for factor: <b>grupo within 2</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	2.357	1.018	0.310	0.050	No
Comparisons for factor: <b>grupo within 3</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-Est-PR vs. Adq-PR	0.522	0.226	0.822	0.050	No
Comparisons for factor: <b>grupo within 4</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	0.175	0.0756	0.940	0.050	No
Comparisons for factor: <b>grupo within 5</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	0.0110	0.00475	0.996	0.050	No
Comparisons for factor: <b>grupo within 6</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	1.143	0.494	0.622	0.050	No
Comparisons for factor: <b>grupo within 7</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	2.371	1.024	0.307	0.050	No
Comparisons for factor: <b>grupo within 8</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	0.782	0.338	0.736	0.050	No

## Anexo3.B. Porcentaje de exploración por sector

### Two Way Repeated Measures ANOVA (One Factor Repetition)

Dependent Variable: %Exploraciones por agujero

Normality Test: Passed (P = 0.161)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.855)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Grupo	1	297.242	297.242	7.771	0.016
Sujeto (Grupo)	12	459.005	38.250		
Sector	1	4798.964	4798.964	57.709	<0.001
Grupo X Sector	1	713.429	713.429	8.579	0.013
Residual	12	997.904	83.159		
Total	27	7266.542	269.131		

Main effects cannot be properly interpreted if significant interaction is determined. This is because the size of a factor's effect depends upon the level of the other factor.

The effect of different levels of GRUPO depends on what level of SECTOR is present. There is a statistically significant interaction between GRUPO and SECTOR. (P = 0.013)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):

Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor: **GRUPO**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-Est-PR vs. Adq-PR	6.516	2.788	0.0164	0.050	Yes

Comparisons for factor: **SECTOR**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
META vs. OPUESTO	26.183	7.597	0.00000636	0.050	Yes

Comparisons for factor: **SECTOR within Adq-PR**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
META vs. OPUESTO	16.088	3.300	0.006	0.050	Yes

Comparisons for factor: **SECTOR within Adq-Est-PR**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
META vs. OPUESTO	36.279	7.443	0.000	0.050	Yes

Comparisons for factor: **GRUPO within META**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-Est-PR vs. Adq-PR	16.612	3.989	0.001	0.050	Yes

Comparisons for factor: **GRUPO within OPUESTO**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq-PR vs. Adq-Est-PR	3.579	0.859	0.400	0.050	No

## Anexo4. Análisis estadístico de las variables evaluadas durante adquisición en los grupos de para la detección inmunohistoquímica (Adq y Adq-Est)

### 4. A. Latencia a meta

<b>Two Way Repeated Measures ANOVA (One Factor Repetition)</b>					
Dependent Variable: LATENCIA					
Normality Test: Failed (P < 0.050)					
Equal Variance Test: Passed (P = 0.172)					
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
GRUPO	1	678.965	678.965	0.406	0.538
SUJETO(GRUPO)	10	16732.755	1673.276		
ENSAYO	7	104987.326	14998.189	9.930	<0.001
GRUPO x ENSAYO	7	3347.630	478.233	0.317	0.944
Residual	70	105726.408	1510.377		
Total	95	231473.084	2436.559		
Multiple Comparisons versus Control Group (Holm-Sidak method):					
Overall significance level = 0.05					
Comparisons for factor: <b>GRUPO</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq vs. Adq-Est	5.319	0.637	0.538	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ENSAYO</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
adq 1 vs. adq 8	105.536	6.652	0.0000000536	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 6	102.355	6.451	0.0000000123	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 7	99.740	6.286	0.0000000243	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 5	91.730	5.782	0.000000189	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 4	87.327	5.504	0.000000574	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 3	76.026	4.792	0.00000897	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 2	54.170	3.414	0.00107	0.050	Yes

Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
adq 1 vs. adq 8	97.549	4.348	0.000	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 6	96.275	4.291	0.000	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 7	89.216	3.976	0.000	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 5	88.103	3.927	0.000	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 3	81.338	3.625	0.001	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 4	75.802	3.378	0.001	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 2	57.711	2.572	0.012	0.050	Yes

Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq-Est</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
adq 1 vs. adq 8	113.522	5.059	0.000	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 7	110.265	4.914	0.000	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 6	108.435	4.833	0.000	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 4	98.851	4.406	0.000	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 5	95.357	4.250	0.000	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 3	70.714	3.152	0.002	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 2	50.630	2.256	0.027	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 1</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	13.041	0.577	0.565	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 2</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	20.123	0.891	0.376	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 3</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	23.665	1.048	0.298	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 4</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	10.008	0.443	0.659	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 5</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	5.788	0.256	0.798	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 6</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	0.881	0.0390	0.969	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 7</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	8.008	0.355	0.724	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 8</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	2.931	0.130	0.897	0.050	No

## 4. B. Errores ponderados

<b>Two Way Repeated Measures ANOVA (One Factor Repetition)</b>					
Dependent Variable: ERRORES PONDERADOS					
Normality Test: Failed (P < 0.050)					
Equal Variance Test: Failed (P < 0.050)					
<b>Source of Variation</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
GRUPO	1	6712.713	6712.713	0.0490	0.829



SUJETO(GRUPO)	10	1369047.233	136904.723		
ENSAYO	7	5857184.787	836740.684	8.088	<0.001
GRUPO x ENSAYO	7	255629.341	36518.477	0.353	0.926
Residual	70	7242085.785	103458.368		
Total	95	14730659.859	155059.577		
Multiple Comparisons versus Control Group (Holm-Sidak method): Overall significance level = 0.05					
Comparisons for factor: <b>GRUPO</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	16.724	0.221	0.829	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ENSAYO</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
adq 1 vs. adq 8	754.266	5.744	0.00000220	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 7	709.894	5.406	0.00000844	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 6	709.728	5.405	0.00000848	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 5	597.245	4.548	0.0000221	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 4	569.722	4.339	0.0000473	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 3	446.097	3.397	0.00113	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 2	238.723	1.818	0.0733	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
adq 1 vs. adq 8	819.117	4.411	0.000	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 6	789.613	4.252	0.000	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 7	721.876	3.887	0.000	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 5	615.616	3.315	0.001	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 4	602.160	3.243	0.002	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 3	599.847	3.230	0.002	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 2	221.145	1.191	0.238	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq-Est</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
adq 1 vs. adq 7	697.912	3.758	0.000	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 8	689.414	3.712	0.000	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 6	629.842	3.392	0.001	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 5	578.874	3.117	0.003	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 4	537.283	2.893	0.005	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 3	292.347	1.574	0.120	0.025	No
adq 1 vs. adq 2	256.302	1.380	0.172	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 1</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	69.201	0.365	0.716	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 2</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	104.358	0.551	0.583	0.050	No

Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 3</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq vs. Adq-Est	238.299	1.258	0.212	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 4</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq vs. Adq-Est	4.323	0.0228	0.982	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 5</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq vs. Adq-Est	32.459	0.171	0.864	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 6</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq vs. Adq-Est	90.570	0.478	0.634	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 7</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq vs. Adq-Est	45.237	0.239	0.812	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 8</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq vs. Adq-Est	60.502	0.319	0.750	0.050	No

#### 4. C. Distancia media a meta

<b>Two Way Repeated Measures ANOVA (One Factor Repetition)</b>					
Dependent Variable: DISTANCIA MEDIA META					
Normality Test: Passed (P = 0.421)					
Equal Variance Test: Passed (P = 0.815)					
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
GRUPO	1	867.619	867.619	1.102	0.318
SUJETO(GRUPO)	10	7871.898	787.190		
ENSAYO	7	14557.815	2079.688	4.635	<0.001
GRUPO x ENSAYO	7	5051.119	721.588	1.608	0.147
Residual	70	31407.029	448.672		
Total	95	59755.479	629.005		
Multiple Comparisons versus Control Group (Holm-Sidak method): Overall significance level = 0.05					
Comparisons for factor: <b>GRUPO</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq vs. Adq-Est	6.013	1.050	0.318	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ENSAYO</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
adq 1 vs. adq 8	37.479	4.334	0.0000480	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 7	36.651	4.238	0.0000676	0.009	Yes

adq 1 vs. adq 5	32.727	3.785	0.000322	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 6	31.139	3.601	0.000588	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 4	23.096	2.671	0.00940	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 3	16.016	1.852	0.0682	0.025	No
adq 1 vs. adq 2	13.807	1.597	0.115	0.050	No
<b>Comparisons for factor: ENSAYO within Adq</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
adq 1 vs. adq 8	42.282	3.457	0.001	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 6	36.151	2.956	0.004	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 3	31.826	2.602	0.011	0.010	No
adq 1 vs. adq 7	31.576	2.582	0.012	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 5	31.051	2.539	0.013	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 4	26.497	2.167	0.034	0.025	No
adq 1 vs. adq 2	3.743	0.306	0.760	0.050	No
<b>Comparisons for factor: ENSAYO within Adq-Est</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
adq 1 vs. adq 7	41.725	3.412	0.001	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 5	34.404	2.813	0.006	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 8	32.675	2.672	0.009	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 6	26.126	2.136	0.036	0.013	No
adq 1 vs. adq 2	23.871	1.952	0.055	0.017	No
adq 1 vs. adq 4	19.695	1.610	0.112	0.025	No
adq 1 vs. adq 3	0.206	0.0169	0.987	0.050	No
<b>Comparisons for factor: GRUPO within adq 1</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	2.960	0.231	0.818	0.050	No
<b>Comparisons for factor: GRUPO within adq 2</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	17.169	1.342	0.184	0.050	No
<b>Comparisons for factor: GRUPO within adq 3</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	34.579	2.703	0.008	0.050	Yes
<b>Comparisons for factor: GRUPO within adq 4</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	9.762	0.763	0.448	0.050	No
<b>Comparisons for factor: GRUPO within adq 5</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	0.394	0.0308	0.976	0.050	No
<b>Comparisons for factor: GRUPO within adq 6</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	12.985	1.015	0.313	0.050	No
<b>Comparisons for factor: GRUPO within adq 7</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	7.189	0.562	0.576	0.050	No

Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 8</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq vs. Adq-Est	12.567	0.982	0.329	0.050	No

#### 4. D. Distancia total recorrida

<b>Two Way Repeated Measures ANOVA (One Factor Repetition)</b>					
Dependent Variable: DISTANCIA TOTAL					
Normality Test: Failed (P < 0.050)					
Equal Variance Test: Passed (P = 0.168)					
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
GRUPO	1	1086.280	1086.280	0.0278	0.871
SUJETO(GRUPO)	10	390871.959	39087.196		
ENSAYO	7	1046708.654	149529.808	8.131	<0.001
GRUPO x ENSAYO	7	48347.412	6906.773	0.376	0.914
Residual	70	1287340.687	18390.581		
Total	95	2774354.993	29203.737		
Multiple Comparisons versus Control Group (Holm-Sidak method): Overall significance level = 0.05					
Comparisons for factor: <b>GRUPO</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Adq vs. Adq-Est	6.728	0.167	0.871	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ENSAYO</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
adq 1 vs. adq 8	335.875	6.067	0.000000597	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 6	321.954	5.815	0.000000165	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 7	304.611	5.502	0.000000578	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 5	272.989	4.931	0.00000530	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 4	259.766	4.692	0.0000130	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 3	240.040	4.336	0.0000478	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 2	149.333	2.697	0.00875	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
adq 1 vs. adq 8	363.051	4.637	0.000	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 6	361.814	4.621	0.000	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 3	297.592	3.801	0.000	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 5	290.160	3.706	0.000	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 7	288.980	3.691	0.000	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 4	258.085	3.296	0.002	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 2	158.849	2.029	0.046	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq-Est</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
adq 1 vs. adq 7	320.243	4.090	0.000	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 8	308.699	3.943	0.000	0.009	Yes

adq 1 vs. adq 6	282.094	3.603	0.001	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 4	261.448	3.339	0.001	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 5	255.818	3.267	0.002	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 3	182.488	2.331	0.023	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 2	139.817	1.786	0.078	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 1</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	40.218	0.481	0.632	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 2</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	21.186	0.253	0.801	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 3</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	74.886	0.896	0.373	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 4</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	43.581	0.521	0.604	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 5</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	5.877	0.0703	0.944	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 6</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	39.502	0.472	0.638	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 7</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	71.481	0.855	0.395	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 8</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	14.134	0.169	0.866	0.050	No

#### 4. E. Latencia al primer agujero

<b>Two Way Repeated Measures ANOVA (One Factor Repetition)</b>					
Dependent Variable: LATENCIA 1ER					
Normality Test: Failed (P < 0.050)					
Equal Variance Test: Passed (P = 0.095)					
<b>Source of Variation</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
GRUPO	1	12.603	12.603	0.140	0.716
SUJETO(GRUPO)	10	899.630	89.963		
ENSAYO	7	2092.653	298.950	9.033	<0.001

GRUPO x ENSAYO	7	76.593	10.942	0.331	0.937
Residual	70	2316.673	33.095		
Total	95	5398.151	56.823		
Multiple Comparisons versus Control Group (Holm-Sidak method): Overall significance level = 0.05					
Comparisons for factor: <b>GRUPO</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	0.725	0.374	0.716	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ENSAYO</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
adq 1 vs. adq 4	15.058	6.411	0.000000145	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 7	14.430	6.144	0.000000435	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 8	14.246	6.066	0.000000599	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 5	14.148	6.024	0.000000711	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 6	13.368	5.692	0.00000271	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 3	13.125	5.588	0.00000410	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 2	10.412	4.433	0.0000336	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
adq 1 vs. adq 5	15.618	4.702	0.000	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 4	15.147	4.560	0.000	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 7	14.737	4.437	0.000	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 3	13.744	4.138	0.000	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 8	13.509	4.067	0.000	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 6	11.882	3.577	0.001	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 2	11.515	3.467	0.001	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq-Est</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
adq 1 vs. adq 8	14.983	4.511	0.000	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 4	14.968	4.507	0.000	0.009	Yes
adq 1 vs. adq 6	14.854	4.472	0.000	0.010	Yes
adq 1 vs. adq 7	14.123	4.252	0.000	0.013	Yes
adq 1 vs. adq 5	12.678	3.817	0.000	0.017	Yes
adq 1 vs. adq 3	12.506	3.765	0.000	0.025	Yes
adq 1 vs. adq 2	9.309	2.803	0.007	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 1</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	1.066	0.291	0.772	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 2</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	1.140	0.312	0.756	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 3</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	0.172	0.0469	0.963	0.050	No

Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 4</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	0.887	0.242	0.809	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 5</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	1.874	0.512	0.610	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 6</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	4.039	1.103	0.274	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 7</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	0.453	0.124	0.902	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 8</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	2.540	0.694	0.490	0.050	No

## 4. F. Velocidad media

<b>Two Way Repeated Measures ANOVA (One Factor Repetition)</b>					
Dependent Variable: VELOCIDAD MEDIA					
Normality Test: Failed (P < 0.050)					
Equal Variance Test: Passed (P = 0.538)					
<b>Source of Variation</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
GRUPO	1	22.288	22.288	0.444	0.520
SUJETO(GRUPO)	10	502.220	50.222		
ENSAYO	7	510.738	72.963	3.238	0.005
GRUPO x ENSAYO	7	150.999	21.571	0.957	0.469
Residual	70	1577.230	22.532		
Total	95	2763.476	29.089		
Multiple Comparisons versus Control Group (Holm-Sidak method): Overall significance level = 0.05					
Comparisons for factor: <b>GRUPO</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	0.964	0.666	0.520	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ENSAYO</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
adq 1 vs. adq 8	5.563	2.871	0.00542	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 6	5.008	2.585	0.0118	0.009	No
adq 1 vs. adq 7	4.935	2.547	0.0131	0.010	No
adq 1 vs. adq 5	4.047	2.088	0.0404	0.013	No
adq 1 vs. adq 4	1.948	1.005	0.318	0.017	No
adq 1 vs. adq 3	1.236	0.638	0.526	0.025	No
adq 1 vs. adq 2	0.799	0.412	0.681	0.050	No

Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
adq 1 vs. adq 5	4.930	1.799	0.076	0.007	No
adq 1 vs. adq 7	4.914	1.793	0.077	0.009	No
adq 1 vs. adq 6	3.897	1.422	0.159	0.010	No
adq 1 vs. adq 4	2.709	0.989	0.326	0.013	No
adq 1 vs. adq 8	2.445	0.892	0.375	0.017	No
adq 1 vs. adq 2	1.295	0.473	0.638	0.025	No
adq 1 vs. adq 3	0.470	0.172	0.864	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ENSAYO within Adq-Est</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
adq 1 vs. adq 8	8.681	3.168	0.002	0.007	Yes
adq 1 vs. adq 6	6.120	2.233	0.029	0.009	No
adq 1 vs. adq 7	4.956	1.808	0.075	0.010	No
adq 1 vs. adq 5	3.164	1.154	0.252	0.013	No
adq 1 vs. adq 3	2.942	1.073	0.287	0.017	No
adq 1 vs. adq 4	1.187	0.433	0.666	0.025	No
adq 1 vs. adq 2	0.303	0.111	0.912	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 1</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	2.166	0.736	0.464	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 2</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	1.173	0.399	0.691	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 3</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	1.246	0.423	0.673	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 4</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	3.688	1.253	0.214	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 5</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	3.932	1.336	0.186	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 6</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	0.0568	0.0193	0.985	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 7</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	2.124	0.722	0.473	0.050	No
Comparisons for factor: <b>GRUPO within adq 8</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
Adq vs. Adq-Est	4.070	1.383	0.171	0.050	No



## Anexo5. Análisis estadístico del número de células inmunoreactivas para H3K14ac en los grupos de para la detección inmunohistoquímica (Basal, Est, Adq y Adq-Est)

### 5. A. Número de células inmunoreactivas para H3K14ac en el área CA1 del hipocampo

<b>Two Way Analysis of Variance</b>					
Dependent Variable: CEL % Media Basal CA1					
Normality Test: Passed (P = 0.435)					
Equal Variance Test: Passed (P = 0.555)					
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
ADQUISICION	1	101.965	101.965	0.684	0.428
ESTRÉS	1	11888.298	11888.298	79.722	<0.001
ADQUISICION x ESTRÉS	1	890.398	890.398	5.971	0.035
Residual	10	1491.223	149.122		
Total	13	14942.806	1149.447		
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method): Overall significance level = 0.05					
Comparisons for factor: <b>ADQUISICION</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
sin ADQ vs. con ADQ	5.453	0.827	0.428	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ESTRÉS</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
sin EST vs. con EST	58.885	8.929	0.0000444	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ESTRÉS within sin ADQ</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
sin EST vs. con EST	75.000	8.041	0.000	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ESTRÉS within con ADQ</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
sin EST vs. con EST	42.770	4.586	0.001	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ADQUISICION within sin EST</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
sin ADQ vs. con ADQ	21.569	2.313	0.043	0.050	Yes

Comparisons for factor: <b>ADQUISICION within con EST</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
con ADQ vs. sin ADQ	10.662	1.143	0.280	0.050	No

## 5. B. Número de células inmunoreactivas para H3K14ac en el área CA2 del hipocampo

<b>Two Way Analysis of Variance</b>					
Dependent Variable: CEL % Media Basal CA2					
Normality Test: Passed (P = 0.736)					
Equal Variance Test: Passed (P = 0.288)					
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
ADQUISICION	1	1274.601	1274.601	0.292	0.601
ESTRÉS	1	741.473	741.473	0.170	0.689
ADQUISICION x ESTRÉS	1	17883.598	17883.598	4.099	0.070
Residual	10	43625.956	4362.596		
Total	13	63284.085	4868.007		

<b>t-test</b>					
Tendencias en CA2 Basal vs Est					
Normality Test: Passed (P = 0.517)					
Equal Variance Test: Passed (P = 1.000)					
Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Basal	4	0	100.000	65.355	32.678
Est	3	0	13.072	4.528	2.614
Difference	86.928				
t = 2.245 with 5 degrees of freedom. (P = 0.075)					
95 percent confidence interval for difference of means: -12.621 to 186.478					
The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.075).					

<b>t-test</b>					
Tendencias en CA2 Basal vs Adq					
Normality Test: Passed (P = 0.559)					
Equal Variance Test: Passed (P = 1.000)					
Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Basal	4	0	100.000	65.355	32.678
Adq	3	0	47.059	27.169	15.686
Difference	52.941				

t = 1.297 with 5 degrees of freedom. (P = 0.251)

95 percent confidence interval for difference of means: -52.019 to 157.901

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.251)

#### t-test

Tendencias en CA2 Adq vs Adq-Est

Normality Test: Passed (P = 0.676)

Equal Variance Test: Passed (P = 1.000)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Adq	3	0	47.059	27.169	15.686
Adq-Est	4	0	104.575	98.818	49.409
Difference		-57.516			

t = -0.960 with 5 degrees of freedom. (P = 0.381)

95 percent confidence interval for difference of means: -211.536 to 96.503

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.381).

## 5. C. Número de células inmunoreactivas para H3K14ac en el área CA3 del hipocampo

#### Two Way Analysis of Variance

Dependent Variable: CEL % Media Basal CA3

Normality Test: Passed (P = 0.443)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.280)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
ADQUISICION	1	3611.661	3611.661	0.965	0.349
ESTRÉS	1	409.222	409.222	0.109	0.748
ADQUISICION x ESTRÉS	1	2331.383	2331.383	0.623	0.448
Residual	10	37442.671	3744.267		
Total	13	43524.121	3348.009		

#### t-test

Tendencias en CA3 Basal vs Adq

Normality Test: Passed (P = 0.434)

Equal Variance Test: Passed (P = 1.000)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Basal	4	0	100.000	66.892	33.446
Adq	3	0	41.467	17.680	10.207
Difference		58.533			

t = 1.446 with 5 degrees of freedom. (P = 0.208)

95 percent confidence interval for difference of means: -45.537 to 162.603  
 The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.208).

Tendencias en CA3 Adq vs Adq-Est  
 Normality Test: Failed (P < 0.050)  
 Test execution ended by user request, Rank Sum Test begun

#### Mann-Whitney Rank Sum Test

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Adq	3	0	51.675	28.708	51.675
Adq-Est	4	0	102.392	53.589	103.349

Mann-Whitney U Statistic= 9.000

T = 9.000 n(small)= 3 n(big)= 4 P(est.)= 0.368 P(exact)= 0.400

The difference in the median values between the two groups is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.400)

## 5. D. Número de células inmunoreactivas para H3K14ac en la capa granular del giro dentado (GrDG)

#### Two Way Analysis of Variance

CEL % Media Basal DG

Normality Test: Passed (P = 0.234)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.705)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
ADQUISICION	1	22.411	22.411	0.304	0.594
ESTRÉS	1	6365.578	6365.578	86.242	<0.001
ADQUISICION x ESTRÉS	1	9.000	9.000	0.122	0.734
Residual	10	738.106	73.811		
Total	13	7378.340	567.565		

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):

Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor: **ADQUISICION**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
sin ADQ vs. con ADQ	2.557	0.551	0.594	0.050	No

Comparisons for factor: **ESTRÉS**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
sin EST vs. con EST	43.089	9.287	0.00000312	0.050	Yes

Comparisons for factor: <b>ESTRÉS within sin ADQ</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
sin EST vs. con EST	44.709	6.814	0.000	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ESTRÉS within con ADQ</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
sin EST vs. con EST	41.468	6.320	0.000	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ADQUISICION within sin EST</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
sin ADQ vs. con ADQ	4.177	0.637	0.539	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ADQUISICION within con EST</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
sin ADQ vs. con ADQ	0.937	0.143	0.889	0.050	No

## 5. E. Número de células inmunoreactivas para H3K14ac en el núcleo basolateral de la amígdala (BLA)

<b>Two Way Analysis of Variance</b>					
CEL % Media Basal BLA					
Normality Test:	Failed (P < 0.050)				
Equal Variance Test:	Passed (P = 0.184)				
<b>Source of Variation</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
ADQUISICION	1	109638.359	109638.359	2.357	0.156
ESTRÉS	1	1921519.064	1921519.064	41.309	<0.001
ADQUISICION x ESTRÉS	1	98401.186	98401.186	2.115	0.176
Residual	10	465158.939	46515.894		
Total	13	2568756.896	197596.684		
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method): Overall significance level = 0.05					
Comparisons for factor: <b>ADQUISICION</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
sin ADQ vs. con ADQ	178.824	1.535	0.156	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ESTRÉS</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
con EST vs. sin EST	748.627	6.427	0.0000756	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ESTRÉS within sin ADQ</b>					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
con EST vs. sin EST	918.039	5.573	0.000	0.050	Yes

Comparisons for factor: <b>ESTRÉS within con ADQ</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
con EST vs. sin EST	579.216	3.516	0.006	0.050	Yes
Comparisons for factor: <b>ADQUISICION within sin EST</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
sin ADQ vs. con ADQ	9.412	0.0617	0.952	0.050	No
Comparisons for factor: <b>ADQUISICION within con EST</b>					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
sin ADQ vs. con ADQ	348.235	1.978	0.076	0.050	No

## 5. F. Número de células inmunoreactivas para H3K14ac en el núcleo central de la amígdala (CeA)

<b>Two Way Analysis of Variance</b>					
CEL % Media Basal CeA					
Normality Test:		Passed (P = 0.069)			
Equal Variance Test:		Passed (P = 0.244)			
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
ADQUISICION	1	3963.041	3963.041	1.688	0.223
ESTRÉS	1	1883.997	1883.997	0.802	0.391
ADQUISICION x ESTRÉS	1	1714.299	1714.299	0.730	0.413
Residual	10	23481.280	2348.128		
Total	13	31921.123	2455.471		

<b>t-test</b>					
Tendencias en CeA Basal vs Adq					
Normality Test:		Failed (P < 0.050)			
Test execution ended by user request, Rank Sum Test begun					
<b>Mann-Whitney Rank Sum Test</b>					
Group	N	Missing	Median	25%	75%
Basal	4	0	106.234	65.835	134.165
Adq	4	0	44.888	11.970	75.312
Mann-Whitney U Statistic= 2.000					
T = 24.000 n(small)= 4 n(big)= 4 P(est.)= 0.112 P(exact)= 0.114					
The difference in the median values between the two groups is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.114)					

<b>t-test</b>	
Tendencias en CeA Adq vs Adq-Est	
Normality Test:	Passed (P = 0.127)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.858)					
Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Adq	4	0	43.641	36.654	18.327
Adq-Est	3	0	89.443	32.543	18.789
Difference		-45.802			

t = -1.710 with 5 degrees of freedom. (P = 0.148)  
95 percent confidence interval for difference of means: -114.651 to 23.046  
The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.148).

## **Anexo6. Análisis estadístico del número de células inmunoreactivas para H3K14ac a las 24h de los tratamientos (comparaciones entre Basal, Adq, Adq-PR, Adq-Est y Adq-Est-PR)**

### **6. A. Número de células inmunoreactivas para H3K14ac a las 24h de los tratamientos en las áreas CA2 y CA3 del hipocampo y núcleo central de la amígdala (CeA)**

<b>One Way Analysis of Variance</b>	
CEL % Media Basal CA2 2h vs 24h	
Normality Test:	Passed (P = 0.169)
Equal Variance Test:	Failed (P < 0.050)
Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun	
<b>Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks</b>	
H = 5.435 with 4 degrees of freedom. (P = 0.245)	
The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.245)	

<b>One Way Analysis of Variance</b>					
CEL % Media Basal CA3 2h vs 24h					
Normality Test:		Passed (P = 0.119)			
Equal Variance Test:		Passed (P = 0.602)			
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P

Between Groups	4	17548.235	4387.059	2.352	0.108
Residual	13	24251.582	1865.506		
Total	17	41799.816			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ( $P = 0.108$ ).

#### One Way Analysis of Variance

CEL % Media Basal CeA 2h vs 24h

Normality Test: Passed ( $P = 0.165$ )

Equal Variance Test: Failed ( $P < 0.050$ )

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

#### Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

$H = 2.871$  with 4 degrees of freedom. ( $P = 0.580$ )

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ( $P = 0.580$ ).

## 6. B. Número de células inmunoreactivas para H3K14ac a las 24h de los tratamientos en las áreas CA1 del hipocampo

#### One Way Analysis of Variance

CEL % Media Basal CA1 2vs 24h

Normality Test: Passed ( $P = 0.331$ )

Equal Variance Test: Passed ( $P = 0.615$ )

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	13180.917	3295.229	24.267	<0.001
Residual	13	1765.258	135.789		
Total	17	14946.175			

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):

Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Basal vs. adq 24h	65.349	7.931	0.00000246	0.005	Yes



Basal vs. adq-est 2h	64.338	7.808	0.0000291	0.006	Yes
Basal vs. adq-est 24h	57.230	6.430	0.0000223	0.006	Yes
adq 2h vs. adq 24h	43.781	4.919	0.000280	0.007	Yes
adq 2h vs. adq-est 2h	42.770	4.806	0.000343	0.009	Yes
adq 2h vs. adq-est 24h	35.662	3.748	0.00244	0.010	Yes
Basal vs. adq 2h	21.569	2.423	0.0307	0.013	Yes
adq-est 24h vs. adq 24h	8.119	0.912	0.378	0.017	No
adq-est 24h vs. adq-est 2h	7.108	0.799	0.439	0.025	No
adq-est 2h vs. adq 24h	1.011	0.123	0.904	0.050	No

## 6. C. Número de células inmunoreactivas para H3K14ac a las 24h de los tratamientos en la capa granular del giro dentado (GrDG)

<b>One Way Analysis of Variance</b>					
CEL % Media Basal DG 2 vs 24h					
Normality Test:	Passed (P = 0.062)				
Equal Variance Test:	Passed (P = 0.975)				
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	6572.997	1643.249	15.378	<0.001
Residual	13	1389.143	106.857		
Total	17	7962.139			
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):					
Overall significance level = 0.05					
Comparisons for factor:					
Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Basal vs. adq-est 2h	45.645	6.245	0.0000300	0.005	Yes
Basal vs. adq-est 24h	42.087	5.331	0.000136	0.006	Yes
adq 2h vs. adq-est 2h	41.468	5.252	0.000156	0.006	Yes
adq 2h vs. adq-est 24h	37.910	4.492	0.000607	0.007	Yes
adq 24h vs. adq-est 2h	31.654	4.331	0.000816	0.009	Yes
adq 24h vs. adq-est 24h	28.095	3.559	0.00350	0.010	Yes
Basal vs. adq 24h	13.991	1.914	0.0779	0.013	No
adq 2h vs. adq 24h	9.815	1.243	0.236	0.017	No
Basal vs. adq 2h	4.177	0.529	0.606	0.025	No
adq-est 24h vs. adq-est 2h	3.559	0.451	0.660	0.050	No

## 6. D. Número de células inmunoreactivas para H3K14ac a las 24h de los tratamientos en el núcleo basolateral de la amígdala (BLA)

<b>One Way Analysis of Variance</b>					
CEL % Media Basal BLA 2 vs 24h					
Normality Test:		Failed (P < 0.050)			
Equal Variance Test:		Passed (P = 0.195)			
<b>Source of Variation</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Between Groups	4	1370399.692	342599.923	9.929	<0.001
Residual	13	448549.942	34503.842		
Total	17	1818949.635			
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):					
Overall significance level = 0.05					
Comparisons for factor:					
<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>t</b>	<b>Unadjusted P</b>	<b>Critical Level</b>	<b>Significant?</b>
adq-est 24h vs. adq 2h	602.745	4.249	0.000950	0.005	Yes
adq-est 24h vs. adq 24h	594.510	4.191	0.00106	0.006	Yes
adq-est 24h vs. Basal	593.333	4.182	0.00107	0.006	Yes
adq-est 2h vs. adq 2h	579.216	4.083	0.00129	0.007	Yes
adq-est 2h vs. adq 24h	570.980	4.025	0.00144	0.009	Yes
adq-est 2h vs. Basal	569.804	4.016	0.00147	0.010	Yes
adq-est 24h vs. adq-est 2h	23.529	0.155	0.879	0.013	No
Basal vs. adq 2h	9.412	0.0717	0.944	0.017	No
adq 24h vs. adq 2h	8.235	0.0627	0.951	0.025	No
Basal vs. adq 24h	1.176	0.00896	0.993	0.050	No