



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

**EFFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LAS DESACETILASAS DE HISTONAS SOBRE  
LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR EL ESTRÉS AGUDO EN LA MEMORIA  
ESPACIAL, LOS NIVELES DE CORTICOSTERONA, LA ACETILACIÓN DE  
HISTONAS Y LA EXPRESIÓN DE GR Y HDAC2**

**DERLY VIVIANA VARGAS LÓPEZ**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
BOGOTÁ D.C.**

**2017**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

**EFFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LAS DESACETILASAS DE HISTONAS SOBRE  
LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR EL ESTRÉS AGUDO EN LA MEMORIA  
ESPACIAL, LOS NIVELES DE CORTICOSTERONA, LA ACETILACIÓN DE  
HISTONAS Y LA EXPRESIÓN DE GR Y HDAC2**

**Derly Viviana Vargas López**

**Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
Doctora en Ciencias Biomédicas**

**Director:**

**Alejandro Múnera Galarza, PhD – Universidad Nacional de Colombia**

**Grupo de investigación:**

**Neurofisiología Comportamental**

**Miembros del Comité Tutorial:**

**Gonzalo Humberto Arboleda, PhD – Universidad Nacional de Colombia**

**Orlando Chaparro, PhD – Universidad Nacional de Colombia**

**Jurados:**

**Roberto Prado Alcalá, PhD– Universidad Nacional Autónoma de México**

**Angélica Torres Berrío, PhD– Icahn School of Medicine at Mount Sinai**

**Ángela Fontán Lozano, PhD - Universidad de Sevilla**

**Doctorado en Ciencias Biomédicas**

**Facultad de Medicina**

**Universidad Nacional de Colombia**

**Bogotá D.C.**

**2017**

***A Jaime y Andy***

## RESUMEN

La inducción de estrés agudo previo al entrenamiento de una tarea de aprendizaje espacial deteriora la formación de la memoria a largo plazo. Se han descrito algunos de los mecanismos celulares y moleculares asociados a este efecto en cerebros de roedores, pero se desconocen sus mecanismos epigenéticos. Dado que el entrenamiento en tareas espaciales y el estrés intenso tienen efectos opuestos en el nivel de acetilación de las histonas, es concebible que los efectos deletéreos del estrés sobre la memoria estén mediados por la alteración de su balance. Bajo estos supuestos, se hipotetizó que la inhibición farmacológica de las desacetilasas de histonas evitaría los efectos deletéreos del estrés sobre la memoria. En el presente estudio se evaluó la efectividad de la inhibición de las desacetilasas de tipo I y II con Tricostatina-A para prevenir los efectos a largo plazo del estrés agudo por restricción de movimientos sobre la consolidación de la memoria espacial, los niveles de corticosterona en plasma y cambios en la acetilación de histonas y la expresión del receptor de glucocorticoides (GR/*Nr3c1*), la desacetilasa de histonas 2 (HDAC2/*Hdac2*) y subunidades del receptor NMDA (*Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b*) en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala de ratas Wistar macho adultas. Se encontró que la inhibición de las HDACs evitó que el estrés agudo deteriorara la consolidación de la memoria espacial y potenciara el incremento en los niveles de corticosterona después de la prueba de memoria a largo plazo; además, la inhibición de las HDACs evitó que el estrés indujera cambios en los niveles de acetilación de histonas y en la expresión de GR y HDAC2 en la corteza, el hipocampo o la amígdala de animales entrenados y no entrenados en la tarea espacial. Sin embargo, la inhibición de las HDACs no evitó que el estrés agudo alterara la expresión de subunidades del receptor NMDA, con excepción de los cambios inducidos en *Grin2b* en la corteza prefrontal de animales entrenados en la tarea espacial. Estos resultados sustentan la hipótesis de que el deterioro en la consolidación de la memoria espacial causado por estrés agudo supone la alteración del balance de acetilación de histonas, y sugieren que este mecanismo epigenético también tiene un papel en la regulación de la respuesta de estrés y la expresión de GR y HDAC2 en regiones del cerebro que participan en la consolidación de la memoria.

*Palabras clave:* Estrés agudo, memoria espacial, acetilación de histonas, corticosterona, GR, HDAC2, TSA, epigenética.

## ABSTRACT

Acute stress induced before spatial training impairs memory consolidation. Although some cellular and molecular underpinnings of such effect have been described, the epigenetic mechanisms involved have not yet been studied. Since spatial training and intense stress have opposite effects on histone acetylation balance, it is conceivable that disruption of such balance may underlie acute stress-induced spatial memory consolidation impairment, and that inhibiting histone deacetylases would prevent such effect. Here it was tested the histone deacetylase inhibition with Trichostatin-A effectivity to prevent delayed effects of acute stress on: a) spatial memory consolidation, b) plasma corticosterone levels, c) histone acetylation, d) glucocorticoid receptor (GR/*Nr3c1*), e) histone deacetylase 2 (HDAC2/*Hdac2*), and f) NMDA receptor subunits (*Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b*) expression on prefrontal cortex, hippocampus, and amygdala of male adult Wistar rats. Notably, histone deacetylase inhibition (HDACi) prevented stress-induced memory impairment and stress-induced increased plasma corticosterone levels in trained animals; also, HDACi prevented stress effects on histone acetylation, and GR/*Nr3c1* and HDAC2/*Hdac2* expression in prefrontal cortex, hippocampus or amygdala of trained and non-trained animals. However, HDACi did not prevent stress-induced effects on NMDAs' subunits expression, except for *Grin2b* in the prefrontal cortex of trained animals. The aforementioned results support the hypothesis that acute stress-induced memory impairment is related to altered histone acetylation balance, and suggests an epigenetic regulation of GR and HDAC2 expression in brain regions related to memory consolidation and stress response.

*Keywords:* Acute stress, spatial memory, histone acetylation, corticosterone, GR receptor, HDAC2, TSA, epigenetics.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al profesor Alejandro Múnera por su apoyo, enseñanzas, y esmerada dirección de esta tesis.

A la profesora Marisol Lamprea por su apoyo, y por permitirme realizar en su Laboratorio los experimentos comportamentales incluidos en esta tesis.

A la profesora Julieta Troncoso por su confianza y retroalimentación sobre los resultados del proyecto.

A los profesores Orlando Chaparro y Gonzalo Arboleda, miembros del comité tutorial, por sus observaciones y sugerencias en el desarrollo de la tesis.

Al Doctorado en Ciencias Biomédicas y a sus profesores por la formación recibida en el transcurso del programa.

Al profesor Ángel Manuel Carrión por permitirme realizar estancias de investigación en su Laboratorio en la División de Neurociencias de la Universidad Pablo de Olvide – España; también a sus estudiantes de doctorado Sara Bachiller e Irene Suárez por su entrenamiento en técnicas de PCR e inmunohistoquímica.

A la Doctora Gloria Patricia Cardona y a su estudiante de doctorado Johanna Andrea Gutiérrez por su entrenamiento en técnicas de inmunofluorescencia y microscopia confocal en la Sede de Investigaciones Universitarias de la Universidad de Antioquia.

Al Laboratorio de Equipos Comunes de la Facultad de Medicina donde realicé los ensayos de ELISA, qRT-PCR y de microscopía confocal. Mi especial agradecimiento a Yolanda Cárdenas por su amabilidad y orientación en el manejo de los equipos.

A Tatiana Báez y Jonathan Muñoz por su orientación en la adquisición de las imágenes por microscopia confocal.

A mis compañeros del grupo de Neurofisiología Comportamental, en particular a Françoise Díaz, Jeimmy Cerón y Ginna Ureña, por brindarme su amistad a lo largo de estos años, y por su apoyo en la recolección de las muestras de tejido utilizadas en los ensayos de la tesis.

A mis compañeros del Doctorado, por su amistad, compañía y apoyo en este proceso. Especial agradecimiento a Lucía Botero por su ayuda en la superación de dificultades técnicas en la realización de ensayos de inmunofluorescencia.

Al Instituto Nacional de Salud por proveer los sujetos experimentales incluidos en todos los experimentos de la tesis.

A la International Brain Research Organization - Latin American Regional Committee (LARC) por la financiación de mi primera estancia de investigación en la División de Neurociencias de la Universidad Pablo de Olavide.

A Colciencias, por concederme el crédito condonable para la financiación de mis estudios en el marco del programa Nacional de formación de investigadores “Generación del Bicentenario”, y por la financiación del proyecto “Bloqueo de la desacetilación de histonas como herramienta para prevenir los efectos nocivos del estrés sobre la memoria y la plasticidad sináptica asociada al aprendizaje” Contrato No. FP44842-621-2014.

Finalmente, y de forma especial, agradecimiento a mi familia por su amor, compañía y comprensión durante estos años. Gracias por ser mi motivo para persistir ante las dificultades y por estar siempre a mi lado.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
TABLA DE CONTENIDO .....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABLAS .....	xv
ABREVIATURAS.....	xvi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Memoria .....	2
1.1.1. Mecanismos moleculares en la formación de la memoria .....	4
1.1.2. Mecanismos epigenéticos en la consolidación de la memoria .....	7
1.1.3. Memoria y acetilación de histonas .....	11
1.2. Estrés .....	15
1.2.1. Respuesta de estrés .....	15
1.2.3. Mecanismos epigenéticos asociados al estrés .....	22
1.3. Inhibidores de las Desacetilasas de Histonas.....	28
1.3.1. Facilitación epigenética.....	28
1.3.2. Tipos de inhibidores de las HDACs y usos terapéuticos .....	29
1.4. Pregunta de Investigación e Hipótesis.....	34
1.5. Justificación .....	35
2. OBJETIVOS .....	36
2.1. Objetivo General.....	37
2.2. Objetivos Específicos .....	37
3. METODOLOGÍA.....	38
3.1. Sujetos Experimentales .....	39
3.2. Inducción de Estrés Agudo por Restricción Motora .....	40
3.3. Entrenamiento en el Laberinto Espacial de Barnes .....	41
3.3.1. Laberinto.....	41
3.3.2. Habitación .....	42
3.3.3. Entrenamiento.....	42
3.3.4. Prueba de memoria espacial a largo plazo .....	44
3.3.5. Registro y análisis del comportamiento.....	44
3.4. Inhibición Sistémica de las Desacetilasas de Histonas.....	45
3.5. Cuantificación de los Niveles de Corticosterona en Plasma .....	46
3.6. Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia .....	47
3.6.1. Fijación y sección del tejido cerebral.....	47
3.6.2. Detección por inmunohistoquímica histona H3 acetilada en la lisina 14 ...	47
3.6.3. Detección de GR y HDAC2 por inmunofluorescencia .....	49
3.7. Cuantificación de la Expresión Génica por PCR en Tiempo Real.....	50
3.7.1. Extracción de RNA.....	50



3.7.2. Calidad y cantidad de RNA .....	51
3.7.3. Transcripción reversa.....	51
3.7.4. PCR cuantitativa (qPCR) .....	52
3.7.5. Análisis de la expresión génica relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) .....	53
3.8. Diseño Experimental.....	53
3.8.1. Grupos experimentales .....	54
3.9. Análisis Estadístico .....	56
3.10. Aspectos Éticos y de Bioseguridad.....	56
4. RESULTADOS .....	57
4.1. Efectos del Estrés Agudo y la TSA en Animales Sin Entrenamiento Espacial..	58
4.1.1. Niveles de corticosterona en plasma .....	58
4.1.2. Acetilación de lisina 14 de la histona H3 en tejido cerebral.....	59
4.1.2.1. Corteza prelámbica .....	59
4.1.2.2. Hipocampo .....	60
4.1.2.3. Amígdala .....	62
4.1.3. Expresión y co-localización de GR y HDAC2 en tejido cerebral.....	63
4.1.3.1. Corteza prelámbica .....	63
4.1.3.2. Hipocampo .....	65
4.1.3.3. Amígdala .....	71
4.1.3.4. Correlaciones entre los niveles de expresión de acH3K14, HDAC2 y GR. ....	74
4.1.4. Expresión génica en tejido cerebral .....	75
4.1.4.1. Corteza prefrontal.....	75
4.1.4.2. Hipocampo .....	80
4.1.4.3. Formación amigdalina .....	84
4.2. Efectos del Estrés Agudo y la TSA en Animales con Entrenamiento en la Tarea Espacial.....	89
4.2.1. Aprendizaje de la tarea espacial .....	89
4.2.2. Memoria espacial a largo plazo.....	91
4.2.3. Niveles de corticosterona después de la prueba de memoria.....	99
4.2.3.1 Correlaciones entre niveles de corticosterona y desempeño en la prueba .....	100
4.2.4. Acetilación de lisina 14 de la histona H3 en tejido cerebral.....	101
4.2.4.1. Corteza prelámbica .....	101
4.2.4.2. Hipocampo .....	103
4.2.4.3. Amígdala .....	105
4.2.5. Expresión y co-localización de GR y HDAC2 en tejido cerebral.....	106
4.2.5.1. Corteza Prelámbica.....	106
4.2.5.2. Hipocampo .....	109
4.2.5.3. Amígdala .....	114
4.2.5.4. Asociación entre acH3K14, GR y HDAC2 .....	117
4.2.6. Expresión génica en tejido cerebral .....	117
4.2.6.1. Corteza prefrontal.....	117
4.2.6.2. Hipocampo .....	121
4.2.6.3. Formación amigdalina .....	125
4.3. Resumen de Resultados .....	129

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	139
5.1. Discusión.....	140
5.1.1. La inhibición de las HDACs previene que el estrés agudo deteriore la consolidación de la memoria espacial.....	140
5.1.2. La inhibición de las HDACs no mejora la consolidación de la memoria espacial en animales no estresados, pero favorece la conducta exploratoria ...	141
5.1.3. La inhibición de las HDACs previene los cambios en la acetilación de la histona H3 inducida por estrés en animales entrenados y no entrenados .....	142
5.1.4. El efecto del estrés agudo sobre la memoria espacial depende del momento de su inducción .....	144
5.1.5. El entrenamiento espacial, el estrés agudo y la inhibición de las HDACs alteran de forma dinámica el balance de acetilación de las histonas .....	146
5.1.7. La inhibición de las HDACs previene que el estrés agudo altere la expresión de GR/ <i>Nr3c1</i> y los niveles de corticosterona en plasma después de la prueba de memoria.....	150
5.1.8. Existe una asociación entre la expresión de HDAC2 y GR, pero su co-localización no es alterada por los tratamientos experimentales.....	153
5.1.9. La inhibición de las HDACs no previene que el estrés altere a largo plazo la expresión de sub-unidades del receptor NMDA.....	154
5.1.10. Los efectos del estrés agudo están mediados epigenéticamente por la alteración del balance de la acetilación de las histonas .....	156
5.1.11. Preguntas de investigación derivadas de los resultados obtenidos.....	157
5.2. Conclusiones .....	161
5.3. Perspectivas Futuras .....	162
REFERENCIAS.....	163
ANEXOS .....	184
ANEXO A: Efectos Demorados de la Restricción de Movimientos Sobre la Conducta Defensiva y los Niveles de Corticosterona.....	185
ANEXO B: Hiperacetilación a Corto Plazo Inducida por la Inhibición de las HDACs con TSA.....	187
ANEXO C: Efectos Tardíos de la Inyección Intraperitoneal de DMSO .....	188
ANEXO D: Efectos de la Administración Intraperitoneal de DMSO o Solución Salina sobre la consolidación de la memoria espacial.....	189
ANEXO E: Efectos Globales de la Inhibición de las HDACs, el Estrés Agudo y el Entrenamiento Espacial.....	191
ANEXO F: Artículos y Presentaciones en Congresos.....	194

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos moleculares asociados a la adquisición y consolidación de la memoria .....	5
Figura 2. Control epigenético de la transcripción.....	8
Figura 3. Activación y regulación del eje HPA en roedores.....	17
Figura 4. Efectos comportamentales, celulares y moleculares del estrés.....	20
Figura 5. Efectos del estrés agudo sobre el aprendizaje y la memoria dependientes del hipocampo.....	22
Figura 6. Modelo teórico de facilitación epigenética por iHDAC.....	29
Figura 7. TSA y acetilación de histonas.....	31
Figura 8. Estrés por restricción de movimientos.....	41
Figura 9. Protocolo de entrenamiento espacial en el laberinto circular de Barnes.....	43
Figura 10. Integridad del RNA.....	51
Figura 11. Amplificación <i>Gapdh</i> .....	53
Figura 12. Diseño experimental.....	54
Figura 13. La inducción de estrés seguida de la inyección de TSA incrementó a largo plazo los niveles de corticosterona por encima del nivel basal.....	58
Figura 14. La TSA previno que el estrés provocara un incremento de acH3K14 en la corteza prelímbica.....	59
Figura 15. La TSA evitó que el estrés provocara un aumento significativo de acH3K14 en la fascia dentada .....	60
Figura 16. La TSA evitó que el estrés provocara aumento de acH3K14 en CA1...	61
Figura 17. La TSA evitó que el estrés provocara aumento significativo de acH3K14 en la amígdala basolateral .....	62
Figura 18. La TSA previno que el estrés provocara un decremento en la expresión de GR y HDAC2 en la corteza prelímbica .....	64
Figura 19. La expresión de GR y HDAC2 correlacionó positivamente en la corteza prelímbica, pero los tratamientos no alteraron su co-localización en el núcleo.....	65
Figura 20. La TSA evitó que el estrés agudo incrementara la expresión de GR y HDAC2 en la fascia dentada .....	67
Figura 21. La expresión de GR y HDAC2 correlacionó positivamente en la fascia dentada. La TSA redujo significativamente la co-localización de GR y HDAC2 en animales estresados .....	68

Figura 22. La TSA redujo la expresión de GR pero evitó que el estrés indujera la reducción de HDAC2 en CA1 .....	70
Figura 23. La expresión de GR y de HDAC2 correlacionó positivamente en CA1, y la TSA redujo su co-localización en animales estresados .....	71
Figura 24. El estrés y la TSA redujeron la expresión de HDAC2 en la amígdala; sin embargo, esta reducción fue menor en animales estresados inyectados con TSA .....	73
Figura 25. La expresión de GR y HDAC2 no correlacionó en la amígdala; sin embargo, la TSA redujo su co-localización en animales no estresados.....	74
Figura 26. Correlaciones entre el nivel de acH3K14 y la expresión de HDAC2 o GR en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala .....	75
Figura 27. La TSA evitó que el estrés provocara disminución de la transcripción de <i>Nr3c1</i> y <i>Hdac2</i> en la corteza prefrontal .....	76
Figura 28. La TSA no evitó que el estrés indujera la reducción de la transcripción de <i>Grin1</i> y <i>Grin2b</i> en la corteza prefrontal .....	78
Figura 29. La inducción de estrés seguida de la inyección de TSA redujo a largo plazo la razón <i>Grin2b/Grin2a</i> en la corteza prefrontal .....	79
Figura 30. El estrés redujo la transcripción de <i>Nr3c1</i> en el hipocampo. La TSA incrementó los niveles de transcripción de <i>Hdac2</i> en animales no estresados.....	80
Figura 31. La TSA no previno que el estrés provocara reducción de la transcripción de <i>Grin1</i> , <i>Grin2a</i> y <i>Grin2b</i> en el hipocampo .....	83
Figura 32. Los tratamientos experimentales no alteraron la razón <i>Grin2b/Grin2a</i> en el hipocampo .....	84
Figura 33. La TSA evitó la reducción inducida por estrés en la transcripción de <i>Nr3c1</i> y <i>Hdac2</i> en la amígdala .....	85
Figura 34. La TSA no previno que el estrés indujera la reducción de la transcripción de <i>Grin1</i> , <i>Grin2a</i> y <i>Grin2b</i> en la amígdala .....	87
Figura 35. Los tratamientos experimentales no alteraron la razón entre la expresión <i>Grin2b/Grin2a</i> en la amígdala .....	88
Figura 36. El estrés no alteró el proceso global de adquisición de la tarea espacial .....	90
Figura 37. La TSA mejoró la memoria espacial a largo plazo en animales estresados .....	92
Figura 38. La TSA previno la pérdida de preferencia por el agujero meta inducida por el estrés .....	96
Figura 39. La TSA previno la pérdida de preferencia relativa por el agujero meta inducida por el estrés .....	98

Figura 40. La TSA previno que el estrés aumentara los niveles de corticosterona inducidos en respuesta a la prueba de memoria .....	100
Figura 41. La concentración de corticosterona en plasma se asoció con el desempeño en la prueba de memoria .....	101
Figura 42. La TSA previno que el estrés indujera la reducción del nivel de acH3K14 en la corteza prelímbica .....	102
Figura 43. El nivel de acH3K14 en la corteza prelímbica se asoció con el desempeño durante la prueba de memoria .....	102
Figura 44. La TSA previno que el estrés agudo indujera la reducción de los niveles de acH3K14 en la fascia dentada .....	103
Figura 45. Los niveles de acH3K14 se asociaron con el desempeño durante la prueba de memoria .....	104
Figura 46. La TSA aminoró la reducción en los niveles de acH3K14 en CA1 en animales estresados .....	105
Figura 47. Los tratamientos experimentales no afectaron los niveles de acH3K14 en el núcleo basolateral de la amígdala .....	106
Figura 48. La TSA evitó que el estrés indujera la reducción en la expresión de GR, pero no de HDAC2, en la corteza prelímbica .....	107
Figura 49. La expresión de GR y HDAC2 correlacionó positivamente en la corteza prelímbica, pero los tratamientos experimentales no afectaron su co-localización .....	109
Figura 50 La TSA evitó que el estrés incrementara la expresión de GR, pero no de HDAC2 en la fascia dentada .....	110
Figura 51. La expresión de GR y HDAC2 correlacionó positivamente en la fascia dentada, pero los tratamientos experimentales no alteraron su co-localización ...	111
Figura 52. La TSA redujo la expresión de GR en CA1, mientras previno el decremento en la expresión de HDAC2 en animales estresados .....	113
Figura 53. La expresión de GR y de HDAC2 correlacionó significativamente en CA1, pero los tratamientos experimentales no alteraron su co-localización .....	114
Figura 54. El entrenamiento espacial redujo la expresión de GR y HDAC2 en la amígdala. La TSA atenuó los efectos del estrés sobre la expresión de HDAC2 ...	115
Figura 55 La expresión de GR y HDAC2 no se asoció en la amígdala basolateral. Los tratamientos experimentales no alteraron la co-localización de GR y HDAC2 .....	116
Figura 56. La expresión de GR se asoció de forma significativa con la expresión de acH3K14 en la corteza prelímbica y la fascia dentada.....	117

Figura 57. El entrenamiento espacial redujo a largo plazo la transcripción de <i>Nr3c1</i> y <i>Hdac2</i> en la corteza prefrontal. La TSA revirtió el efecto del estrés en la transcripción de <i>Nr3c1</i> .....	118
Figura 58. El entrenamiento espacial redujo la transcripción de <i>Grin1</i> y <i>Grin2b</i> en la corteza prefrontal. La TSA previno el efecto del estrés sobre la transcripción de <i>Grin2b</i> .....	120
Figura 59. El entrenamiento espacial redujo la expresión de <i>Grin2b</i> con relación a <i>Grin2a</i> en la corteza prefrontal. La TSA acentuó tal reducción .....	121
Figura 60. El entrenamiento espacial redujo la transcripción de <i>Nr3c1</i> en el hipocampo. La TSA atenuó la reducción de <i>Nr3c1</i> en animales no estresados, pero la acentuó en estresados .....	122
Figura 61. El entrenamiento redujo la transcripción de <i>Grin1</i> , <i>Grin2a</i> y <i>Grin2b</i> en el hipocampo .....	123
Figura 62. El estrés incrementó la expresión de <i>Grin2b</i> con relación a <i>Grin2a</i> en el hipocampo y la TSA acentuó tal efecto .....	125
Figura 63. El entrenamiento redujo la transcripción de <i>Nr3c1</i> en el hipocampo ...	126
Figura 64. El entrenamiento espacial redujo la transcripción de <i>Grin2b</i> en la amígdala .....	127
Figura 65. Los tratamientos experimentales no alteraron la expresión relativa de <i>Grin2b</i> con relación a <i>Grin2a</i> en la amígdala .....	128
Figura 66. Modelo explicativo de la efectividad de la inhibición de las HDACs para prevenir los efectos del estrés agudo en animales no entrenados en la tarea espacial .....	156
Figura 67. Modelo explicativo de la efectividad de la inhibición de las HDACs para prevenir los efectos del estrés agudo en animales entrenados en el laberinto espacial de Barnes .....	157
Figura 68. Preguntas de investigación derivadas de los resultados obtenidos en los experimentos realizados en animales sin entrenamiento espacial.....	158
Figura 69. Preguntas de investigación derivadas de los resultados obtenidos en los experimentos realizados en animales entrenados en la tarea espacial.....	159

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Enzimas asociadas a la regulación epigenética de la memoria .....	10
Tabla 2. Acetilación de histonas, plasticidad sináptica y consolidación de la memoria .....	13
Tabla 3. Mecanismos epigenéticos del estrés en el cerebro .....	26
Tabla 4. Efecto de los inhibidores de las HDACs sobre el comportamiento.....	33
Tabla 5. Resultados en animales sin entrenamiento espacial.....	130
Tabla 6. Resultados en animales entrenados en la tarea espacial.....	132
Tabla 7. Efectividad de la TSA para prevenir los efectos del estrés agudo .....	136

## ABREVIATURAS

$\alpha$ CaMKII: calcio-calmodulina II quinasa A  
AcH3K14: Acetilación de la lisina (K) 14 de la histona H3  
ACTH: Hormona adrenocorticotropa  
AMPA: Receptor del ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico  
APP: Proteína precursora amiloidea  
AP-1: Proteína activadora 1  
Arc: Proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad  
BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro  
BSA: Albúmina bovina sérica  
cAMP: Adenosín monofosfato cíclico  
cDNA: DNA complementario  
C/EBP: Proteína de unión al potenciador CCAAT  
CBP: Proteína de unión a CREB  
c-Fos: Oncogen homólogo del osteosarcoma viral murino FBJ  
CRE: Elemento de respuesta al AMP cíclico  
CREB: Proteína de unión a CRE  
CRH: Hormona liberadora de corticotropina  
DMSO: Dimetil-sulfóxido  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
DNMTs: Metiltransferasas de DNA  
EA: Enfermedad de Alzheimer  
EGR-1: Proteína 1 de respuesta al crecimiento temprano o zif268  
ELISA: Ensayo de inmuno-absorción ligado a enzimas  
ELK-1: Factor de transcripción semejante a E1  
ERK: proteína quinasa activada por mitógenos  
ERK1/2: Proteínas quinasas activadas por mitógenos1/2  
ETS: Factores de transcripción de la familia E26  
FGF-18: Factor de crecimiento de fibroblastos 18  
FB: Fenilbutirato  
G9a: N-metiltransferasa de lisina de histonas de eucromatina 2  
GABA: ácido gamma-aminobutírico  
GABA-A: Receptor ionotrópico tipo A del ácido gamma-aminobutírico  
GABA-B: Receptor metabotrópico tipo B del ácido gamma-aminobutírico  
GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa  
GC: Glucocorticoides  
gDNA: DNA genómico  
GLP: N-metiltransferasa de lisinas de histonas de eucromatina 1  
Glu: Glutamato  
GNATs: N-acetil-transferasas relacionadas con Gcn5  
GR: Receptor de glucocorticoides  
GRE: Elemento de respuesta a los glucocorticoides  
*Grin1*: Gen que codifica para la subunidad NR1 del receptor NMDA  
*Grin2a*: Gen que codifica para la subunidad NR2A del receptor NMDA  
*Grin2b*: Gen que codifica para la subunidad NR2B del receptor NMDA  
HATs: Histonas acetiltransferasas  
HDACs: Histonas desacetilasas  
HDAC2: Desacetilasa de histonas-2



*Hdac2*: Gen que codifica para la histona desacetilasas-2  
 HMT: Histona metiltransferasa  
 HPA: Hipotálamo-pituitaria-adrenal  
 HMDs: Demetilinas de histonas  
 HMTs: Metiltransferasas de histonas  
 Hsp-90: Proteína de shock térmico de 90 kDa  
 IEGs: Genes de inducción temprana  
 IgG: Inmunoglobulina  
 iHDACs: Inhibidores de las histonas desacetilasas  
 IP<sub>3</sub>: Inositol trifosfato  
 LCE: Laberinto en cruz elevado  
 LTD: Depresión sináptica a largo plazo  
 LTP: Potenciación sináptica a largo plazo  
 MAP2: Proteína asociada a microtúbulos 2  
 MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos  
 MBD1: proteína de unión a metil-CpG1  
 MC: Mineralcorticoides  
 MeCP2: Proteína 2 con dominio de unión a metil-CpG  
 MEF2A: Factor potenciador específico de miocito 2A  
 mGluRs: Receptores metabotrópicos de glutamato  
 MLL2: N-metiltransferasa de lisinas de histonas 2D  
 MSK1: Proteína quinasa 1 activada por estrés y mitógenos  
 MR: Receptor de mineralcorticoides  
 MRO: Memoria de reconocimiento de objetos  
 mRNA: RNA mensajero  
 MYST: Acrónimo para las proteínas que incluye esta familia de histonas acetiltransferasas, MOZ, Ybf2, Sas2, and Tjp60  
 NaB: Butirato de sodio  
 NCAM: Molécula neural de adhesión celular  
 NcoR: Correpresor de receptor nuclear  
 NE: Norepinefrina  
 NF-AT: Factor nuclear de las células T activas  
 NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.  
 nGRE: Elemento de respuesta negativo a los glucocorticoides  
 NLET: Núcleo del lecho de la estría terminal  
 NMDA: Receptor de Glutamato tipo N-metil D-aspartato  
 NPV: Núcleo paraventricular del hipotálamo  
 NR1: subunidad 1 del receptor NMDA  
 NR2A: subunidad 2A del receptor NMDA  
 NR2B: subunidad 2B del receptor NMDA  
*Nr3c1*: Gen que codifica para el receptor de glucocorticoides (GR)  
 NuRD: complejo desacetilasa-remodelador del nucleosoma  
 Nurr 77: Receptor nuclear 77  
 p25: Proteína clivada de 25KD a partir de p35 (quinasa 5 dependiente de ciclina o CDK5)  
 p53: Proteína supresora de tumores p53  
 p300: Proteína p300 asociada a E1A  
 PBS: Tampón fosfato-salino

PCAF: Factor asociado a p300/CBP  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PFA: Paraformaldehído  
PKA: Proteína quinasa activada por adenilato ciclasa  
PKs: Proteínas quinasas  
PPs: Proteínas fosfatasas  
PKC: Proteína quinasa activada por calcio  
PMOC: Protiomelanocortina  
PP1: Proteína fosfatasa 1  
PP2B: Proteína fosfatasa 2b - calcineurina  
PS1: Presenilina 1  
PSD-95: Proteína 95 de la densidad post-sináptica  
qPCR: PCR cuantitativa  
REST: Factor de transcripción silenciador RE1  
RNA: Ácido ribonucleico  
RNA-Pol-II: RNA polimerasa II  
SAHA: Ácido hidroxámico suberoilánilida  
SAM: Sistema simpático-adrenomedular  
SB: Butirato de sodio  
Sin3A: Proteína con hélices emparejadas anfipáticas  
SMRT: Mediador silenciante de la acción de los receptores de hormonas tiroideas y retinoides.  
SNA: Sistema nervioso autónomo  
SP1: Factor de transcripción proteína específica  
SRC1: Coactivador del receptor de esteroides 1  
SRC3: Coactivador del receptor de esteroides 3  
STATs: Transductores de señal y activadores de la transcripción  
TAFs: Factores de asociación a TBP  
TBP: Proteína de unión a la caja TATA  
TET: Dioxigenasa de metilcitocina de translocación Ten-eleven  
TFIIA: Factor de transcripción II A  
TSA: Tricostatina A (Trichostatin A).  
VPA: Ácido valpróico  
\*: Significancia inferior a 0.05  
\*\*: Significancia inferior a 0.01  
\*\*\*: Significancia inferior a 0.001  
§: Diferencia significativa respecto a valores basales inferior a 0.05  
§§: Diferencia significativa respecto a valores basales inferior a 0.01  
§§§: Diferencia significativa respecto a valores basales inferior a 0.001

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1. Memoria

La memoria se define como el proceso a través del cual los organismos adquieren y almacenan información relevante acerca de sí mismos y del medio que los rodea (Olton, 1977). Este proceso se da en un curso temporal característico, donde la información almacenada puede persistir en el tiempo, ser recuperada o actualizada. Dependiendo de su duración o del tipo de información procesada, la memoria se ha subdividido en varias categorías que incluyen las memorias de corto y de largo plazo, y las memorias de tipo declarativo y procedimental (Squire, 2004). Además, se han identificado varias fases que incluyen en el proceso de formación de la memoria que incluyen su adquisición, consolidación, recuperación y actualización (Sweatt, 2010; Chen *et al.*, 2012). Los tipos de memoria y su procesamiento se describirán brevemente a continuación.

La **memoria de corto plazo** se define como aquella que permite mantener activa información recientemente adquirida por un período de segundos a minutos, mientras que la **memoria de largo plazo** se define como aquella que permite el almacenamiento y organización de la información por períodos prolongados que van desde horas hasta años. Esta memoria de largo plazo se divide a su vez en memoria declarativa y memoria no-declarativa o de procedimiento (Salamon, 2002).

La **memoria declarativa** se caracteriza por ser explícita, y se subdivide en semántica y episódica. Mientras que la **memoria semántica** almacena las representaciones y significados de palabras, conceptos y sus reglas de manipulación, la **memoria episódica** se encarga del almacenamiento de eventos relacionados con experiencias particulares del individuo en contextos espacio-temporales específicos (Squire, 2004). La presencia de memoria episódica en especies diferentes a la humana ha sido debatida y en la última década múltiples trabajos han demostrado que los roedores poseen la capacidad de establecer una memoria integrada acerca de los aspectos “qué”, “dónde” y “cuándo” de un evento (Kart-Teke *et al.*, 2006; Crystal, 2016). Este tipo de memoria se ha evaluado en tareas que requieren de la integridad funcional del hipocampo, tales como el aprendizaje espacial y el reconocimiento de objetos en su versión espacial (Eichenbaum and Fortin, 2005).

De forma opuesta a la memoria declarativa, la **memoria de procedimiento o no-declarativa** se define como aquella que le permite al individuo acumular información acerca de experiencias y acciones que no pueden fragmentarse en episodios ni ser

evocados explícitamente. Algunos fenómenos relacionados con este sistema de memoria corresponden a la adquisición de hábitos y habilidades, el aprendizaje no-asociativo y el condicionamiento clásico simple (Squire, 2004).

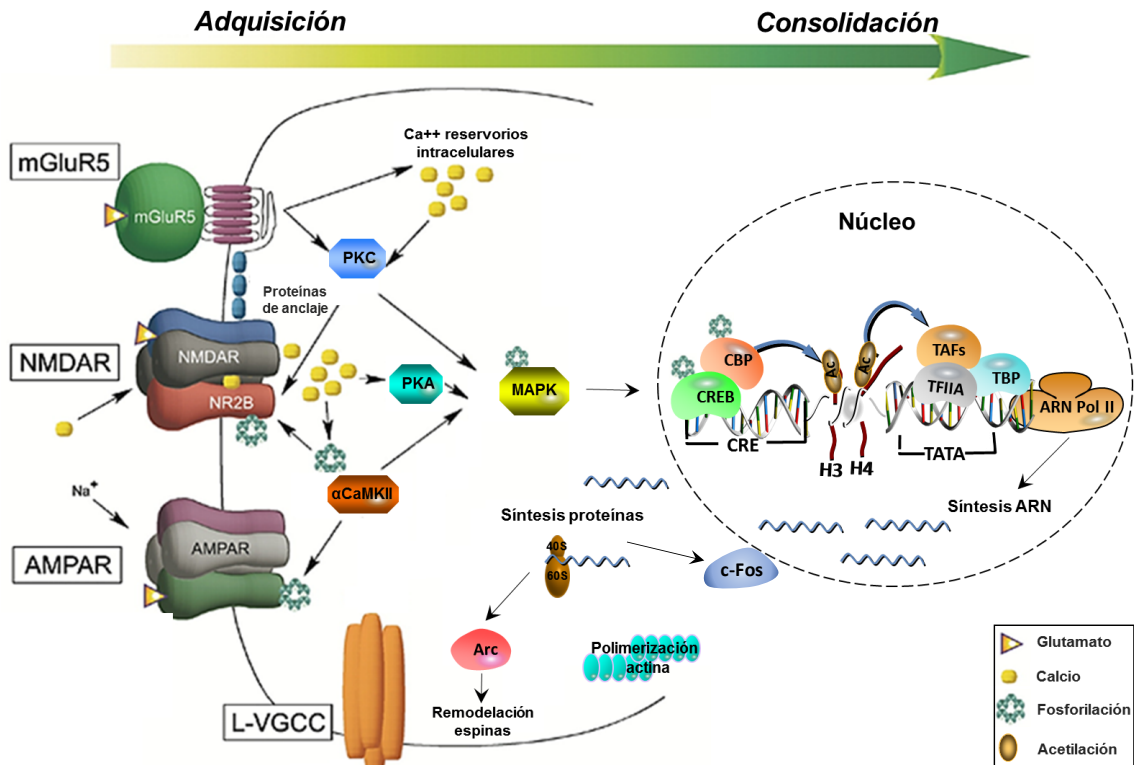
Por otro lado, el procesamiento de los diferentes tipos de información abarca múltiples fases que van desde su almacenamiento inicial hasta su persistencia a largo termino. Estas fases incluyen la adquisición, consolidación, recuperación y re-consolidación de la memoria.

La **adquisición** de la memoria ocurre cuando el animal aprende relaciones entre estímulos o adquiere las habilidades o destrezas necesarias para responder adecuadamente a un contexto o situación (Good, 2002). Una vez adquirida, la información puede ser almacenada de manera prolongada en un proceso denominado consolidación (Alberini, Bambah-mukku and Chen, 2012). La **consolidación** de la memoria requiere de cambios moleculares en células de regiones específicas del cerebro, así como cambios en la comunicación entre regiones cerebrales, por lo que se distinguen dos formas de consolidación. La **consolidación celular o sináptica**, hace referencia a los cambios moleculares y celulares que ocurren de manera rápida (horas) en células de las regiones inicialmente involucradas en el procesamiento de la información, como el hipocampo y la amígdala (Kitamura *et al.*, 2017). Mientras que la **consolidación de sistemas** hace referencia a la persistencia de la información por períodos de tiempo prolongados y cuya evocación no requiere de la integridad del hipocampo, pero sí de la corteza cerebral. La consolidación de sistemas involucra múltiples oleadas de cambios moleculares y celulares en las neuronas de la corteza, procesos que inician en el momento de la adquisición inicial (Kitamura *et al.*, 2017), pero que además persisten de manera tardía con relación al momento de adquisición de la información (días – meses) (Walters and Zovkic, 2015). El proceso de consolidación de la memoria, como veremos en detalle más adelante, puede ser alterado por múltiples intervenciones conductuales y farmacológicas que incluyen, por ejemplo, la exposición a eventos estresantes (Sandi and Pinelo-Nava, 2007; Schwabe *et al.*, 2012), la administración de hormonas como la adrenalina o los glucocorticoides (Roesler and Schröder, 2011; McReynolds *et al.*, 2014), o la administración de agentes que afectan la regulación de la expresión génica (Hawk, Florian and Abel, 2011; Gräff and Tsai, 2013b).

En las condiciones adecuadas, la información almacenada puede ser evocada en un proceso que se ha denominado **recuperación** (Tonogawa *et al.*, 2015). La recuperación de la información la hace susceptible a su modificación, por lo que requiere de un nuevo proceso de estabilización, el cual se ha denominado **re-consolidación** (Morris y cols., 2006). Este proceso, al igual que en la consolidación, es susceptible de ser alterado por múltiples intervenciones comportamentales y farmacológicas y se considera que comparte algunos de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la consolidación inicial de la memoria.

### **1.1.1. Mecanismos moleculares en la formación de la memoria**

La adquisición de información desencadena una cascada de eventos celulares y moleculares, donde la regulación de la transcripción génica y la síntesis de proteínas *de novo* son eventos críticos para la formación de memorias de largo plazo (Lattal, Radulovic and Lukowiak, 2006). Los mecanismos básicos asociados a la adquisición y consolidación de la memoria procedimental han sido estudiados en tareas asociativas y no-asociativas en modelos experimentales con vertebrados e invertebrados. En estos modelos se observa que el entrenamiento induce cambios post-traduccionales en proteínas quinasas, receptores de neurotransmisores y factores de transcripción, así como alteraciones en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Owen and Brenner, 2012; Alberini and Kandel, 2015). Estos cambios moleculares también se observan en células del hipocampo de roedores entrenados en tareas que modelan la memoria episódica, como en el entrenamiento en tareas espaciales, lo que muestra que muchos de los mecanismos que permiten la formación de la memoria están evolutivamente conservados (Landry, Kandel and Rajasethupathy, 2013). El entrenamiento en tareas espaciales, en laberintos tales como el acuático de Morris o el circular de Barnes, involucra la capacidad de los animales para procesar información compleja sobre la relación de estímulos, lo que les permite orientarse a partir de su posición relativa en un contexto (Good, 2002). Un esquema simplificado de los eventos moleculares subyacentes a la adquisición y consolidación de memoria explícita e implícita se presenta en la Figura 1.



**Figura 1. Mecanismos moleculares asociados a la adquisición y consolidación de la memoria.** La estimulación de receptores glutamatérgicos permite la entrada de calcio y la activación de segundos mensajeros que inducen la activación de quinasas como PKA, PKC y  $\alpha$ CaMKII. Estas quinasas fosforilan receptores tipo AMPA y NMDA, promoviendo su actividad, proceso que sustenta la adquisición inicial de la memoria. En paralelo, estas quinasas activan las quinasas de la vía MAPK induciendo su translocación al núcleo donde fosforilan factores de transcripción (p.ej. CREB) y acetiltransferasas de histonas (p.ej. CBP), promoviendo que la cromatina se relaje, el reclutamiento de la maquinaria transcripcional básica y la síntesis de RNA. El RNA mensajero es madurado y exportado del núcleo hacia el citoplasma o el retículo endoplásmico rugoso para su traducción en nuevas proteínas, como Arc, que participan en la remodelación de las espinas dendríticas, o en factores de transcripción, como c-Fos, que promueve una segunda oleada de síntesis de RNA. La síntesis de RNA y proteínas *de novo* sustenta el incremento en la eficiencia sináptica y la consolidación de la memoria. Figura modificada de Rodrigues et al., 2004.

En términos generales, la **cascada de eventos moleculares** inicia cuando se estimulan neuronas aferentes y se liberan transmisores sinápticos como el glutamato. Al ser liberado al espacio sináptico, el glutamato se une a receptores post-sinápticos ionotrópicos (NMDA, AMPA o kainato), lo que promueve la apertura de canales catiónicos que permean, entre otros iones, calcio. Además, el glutamato puede unirse a receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (mGluR<sub>1-8</sub>) que, mediante segundos mensajeros como el adenosin monofosfato cíclico (cAMP), activan la

proteína quinasa A (PKA), o a través del inositol trifosfato ( $IP_3$ ) induce la liberación de calcio desde los reservorios provocando la activación de la proteína quinasa C (PKC) y calcio-calmodulina II quinasa ( $\alpha$ CaMKII). Estas quinasas catalizan la unión covalente de grupos fosfato a otras proteínas, entre ellas, receptores de glutamato y otras quinasas cascada abajo, regulando su actividad. La fosforilación de receptores de glutamato tipo AMPA y NMDA provoca que estos receptores permanezcan abiertos por más tiempo, fenómeno que se ha asociado a la fase de adquisición de la memoria. En paralelo, la fosforilación de quinasas de la vía MAPK (por PKA, PKC y  $\alpha$ CaMKII), promueve su translocación al núcleo donde fosforilan factores de transcripción como la proteína de unión a CRE (CREB), o proteínas con actividad acetiltransferasa, como la proteína de unión a CREB (CBP) que regulan epigenéticamente la transcripción. La unión de CREB al elemento de respuesta al cAMP (CRE) en los promotores de los genes, y su asociación con CBP que acetila las histonas relajando la cromatina y contribuyendo al reclutamiento de elementos de la maquinaria transcripcional básica (TFII2A, TBP, TAFs, RNA-pol-II), estimula la transcripción de DNA a RNA mensajero (mRNA) de genes asociados a la plasticidad sináptica. El mRNA es posteriormente madurado y exportado del núcleo para su traducción en el citoplasma (proteínas solubles) o en el retículo endoplásmico rugoso (proteínas de membrana). La traducción rápida de genes de inducción temprana (IEGs), como c-Fos o EGR1, que actúan como factores de transcripción, promueve una segunda oleada de expresión génica tardía, mientras que otros IEGs, como la proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad (Arc) induce la reorganización de las densidades post-sinápticas y la expansión de las espinas dendríticas. Estos cambios en la expresión génica conducen a la modificación del número, conformación y ubicación de los receptores de neurotransmisores en las espinas dendríticas remodeladas. Estas alteraciones redundan en último término en cambios en la eficiencia sináptica y la consolidación de la memoria (Alberini & Kandel, 2015; Korte & Schmitz, 2016; Rosenberg et al., 2014).

En la última década se ha hecho énfasis en el estudio de los **mecanismos epigenéticos** que regulan la expresión génica durante la consolidación de la memoria y se ha puesto particular interés en estudiar el papel de la acetilación de las histonas, aunque otros mecanismos epigenéticos han sido descritos.

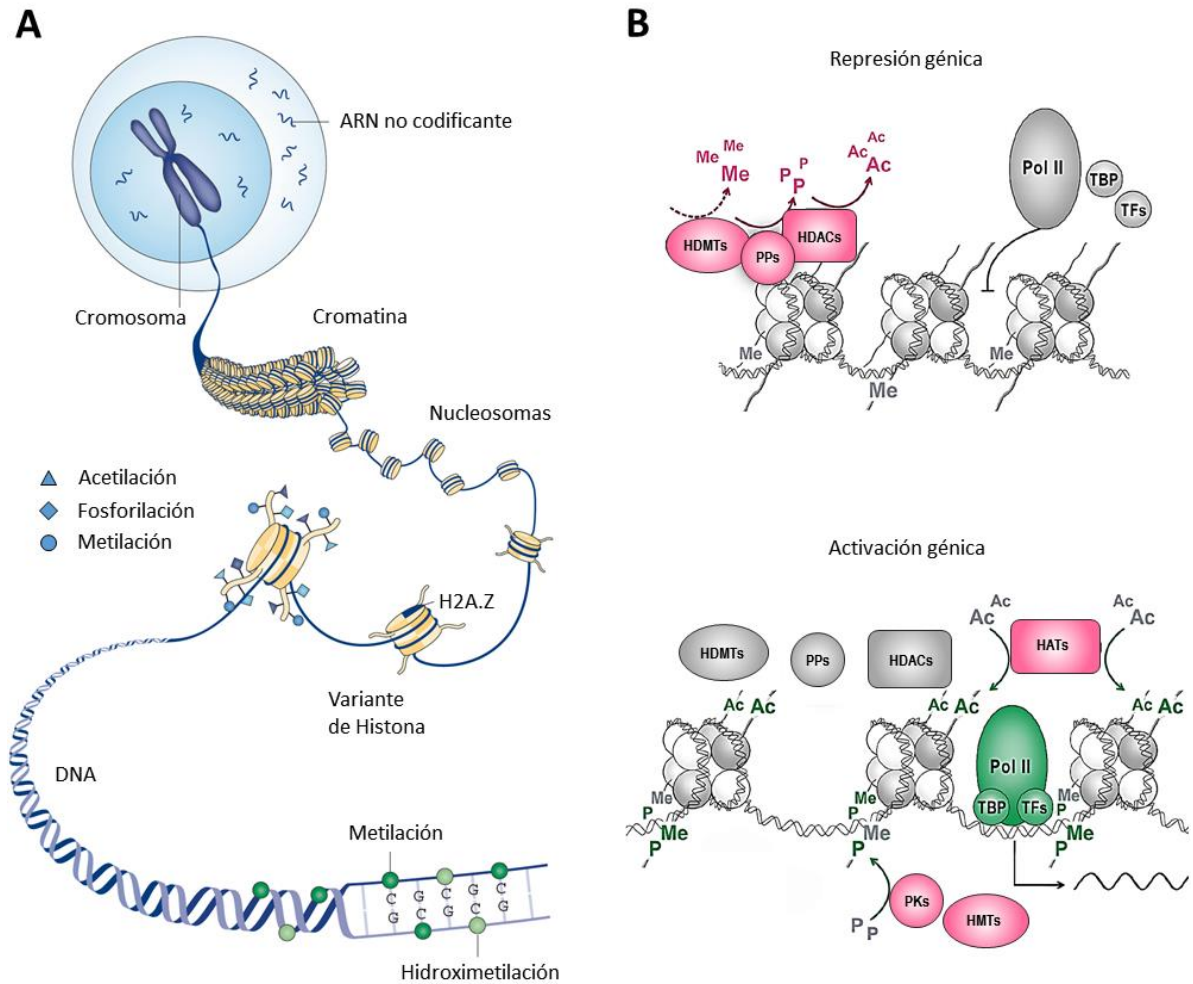


### 1.1.2. Mecanismos epigenéticos en la consolidación de la memoria

Como se describió en el apartado anterior, la formación de memoria requiere la activación repetida de receptores glutamatérgicos ionotrópicos y metabotrópicos, lo que, a su vez, inicia una cascada de señalización intracelular mediada por quinasas y la activación de factores de transcripción provocando cambios en la expresión de génica. En la última década se ha descrito que este proceso involucra múltiples mecanismos epigenéticos que regulan la transcripción y la traducción de RNA (Figura 2). Dentro de estos mecanismos se han descrito las modificaciones post-traduccionales en las colas de las histonas, el intercambio de variantes de histonas, la metilación e hidroximetilación del DNA, y el silenciamiento del RNA mensajero por RNA no codificante (Sultan and Day, 2011).

La regulación del proceso de transcripción depende del estado de empaquetamiento de la cromatina, que permite, o no, a la maquinaria transcripcional acceder hasta el DNA. El tipo de histonas presentes en la cromatina, sus cambios post-traduccionales y la metilación del DNA regulan dinámicamente este proceso. Las enzimas que regulan las **modificaciones post-traduccionales de las histonas** incluyen: a) las acetiltransferasas (HATs) y desacetilasas (HDACs) de histonas, que regulan el balance entre acetilación/desacetilación en residuos de lisina; b) las proteínas quinasas (PKs) y fosfatasas (PPs), que regulan la fosforilación de residuos de serina, treonina y tirosina; y, c) las metiltransferasas (HMTs) y demetilinasas (HDMTs) de histonas, que modulan la metilación, di-metilación o tri-metilación de sus residuos de lisina o arginina. Por su parte, la **metilación del DNA** es llevada a cabo por las metiltransferasas de DNA (DNMTs) que metilan sitios ricos en citosina; las cuales una vez metiladas puede ser oxidadas por enzimas de translocación Ten-eleven (TET) lo que provoca la **hidroximetilación del DNA**.

Las enzimas que afectan el estado de acetilación de las histonas actúan de manera conjunta bien con proteínas co-activadoras y factores de transcripción, lo que promueve la apertura de la cromatina (**euromatina**) y el acceso de la maquinaria transcripcional hasta el DNA e induce la transcripción génica, o bien en conjunto con factores co-represores, lo que promueve la condensación de la cromatina (**heterocromatina**) y reprime la expresión génica (Graff *et al.*, 2011).



**Figura 2. Control epigenético de la transcripción.** A. El DNA se enrolla alrededor de un octámero de histonas para conformar un nucleosoma. Los nucleosomas se conectan mediante el plegamiento del DNA alrededor de las histonas de unión H1 y se organizan en estructuras de orden mayor (cromatina, cromosomas). Múltiples mecanismos epigenéticos regulan la transcripción del DNA alterando la condensación de la cromatina, permitiendo o no el acceso de la maquinaria transcripcional básica (RNA-Pol-II, TBP, TFIIA) hasta el DNA. Estos mecanismos incluyen: cambios post-traduccionales en las colas de las histonas (acetilación, fosforilación, metilación), metilación e hidroximetilación del DNA, cambio de histonas canónicas por sus variantes (p.ej., H2A.Z variante de la histona H2A) y el silenciamiento del RNA mensajero por RNA no codificante. B. Las modificaciones post-traduccionales en las colas de las histonas son realizadas por enzimas que transfieren o remueven grupos acetilo de residuos lisina (HATs/HDACs), que adicionan o remueven grupos metilo de residuos lisina o arginina (HMTs/HDMs), y que adicionan o retiran grupos fosfato de residuos serina, treonina o tirosina (PK/PP). Figura adaptada de Bohacek & Mansuy (2015) y Koshibu et al. (2009).

En términos generales, la **fosforilación y acetilación de histonas** facilitan la transcripción génica, mientras que la **metilación de las histonas** puede promover o impedir la transcripción dependiendo del número de grupos metilo adicionados a residuos específicos en una histona en particular. Por su parte, la **metilación del DNA** conlleva a la represión génica, mientras que la **hidroximetilación** la promueve.

Con relación al papel de los mecanismos epigenéticos en la consolidación de la memoria, se ha descrito que el entrenamiento de distintos tipos de aprendizaje (miedo condicionado, reconocimiento de objetos), induce modificaciones post-traduccionales en las colas de las histonas en células del hipocampo, la amígdala o la corteza medial prefrontal, y que tales cambios permanecen desde algunas horas hasta días. Estas modificaciones incluyen: fosforilación de la histona H3 en la serina 10 (Chwang *et al.*, 2006), dimetilación y trimetilación de la histona H3 en residuos de lisina (Gupta *et al.*, 2010), y acetilación de las histonas H2A, H2B, H3 o H4 en residuos de lisina (Bousiges *et al.*, 2010, 2013; Gräff, Woldemichael, *et al.*, 2012). Adicionalmente, se ha encontrado que el entrenamiento en tareas de miedo condicionado induce la metilación transitoria del DNA en los promotores de genes que regulan negativamente la plasticidad sináptica como la proteína fosfatasa 1 (PP1) (Miller and Sweatt, 2007; Miller *et al.*, 2010). El papel de las enzimas que controlan el balance de fosforilación, acetilación y metilación de las histonas, y la metilación del DNA en la consolidación de la memoria se ha demostrado experimentalmente mediante intervenciones farmacológicas y el uso de animales manipulados genéticamente (Gräff and Tsai, 2013a). En la Tabla 1 se resumen los resultados de múltiples investigaciones experimentales que muestran la participación en la consolidación de la memoria de las enzimas que provocan cambios post-traduccionales en las colas de las histonas o metilan el DNA.

**Otros mecanismos epigenéticos** que regulan la formación de la memoria, pero que han sido menos estudiados, incluyen el silenciamiento de RNA mensajero por micro-RNAs y RNAs no codificantes largos (Landry, Kandel and Rajasethupathy, 2013; Earls, Westmoreland and Zakharenko, 2014), y la remodelación de la cromatina por complejos dependientes de ATP que mueven, eyectan o reestructuran nucleosomas (Yang *et al.*, 2016).

**Tabla 1.** Enzimas asociadas a la regulación epigenética de la memoria.

Clase	Efactor	Efecto	Referencias
HATs	CBP	Su delección condicional, expresión de una isoforma truncada, haploinsuficiencia o inhibición farmacológica reduce la acetilación de histonas en hipocampo, corteza o amígdala. Estas intervenciones deterioran la potenciación a largo plazo y la consolidación de memoria (espacial, miedo condicionado, reconocimiento de objetos y habilidades motoras).	(Alarcón <i>et al.</i> , 2004; Korzus, Rosenfeld and Mayford, 2004; Oliveira <i>et al.</i> , 2006, 2007; Barrett <i>et al.</i> , 2011)
	p300	Su delección condicional o la expresión de una variante truncada reduce la acetilación de la histona H3 en CA1 y corteza, e impide la consolidación de la memoria de miedo condicionado al contexto y reconocimiento de objetos.	(Oliveira <i>et al.</i> , 2007, 2011)
	PCAF	Su delección deteriora la consolidación de la memoria espacial y de reconocimiento de objetos.	(Maurice <i>et al.</i> , 2008)
HDACs	HDAC2	Su sobre-expresión en neuronas hipocampales promueve la desacetilación de histonas en regiones promotoras de genes asociados a la plasticidad sináptica e impide la formación de la memoria espacial. Su delección mejora la potenciación a largo plazo y la memoria espacial. Su inhibición selectiva promueve la acetilación de las histonas H3 y H4 y rescata déficits de memoria en modelos de Alzheimer.	(Guan <i>et al.</i> , 2009; Gräff, Rei, <i>et al.</i> , 2012; Wagner <i>et al.</i> , 2015)
	HDAC3	Su delección condicional o inhibición farmacológica selectiva en la región CA1 del hipocampo dorsal promueve la acetilación de la histona H4, la expresión de <i>c-Fos</i> y la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos.	(McQuown <i>et al.</i> , 2011)
	HDAC4	Su delección en el prosencéfalo deteriora la consolidación de la memoria espacial y el aprendizaje asociativo.	(Kim <i>et al.</i> , 2012)
HMTs	G9a GLP	Su inhibición en neuronas de la corteza entorrinal promueve la acetilación de la histona H3 y mejora la consolidación de miedo condicionado al contexto.	Gupta-Agarwal <i>et al.</i> (2012)
	MLL2	Su delección en neuronas del prosencéfalo disminuye la di y tri-metilación en la histona H3 en la fascia dentada y deteriora la memoria espacial.	(Kerimoglu <i>et al.</i> , 2013)
PKs	ERK MAPK	Su activación incrementa la fosfoacetilación de la histona H3 y favorece la consolidación del miedo condicionado. Su inhibición revierte estos efectos.	(Chwang <i>et al.</i> , 2006)
	MSK1	Su delección disminuye la fosfoacetilación de la histona H3 en el hipocampo y deteriora la memoria espacial y de miedo condicionado.	(Chwang <i>et al.</i> , 2007)
PPs	PP1	Su inhibición genética inducible en los núcleos de neuronas del prosencéfalo promueve la fosforilación, metilación y acetilación de histonas, efecto asociado a mejora en la adquisición y consolidación de la memoria espacial y de reconocimiento de objetos.	(Genoux <i>et al.</i> , 2002; Koshibu <i>et al.</i> , 2009; Gräff <i>et al.</i> , 2010)
DNMTs	DNMT1 DNMT3a	Su delección condicional produce déficits en la formación de la memoria espacial y el condicionamiento de miedo al contexto.	(Feng <i>et al.</i> , 2010)

Recientemente se ha identificado que la inducción de la expresión génica pone en marcha **mecanismos compensatorios** que reprimen activamente dicha expresión poco después de su inducción (Cho *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016; Yu and Kaang, 2016). Uno de los mecanismos que participan en este proceso es el intercambio de la H2A por su variante H2A.Z mediante el complejo desacetilasa-remodelador del nucleosoma (NuRD) (Yang *et al.*, 2016). De manera consistente, se ha encontrado que, después de un rápido incremento en los niveles de acetilación de histonas, los niveles caen por debajo del estado basal, efecto asociado al incremento en la expresión de proteínas de complejos co-represores como REST (Factor de transcripción silenciador RE1) o proteína con hélices emparejadas anfipáticas Sin3A que se asocian a proteínas con actividad desacetilasa como HDAC2 y HDAC3 (Lopez-Atalaya *et al.*, 2013; Carter *et al.*, 2015).

### 1.1.3. Memoria y acetilación de histonas

Dado que la regulación del balance de la acetilación de histonas es el mecanismo epigenético más estudiado en relación con la consolidación de la memoria, se revisará detalladamente en esta sección. Como se mencionó anteriormente, las enzimas que regulan el balance de acetilación de las lisinas en las colas de las histonas son las HATs y las HDACs. Las HATs transfieren grupos acetilo, generando dominios específicos de unión proteína-proteína (que son reconocidos por proteínas con bromodominios), y reclutan proteínas que participan de la transcripción génica. Por su parte, las HDACs remueven grupos acetilo y reclutan proteínas que reprimen la transcripción génica. La **regulación del balance en la acetilación de las histonas** ubicadas en las regiones promotoras de los genes permite la regulación dinámica de la transcripción génica.

Múltiples residuos de lisina en las histonas H2A, H2B, H3 y H4 pueden ser acetilados por **HATs** localizadas en el núcleo. Dentro de este tipo se diferencian, según su mecanismo catalizador, las familias: GNATs (*N*-acetil-transferasas relacionadas con Gcn5), las de dominio tipo MYST (MOZ, Ybf2, Sas2, and Tip60), y las caracterizadas por tener un dominio TAF250 como p300/CBP (Sternier and Berger, 2000). La mayoría de las HATs forman parte de complejos multiprotéicos, en los que los miembros de la familia p300/CBP son los reguladores más globales de la

transcripción y actúan en asociación con factores de transcripción como CREB y p53 (Chen *et al.*, 2004; Wapenaar and Dekker, 2016).

A su vez, existen varias familias de **HDACs**, que incluyen: las que dependen de zinc para tener actividad catalítica, entre las que se agrupan las de clase I (HDAC 1, 2, 3 y 8), clase II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10) y clase IV (HDAC 11); y, las dependientes de NAD<sup>+</sup> que conforman la clase III, conocidas también como sirtuinas (Palma and Ruiz i Altaba, 2004). Las HDAC1 y HDAC2 (clase I), localizadas en el núcleo, son las más estudiadas y están presentes en numerosos complejos donde actúan con co-represores de la actividad transcripcional como NCoR, REST, SMRT, MEF2A, MeCP2, Sin3A (Hudson *et al.*, 2015; Millard *et al.*, 2016).

La modificación de la estructura de la cromatina a través de la acetilación/desacetilación de histonas ha sido ampliamente relacionada con los procesos de plasticidad sináptica y memoria, identificándose un papel fundamental de las HATs del complejo p300/CBP y la desacetilasa HDAC2 (Tabla 1). Se ha descrito que distintas formas de entrenamiento inducen la acetilación de histonas en distintas regiones del cerebro, y que la administración de fármacos **inhibidores de las HDACs** (iHDACs) favorece la consolidación de la memoria (Tabla 2). Por ejemplo, el entrenamiento en tareas espaciales induce aumento en los niveles de acetilación en las histonas H2B, H3 y H4 en la fascia dentada y la región CA1 del hipocampo (Bousiges *et al.*, 2013; Dagnas and Mons, 2013), mientras que la administración de inhibidores de las HDACs de tipo I,II y IV, como la Tricostatina A (TSA) o el butirato de sodio (NaB), favorece la consolidación de la memoria espacial (Dagnas *et al.*, 2015; Villain, Florian and Rouillet, 2016). Es posible, que este efecto de mejora en la consolidación de la memoria espacial inducido por la inhibición de las HDACs sea mediado específicamente por el bloqueo de HDAC2, pues esta enzima regula negativamente la expresión de genes como *Bdnf*, *Egr1*, *c-Fos*, *Camk2a*, *Creb*, *Cbp*, *Sinapsina-2*, *Psd-95*, *Grin2a* y *Grin2b* en el hipocampo y su sobre-expresión deteriora la consolidación de la memoria espacial (Guan *et al.*, 2009). De manera semejante, se ha identificado, que el entrenamiento en una tarea de reconocimiento de objetos provoca incrementos en los niveles de acetilación en la lisina 14 de la histona H3 en el hipocampo de ratones, que inician decenas de minutos después del entrenamiento y que persisten hasta por 24 horas; en contraste, el incremento de la acetilación de la

histona H3 en la corteza aparece 24 horas después del entrenamiento y persiste hasta por 7 días (Gräff et al. 2012). Estos hallazgos sugieren la participación de la acetilación de histonas en el proceso de consolidación celular y de sistemas.

**Tabla 2.** Acetilación de histonas, plasticidad sináptica y consolidación de la memoria.

Proceso	Tarea	Mecanismo	Referencias
Plasticidad sináptica	Facilitación a largo plazo	Aumento de la acetilación de las histonas H3 (K14) y H4 (K8) en neuronas sensoriomotoras de <i>Aplysia Californica</i> . La TSA aumenta la facilitación.	(Guan et al., 2002; Hart et al., 2011)
	Potenciación a largo plazo	En el hipocampo de roedores, la TSA favorece la potenciación en asociación con aumento de la acetilación de la histona H3 (K14).	(Levenson et al., 2004; Miller, Campbell and Sweatt, 2008)
Memoria dependiente de la integridad del hipocampo	Memoria espacial	En roedores, 1 hora después del entrenamiento se observa aumento de la acetilación de las histonas H2B (K5/K12/K15/ K20), H3 (K14) y H4 (K12) en el hipocampo. Sin embargo, se encuentra hipoacetilación de la histona H3 (K14) en la fascia dentada y la corteza prelímbica 1 y 24 horas después del entrenamiento. La administración de TSA, NaB o VPA mejora la memoria espacial.	(Bousiges et al., 2013; Dagnas and Mons, 2013; Dagnas et al., 2015; Ureña, 2016; Villain, Florian and Roulet, 2016)
	Miedo condicionado al contexto	El entrenamiento induce aumento de la acetilación de la histona H3 en el hipocampo de roedores. La administración de TSA, NaB o ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) mejora la memoria.	(Levenson et al., 2004; Vecsey et al., 2007)
	Reconocimiento de objetos	El entrenamiento induce aumento de la acetilación de las histonas H3 (K14) y H4 (K5) entre 1 y 24 horas en el hipocampo y entre 1 y 7 días en la corteza medial prefrontal. En contraste, la mejora en la memoria inducida por activación de la amígdala se asocia con hipoacetilación de las histonas H3 (K14), H2B y H4 en la corteza insular 1 hora después del entrenamiento. La administración de TSA, NaB o MS275 mejora la memoria.	(Fontán-Lozano et al., 2008; Zhao, Fan and Frick, 2010; Hawk, Florian and Abel, 2011; Gräff, Woldemichael, et al., 2012; Zhu et al., 2016)
Memoria independiente de la integridad del hipocampo	Miedo condicionado a estímulos	El entrenamiento induce aumento de la acetilación de histona H3 en la amígdala basolateral. La administración de TSA, NaB o VPA mejora la memoria.	(Yeh, Lin and Gean, 2004; Bredy and Barad, 2008; Fontán-Lozano et al., 2008; Monsey et al., 2011)

Con relación a la regulación de la expresión génica en el hipocampo, se ha descrito en roedores que el entrenamiento en una tarea espacial en el laberinto acuático de Morris induce, durante por lo menos 24 horas, cambios en la expresión de genes que codifican para factores de crecimiento (FGF18), quinasas ( $\alpha$ CaMKII), receptores de neurotransmisores (GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub>, AMPA, NMDA, Kainato), proteínas de citoesqueleto (tubulina- $\beta$ , neuraxina, MAP2) y proteínas de interacción célula-célula (catenina- $\delta$ ) (Cavallaro *et al.*, 2002). Recientemente se identificó que el entrenamiento espacial en este laberinto induce la fosfo-acetilación de la histona H3 en promotores de genes de inducción temprana (*Fos* y *Egr-1*) en el hipocampo (Carter *et al.*, 2015).

De otra parte, se ha identificado que la formación de memorias que no requieren de la integridad del hipocampo, como el miedo condicionado a estímulos, también está sujeta a regulación epigenética. Se ha encontrado que el entrenamiento en una tarea de evitación pasiva induce aumento en la acetilación de la histona H3 en el núcleo basolateral de la amígdala y que la inhibición farmacológica de las HDACs favorece su consolidación (Monsey *et al.* 2011a; Bredy and Barad 2008; Yeh *et al.* 2004; Fontán-Lozano *et al.* 2008).



## 1.2. Estrés

En 1936, Hans Selye introdujo por primera vez el término estrés definiéndolo como la respuesta fisiológica del organismo ante diversos eventos que ponen en peligro su integridad y que representa un esfuerzo generalizado para adaptarse a las nuevas condiciones (Selye, 1998). La observación de pacientes y los estudios experimentales en animales realizados por Selye, indicaron que la exposición prolongada a una amplia variedad de eventos (frio, cirugía, intoxicación, infección, irradiación X, entre otros) genera una condición patológica caracterizada por hiperplasia adrenal, involución timo-linfática y ulceración gastrointestinal. El estrés es definido entonces como una **respuesta inespecífica** que involucra múltiples circuitos fisiológicos que permiten movilizar recursos energéticos con el fin de controlar las consecuencias de eventos que perturban la **homeostasis** del organismo (Pacák and Palkovits, 2001).

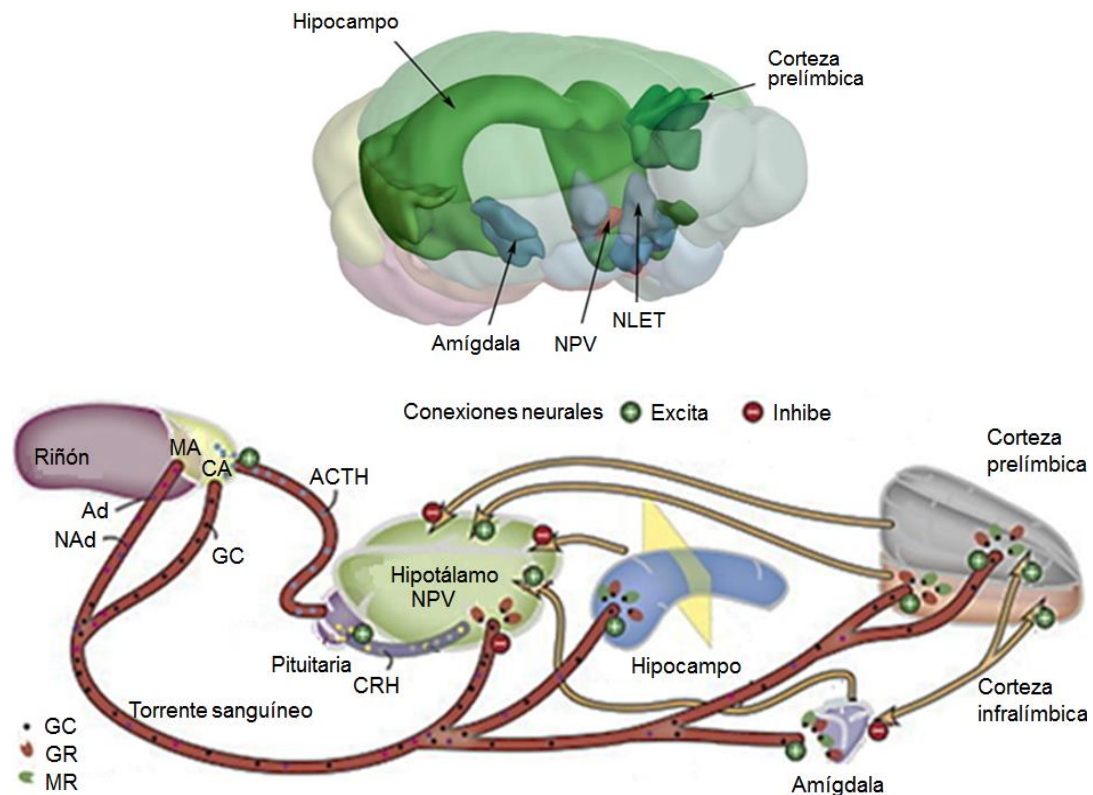
### 1.2.1. Respuesta de estrés

Para responder de manera efectiva a los eventos estresantes, el organismo desencadena una **respuesta coordinada entre varios sistemas**. Por ejemplo, al percibir una amenaza externa se seleccionan estrategias comportamentales apropiadas (sistema nervioso), destinando los recursos energéticos de manera preferente a una respuesta de congelamiento, huida o lucha (sistemas cardiovascular, respiratorio y muscular), al tiempo que se limitan temporalmente los recursos para sistemas no esenciales (sistemas digestivo y reproductivo) para responder a la amenaza externa (Shirazi *et al.*, 2015).

La coordinación de la respuesta de estrés involucra la activación del sistema simpático-adrenomedular (SAM) y del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) en interacción con estructuras en el sistema nervioso central y órganos y tejidos en la periferia. El **sistema SAM** incluye la rama simpática del sistema nervioso autónomo (SNA) y la médula adrenal. La **división simpática** del SNA se activa poco después del inicio del evento estresante, liberando noradrenalina desde sus neuronas pos-ganglionares, neurotransmisor que se une a receptores adrenérgicos localizados en los órganos inervados por esta vía. En paralelo, las neuronas pre-ganglionares de la rama simpática del SNA inervan directamente la **médula adrenal**, estructura que libera adrenalina y noradrenalina en el torrente sanguíneo, estimulando órganos y

tejidos que no son inervados de forma directa por el sistema simpático. La activación del sistema SAM produce vasoconstricción esplénica, dilatación pupilar y dilatación bronquial, aumento rápido de la capacidad respiratoria, la glucemia, el flujo sanguíneo en el músculo esquelético y la frecuencia y fuerza de las contracciones cardíacas (Tresguerres, Ariznavarreta Ruiz and Alfaro González, 2010), cambios fisiológicos que aumentan la disponibilidad de oxígeno y glucosa en órganos, músculos y cerebro, y permiten al organismo desplegar respuestas pertinentes para controlar los potenciales efectos nocivos del evento estresante. Poco después de la activación del sistema SAM, se activa el **eje HPA** cuya función principal es prolongar la disponibilidad de recursos metabólicos (Kim and Diamond, 2002). La actividad del eje HPA inicia con la activación de las neuronas parvocelulares en el **núcleo paraventricular del hipotálamo** (NPV), las cuales secretan la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el sistema porta de la eminencia media. La **CRH** alcanza sus receptores en células corticotrópicas de la **adenohipófisis** donde se activan cascadas de señalización mediadas por cAMP que promueven la transcripción de proopiomelanocortina (PMOC) y su modificación postraduccional en la hormona adrenocorticotropa (ACTH). La **ACTH** es liberada entonces al torrente sanguíneo y alcanza células adrenocorticales en la zona fascicular de la **corteza suprarrenal**, donde se une sus receptores. El receptor de ACTH está acoplado a una proteína G y promueve, a través de una cascada de segundos mensajeros que activan la PKA, la síntesis y liberación de glucocorticoides (cortisol/corticosterona) y en menor medida de mineralcorticoides. Los **glucocorticoides** liberados al torrente sanguíneo alcanzan sus receptores en órganos como el hígado y el riñón, donde estimula la conversión de grasas y proteínas en metabolitos intermedios que finalmente son transformados en glucosa (glucogénesis), lo que proporciona a los tejidos la energía adicional requerida para responder a las exigencias metabólicas impuestas por la situación de estrés (Smith and Vale, 2006). Los glucocorticoides atraviesan la barrera hematoencefálica y activa sus **receptores** (intracelulares o de membrana) en células de estructuras del **sistema nervioso central**, modulando de forma diferencial, según el contexto celular, vías de señalización intracelular, la expresión génica, la remodelación del citoesqueleto (densidad de espinas dendríticas y de tipo de receptores en ellas) y la liberación de neurotransmisores, neuropéptidos y neurotrófinas en hipocampo, amígdala y corteza prelímbica (Popoli *et al.*, 2012; Shirazi *et al.*, 2015). El devenir de la activación del eje

HPA es regulada por estas estructuras cerebrales (Figura 3), de manera tal que mientras la activación de los receptores de glucocorticoides en la amígdala favorece la liberación de glutamato en axones que proyectan sobre el NPV y potencia la respuesta de estrés, la activación de receptores de glucocorticoides en el **hipocampo** y la **corteza prelímbica** promueve la liberación de glutamato en axones que proyectan sobre el núcleo del lecho de la estría terminal (NLET) que, a su vez, envía proyecciones inhibitoras sobre neuronas del NPV (LeDoux, 1994; Franklin, Saab and Mansuy, 2012) inhibiendo la actividad del eje HPA.



**Figura 3. Activación y regulación del eje HPA en roedores.** Neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) secretan la hormona liberadora de corticotropina (CRH) al sistema porta hipofisario. En respuesta a la activación de receptores de CRH, la glándula pituitaria secreta la hormona adrenocorticotropa (ACTH). La activación de receptores de ACTH en la corteza de la glándula suprarrenal desencadena la liberación de glucocorticoides (GC) y mineralocorticoides (MC). La unión de GC a sus receptores (GR o MR) altera la liberación de glutamato y la expresión génica. El hipocampo, la amígdala y la corteza prelímbica poseen una alta concentración de receptores de glucocorticoides y regulan positiva o negativamente la actividad del eje HPA (proyecciones hacia el NPV que relevan en el núcleo del lecho de la estría terminal, NLET, arriba). Adaptado de Franklin and Mansuy 2010 y Shirazi et al. 2015.

Se han identificado dos tipos de receptores de hormonas sensibles a los glucocorticoides que corresponden a receptores de mineralocorticoides y de glucocorticoides. Los **receptores de mineralocorticoides (MR)** que como su nombre lo indica, son altamente afines a mineralocorticoides como la aldosterona, también tienen una alta afinidad por los glucocorticoides (cortisol y corticosterona). Este receptor se expresa principalmente en neuronas del hipocampo y en menor medida en amígdala y corteza prefrontal y permanecen en una alta proporción ocupados en condiciones basales, por lo que juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de circuitos límbicos. Por su parte, **los receptores de glucocorticoides (GR)**, presentan una afinidad por los glucocorticoides que es unas 10 veces menor que la que tienen los MR, por lo que se activan de forma específica solo cuando se incrementa la concentración de la hormona, tal como ocurre después de un evento estresante. Los receptores GR se expresan casi de manera ubicua en neuronas y células gliales en todo el cerebro, pero su expresión es mayor en células del NPV del hipotálamo y en el hipocampo; la activación de los receptores GR se ha relacionado con la regulación de la respuesta de estrés y la reactividad del eje HPA, así como con los efectos del estrés sobre la memoria (Groeneweg *et al.*, 2011).

Tanto los receptores MR como GR son factores de transcripción activados por su ligando, que en su forma no-ligada suelen estar en el citoplasma. En ausencia de hormona, los GR se localizan en el citosol, formando complejos con diversas proteínas, incluidas proteínas de choque térmico (p.ej. Hsp90). Una vez la hormona se une al receptor GR, éste sufre un cambio conformacional, se libera de sus proteínas chaperonas, y el complejo ligando-receptor se activa y transloca al núcleo. En el núcleo, el receptor activado y dimerizado puede alterar el proceso de transcripción de manera directa al unirse a **elementos de respuesta para glucocorticoides (GRE)** en el promotor de genes diana, generalmente promoviendo la transcripción a RNA; sin embargo, el receptor activado puede unirse **secuencias negativas GRE (nGRE)** como monómero, generalmente reprimiendo la transcripción. Recientemente se describió, que el efecto de activación o represión causado por los receptores GR activados está mediado por el complejo macromolecular formado alrededor de sitio de iniciación de la transcripción en el promotor del gen, más que solo por su unión a secuencias GRE o nGRE (Kino, 2013; Oakley and Cidlowski, 2013). De manera

indirecta, los GR activados pueden interactuar con otras proteínas y factores de transcripción limitando su acción, por lo que pueden transreprimir la expresión de genes que no tienen en su promotor secuencias GRE o nGRE (de Kloet, Joëls and Holsboer, 2005). Recientemente, se ha propuesto que los glucocorticoides pueden tener efectos rápidos sobre la transmisión sináptica al unirse a receptores de membrana acoplados a proteínas G, sin embargo, la identidad de tales receptores y sus mecanismos de acción están poco caracterizados y son objeto actual de investigación (Russo *et al.*, 2016).





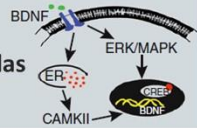
### 1.2.2. Efectos del estrés sobre la memoria

Se ha descrito que el estrés afecta de manera distinta la formación de memorias, y la plasticidad sináptica asociada, dependiendo de su intensidad (baja, moderada, alta), frecuencia (agudo/crónico), momento de inducción del estrés con relación al entrenamiento (adquisición, consolidación o recuperación), el tipo de memoria evaluado (dependiente/independiente del hipocampo) y características del individuo tales como su edad, sexo y experiencias estresantes previas (Schneiderman, Ironson and Siegel, 2005; Sandi and Pinelo-Nava, 2007; Chattarji *et al.*, 2015; McEwen, Nasca and Gray, 2016).

La **exposición intensa o repetida a eventos estresantes** (Figura 4A), al igual que la administración crónica de glucocorticoides, deteriora la formación de memorias dependientes del hipocampo (McEwen, 2007), efecto asociado con cambios morfológicos y en el metabolismo celular en neuronas hipocámpicas. En efecto, altas concentraciones de glucocorticoides producen disminución de la actividad neural, atrofia dendrítica, reducción en la densidad de espinas dendríticas, supresión de la LTP, disminución de la expresión de factores tróficos, disminución de la tasa de neurogénesis, e incremento de la apoptosis en neuronas del hipocampo (Kim and Diamond, 2002). El **estrés crónico** promueve además la retracción de la arborización dendrítica, reducción de la densidad de espinas dendríticas y supresión de la LTP en neuronas de la corteza prefrontal medial, alteraciones asociadas deterioro en la memoria de trabajo y la rigidez cognitiva (McEwen, Nasca and Gray, 2016). En contraste, el estrés crónico facilita la adquisición y consolidación de memorias relativas a eventos emocionales de naturaleza aversiva, efecto asociado a un aumento de la actividad neural, incremento en la longitud de las ramificaciones



dendríticas, mayor densidad de espinas dendríticas, mejora de la LTP y la expresión de factores tróficos en neuronas de la amígdala basolateral (McEwen *et al.*, 2015).

**A**

	Hipocampo	Amígdala	Corteza prefrontal
<b>Conducta</b> 	↓ Memoria espacial ↓ MRO	↑ Miedo adquirido ↑ Ansiedad	↓ Memoria de trabajo ↓ Extinción
<b>Redes</b> 	↓ Potenciales auditivos evocados ↓ Excitabilidad células de lugar	↑ Potenciales auditivos evocados	?
<b>Neuronas</b> 	↓ Dendritas	↑ Dendritas	↓ Dendritas
<b>Sinapsis</b> 	↓ Espinas ↓ LTP ↑ LTD	↑ Espinas ↑ LTP	↓ Espinas ↓ LTP
<b>Moléculas</b> 	↓ BDNF	↑ BDNF	?

**B**

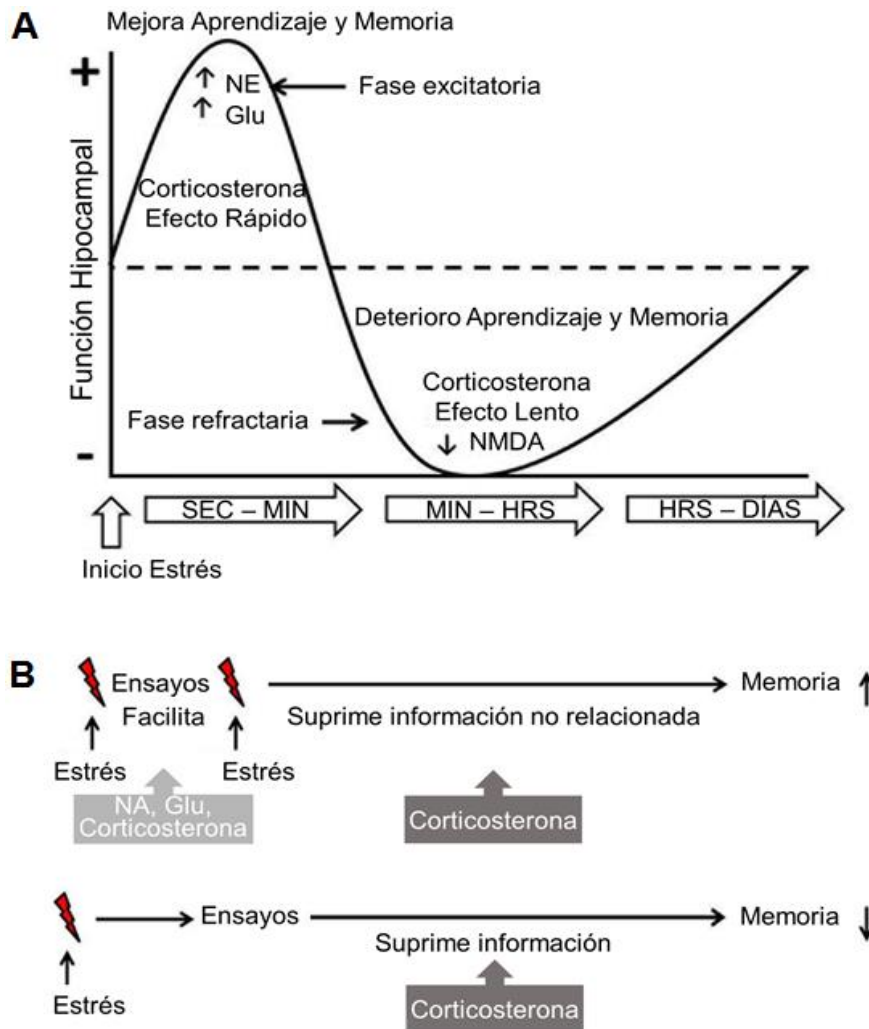
	Corto plazo (horas)	Largo plazo (días/semanas)
<b>Hipocampo</b> 	↓ Memoria espacial ↓ Espinas ↓ LTP BDNF ↔	BDNF ↔
<b>Amígdala</b> 	↑ BDNF ↑ LTP Ansiedad Dendritas Espinās ↔	↑ Ansiedad ↑ Espinas ↑ Dendritas ↑ BDNF ↑ LTP

**Figura 4. Efectos comportamentales, celulares y moleculares del estrés.** A. El estrés crónico deteriora la memoria dependiente del hipocampo, la memoria de trabajo y la flexibilidad conductual, pero facilita la formación de memorias emocionales. Estos efectos se relacionan con cambios en la actividad neural, la morfología celular, la plasticidad sináptica y la expresión génica. B. El estrés agudo afecta transitoriamente la memoria dependiente del hipocampo, alterando la morfología dendrítica y la plasticidad sináptica en esta región, mientras que sus efectos persisten en la morfología celular y la plasticidad sináptica en la amígdala. Adaptado de Chattarji *et al.* 2015.

Por su parte, el **estrés agudo** (Figura 4B) favorece la adquisición y consolidación de memorias emocionales, mientras que sus efectos en memorias dependientes del hipocampo son variados, y se relacionan con el momento de su inducción y las concentraciones de glucocorticoides alcanzadas (Sandi and Pinelo-Nava, 2007). Se ha descrito que incrementos moderados en los niveles de glucocorticoides facilitan la consolidación de la memoria espacial y la plasticidad sináptica en el hipocampo, mientras que niveles bajos o muy elevados producen el efecto contrario (Sandi, 2013). Así mismo, los efectos del estrés y los glucocorticoides cambian en función de si éste se induce durante la fase de adquisición, consolidación o recuperación de la memoria, o de su relación temporal con la inducción de plasticidad sináptica a largo plazo (Wiegert, Joëls and Krugers, 2006). En general, se ha reportado que la inducción de estrés antes de la recuperación de la memoria afecta su evocación, mientras que cuando la inducción ocurre inmediatamente antes o después del entrenamiento favorece la adquisición y consolidación de la memoria dependiente del hipocampo. Por el contrario, la inducción de estrés agudo con antelación suficiente al entrenamiento deteriora la formación de memoria a largo plazo (Figura 5).

Se ha descrito que los **efectos deletéreos del estrés agudo** (inducido por ejemplo con choques eléctricos o exposición a un predador) sobre la consolidación de la memoria espacial (evaluada en el laberinto radial o el laberinto acuático de Morris) se asocian con alteraciones en la morfología celular (reducción de espinas dendríticas), cambios en la señalización celular (reducción de la fosforilación de CAMKII y CREB) y represión de la expresión génica (reducción de la expresión de CAMKII, c-Fos, BDNF, NCAM y Arc) en el hipocampo o la corteza prefrontal (Kim *et al.*, 2001, 2005; Sandi *et al.*, 2005; Diamond *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2008; Vanelzakker *et al.*, 2011; Almaguer-Melian *et al.*, 2012; Zoladz *et al.*, 2012; Sardari, Rezayof and Khodagholi, 2015).

En este mismo sentido, en el Laboratorio de Neurofisiología Comportamental de la Universidad Nacional de Colombia se ha identificado que el estrés por restricción de movimientos antes del entrenamiento espacial en el laberinto de Barnes afecta la formación de memoria espacial a largo plazo y que este efecto se relaciona con reducción de la actividad de la quinasa ERK1/2 y la fosfatasa PP2B en el hipocampo hasta 4 horas después del entrenamiento (Ortíz-Montero, 2011).



**Figura 5. Efectos del estrés agudo sobre el aprendizaje y la memoria dependientes del hipocampo.** A. El estrés agudo promueve la excitabilidad de las neuronas del hipocampo por aumento de la liberación de norepinefrina (NE) y glutamato (Glu), y por los efectos no-genómicos de la corticosterona (mediados, al parecer, por receptores de membrana acoplados a proteínas G). Posteriormente, la actividad hipocámpica entra en una fase refractaria debida a la desensibilización de receptores de glutamato tipo NMDA y a los efectos genómicos de la corticosterona. B. El estrés agudo inducido inmediatamente antes o después del entrenamiento facilita los procesos la consolidación de la memoria; por el contrario, su inducción con anticipación al entrenamiento deteriora la memoria a largo plazo. Adaptado de Cadle and Zoladz 2015 y McEwen 2007.

### 1.2.3. Mecanismos epigenéticos asociados al estrés

Actualmente, se desconocen los mecanismos epigenéticos que subyacen a la alteración de la memoria espacial inducida por estrés agudo. Se han descrito, sin



embargo, algunos de los mecanismos que participan en la regulación de la expresión génica como consecuencia del estrés crónico y agudo, y algunos de sus efectos sobre el comportamiento.

Como se describió anteriormente, la respuesta de estrés involucra la liberación de glucocorticoides por la glándula suprarrenal. Los glucocorticoides, entonces, son ligados por receptores nucleares ubicados en el citoplasma, los cuales al activarse forman dímeros y se traslocan al núcleo celular. Los receptores así activados se unen a secuencias GRE en el DNA promoviendo la transcripción de determinados genes. Además de este **mecanismo de acción canónico**, el complejo glucocorticoide/receptor también puede interactuar con otras proteínas y complejos proteicos en el núcleo para regular el estado de acetilación, metilación o fosforilación de histonas y el estado la metilación del DNA (Ito, Barnes and Adcock, 2000; Weaver *et al.*, 2004; Gutiérrez-Mecinas *et al.*, 2011; Rei *et al.*, 2015). El complejo glucocorticoide/receptor presenta dominios de unión para proteínas con actividad **HAT**, como CBP, p300, SRC1, SRC3 y PCAF (Ogryzko *et al.*, 1996), y, además, puede inhibir de forma indirecta la acetilación de las histonas al competir con factores de transcripción como CREB, SP1, ETS, NF-AT y STATs por los sitios de interacción con el complejo co-activador CBP/p300. Asimismo, el receptor de glucocorticoides activado puede unirse a **HDACs**, como HDAC2, o a proteínas co-represoras de la actividad transcripcional, como NcoR y SMRT, que reclutan el complejo co-represor Sin3A con actividad HDAC (Sheppard *et al.*, 1998; Glass and Rosenfeld, 2000; Ito, Barnes and Adcock, 2000; Schaaf and Cidlowski, 2002; West, Griffith and Greenberg, 2002; Pelaia *et al.*, 2003).

En años recientes se han estudiado los mecanismos epigenéticos involucrados en alteraciones de la respuesta de estrés y el comportamiento (Tabla 3), identificándose un papel central de las enzimas que provocan **modificaciones postraduccionales en las histonas** y en la expresión del receptor de glucocorticoide (GR).

Uno de los primeros estudios en explorar los mecanismos epigenéticos relacionados con la respuesta de estrés comparó la reactividad del eje HPA en ratas adultas que habían recibido una crianza negligente o cuidadosa durante la etapa de lactancia (Weaver *et al.*, 2004). Los descendientes de madres negligentes presentaron una respuesta exacerbada del eje HPA, mayor despliegue de conductas defensivas y

menor expresión del **gen *Nr3c1*** (que codifica para GRs) en el hipocampo (Weaver *et al.*, 2004; Weaver, Meaney and Szyf, 2006; Weaver, 2007). Estos investigadores pudieron establecer que la reducción en la expresión de GRs ocurre como consecuencia de la **hipoacetilación de la histona H3** en la lisina 9 y de la **metilación del DNA** en el promotor del exón 1<sub>7</sub> del gen *Nr3c1* (que codifica para GR); estas modificaciones epigenéticas inducen el cierre de la cromatina e impiden la unión del factor de transcripción EGR-1. De manera interesante, en animales adultos la administración intracerebroventricular o intrahipocampal de TSA (inhibidor de las HDACs) durante siete días revirtió los cambios en la expresión génica inducida por el trato negligente de las madres en su primera semana de vida (Weaver *et al.*, 2004; Weaver, Meaney and Szyf, 2006). De manera consistente con estos resultados, la inducción de estrés prenatal afecta la reactividad del eje HPA en individuos adultos y produce incremento de la metilación del promotor 1<sub>7</sub> del gen *Nr3c1* en el hipocampo y desmetilación del DNA en el promotor del gen para CRH en la amígdala (Mueller and Bale, 2008). De manera interesante, también se identificó que, en ratas adultas de una cepa particularmente vulnerable al estrés (Fisher 344), el estrés repetitivo induce reducción de la expresión de GRs en el hipotálamo (Uchida *et al.*, 2008) que está asociada con aumento de la expresión del microRNA miR-18a, que silencia la traducción de transcritos de *Nr3c1* (Uchida *et al.*, 2008; Vreugdenhil *et al.*, 2009).

Es notable que en humanos el estrés durante la infancia tiene efectos similares. En hombres suicidas con historia de maltrato infantil se observó hipermetilación del promotor del gen *Nr3c1* en células del hipocampo (McGowan *et al.*, 2009). Esta misma modificación epigenética se encontró en leucocitos de adultos que crecieron en circunstancias adversas (Tyrka *et al.*, 2012) y en células del cordón umbilical de recién nacidos cuyas madres sufrieron depresión durante el último trimestre del embarazo (Oberlander *et al.*, 2008).

En contraste con los anteriores hallazgos, en ratones de una cepa vulnerable al estrés (Swiss Webster), el estrés repetitivo induce el aumento de la expresión y fosforilación de GRs en el hipocampo. Estos efectos se relacionaron con aumento de la expresión de **HDAC2** en neuronas de CA1 y la reducción de la expresión de BDNF, CREB, Sinapsina-II, Homer1 y las subunidades NR2A y NR2B del receptor **NMDA**, además de un deterioro en la consolidación de la memoria de reconocimiento de

objetos (Rei *et al.*, 2015). Es interesante que la región promotora del gen **Hdac2** presenta una secuencia GRE (Gräff, Rei, *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017); además, la sobreexpresión de HDAC2 induce su enriquecimiento en los promotores de BDNF, CREB, Sinapsina-II, Homer, NR2A y NR2B (entre otros), lo cual se ha asociado al deterioro de la plasticidad sináptica en el hipocampo y de la consolidación de la memoria espacial (Guan *et al.*, 2009). El estrés repetitivo induce además **otras modificaciones epigenéticas** como: cambios del estado de metilación en diferentes lisinas de la H3 de células del hipocampo (Hunter *et al.*, 2009); reducción de la acetilación de la histona H4 y de la H3 en el hipocampo (Ferland and Schrader, 2011); aumento de la acetilación de la histona H3 en la corteza medial prefrontal (Hinwood *et al.*, 2011), la amígdala (Covington *et al.*, 2012), y el hipocampo (Hollis *et al.*, 2010; Covington *et al.*, 2012). De forma llamativa, la hiperacetilación observada en el hipocampo ocurre de manera rápida pero transitoria y es seguida por hipoacetilación persistente (Hollis *et al.*, 2010; Covington *et al.*, 2012).

Por su parte, el **estrés agudo** también provoca cambios en la regulación de la expresión génica a través de mecanismos epigenéticos. En roedores, el estrés agudo inducido por restricción de movimientos produce **hipoacetilación de la histona H3**, la metilación del DNA en el promotor del gen *Bdnf* y reducción de la expresión de mRNA para los exones I, IV y VI del BDNF en el hipocampo (Fuchikami *et al.*, 2009, 2010; Ureña, 2016). Sin embargo, el estrés agudo breve ha sido asociado a modificaciones epigenéticas que favorecen la transcripción y que permiten la consolidación de la memoria del evento estresante en sí mismo. La inducción de estrés por nado forzado (15 min) induce la liberación de glutamato, la activación de receptores NMDA y la fosforilación del receptor de glucocorticoides; estos eventos promueven, cascada abajo, la fosforilación de proteínas que acetilan (P300) o fosforilan histonas (MSK1) en neuronas de la fascia dentada, lo que aumenta la expresión de factores de transcripción como c-Fos ó Egr-1 y permite, putativamente, la consolidación de la memoria del evento estresante (Bilang-Bleuel *et al.*, 2005; Chandramohan, Droste and Reul, 2007; Reul *et al.*, 2009).

**Tabla 3.** Mecanismos epigenéticos del estrés en el cerebro.

Estrés	Región	Mecanismo epigenético Efectos comportamentales asociados [Especie]	Referencias
Prenatal	Hipocampo	Metilación del DNA en el promotor 1 <sub>7</sub> del gen <i>Nr3c1</i> . y expresión reducida de GRs. Repuesta de estrés exacerbada, conductas del espectro depresivo. [Ratón]	(Mueller and Bale 2008)
	Amígdala	Reducción en la metilación del DNA en el promotor del gen <i>Crf</i> e incremento en la expresión de CRF. Hiperreactividad del eje HPA, conductas del espectro depresivo. [Ratón]	(Mueller and Bale 2008)
Postnatal	Hipocampo	Hipoacetilación de la histona H3 (K9) y metilación del DNA en el promotor del exón 1 <sub>7</sub> del gen <i>Nr3c1</i> . Respuesta exacerbada del eje HPA e incremento de conductas defensivas en la edad adulta. [Rata] Metilación del DNA en el promotor del gen <i>Nr3c1</i> en suicidas con historia maltrato infantil. [Humano]	(Weaver <i>et al.</i> , 2004; Weaver, Meaney and Szyf, 2006; Weaver, 2007; McGowan <i>et al.</i> , 2009)
Crónico	Hipocampo	Hipoacetilación de la histona H4 (K12) y reducción de la fosfoacetilación de H3 (S10K9) en fascia dentada y CA3. [Rata] Aumento de la trimetilación en lisina 4 y reducción de la trimetilación en lisina 9 de la histona H3 en fascia dentada. [Rata] Aumento de la acetilación de la histona H3, seguido por hipoacetilación persistente de la misma (hasta por 20 días). [Ratón]	(Hunter <i>et al.</i> , 2009; Ferland and Schrader, 2011; Covington <i>et al.</i> , 2012)
	Corteza infralímbica	Aumento de la acetilación de la histona H3. [Rata]	(Hinwood <i>et al.</i> , 2011)
	Amígdala	Aumento hasta por 24 horas de la acetilación de la histona H3. [Ratón]	(Covington <i>et al.</i> , 2012)
Sub-crónico	Hipocampo	Aumento de la expresión y activación de GRs asociada al incremento en la expresión de HDAC2 y la reducción de BDNF, CREB, Sinapsina-II, Homer, NR2A y NR2B. Deterioro de la consolidación de memoria de reconocimiento de objetos. [Ratón, cepa Swiss Webster] Reducción de la trimetilación en lisinas 4 y 27 y aumento de la trimetilación en lisina 9 de la histona H3 en células de la fascia dentada. [Ratón] Aumento de la acetilación de H3 hasta por 24h. [Rata]	(Hunter <i>et al.</i> , 2009; Hollis <i>et al.</i> , 2010; Rei <i>et al.</i> , 2015)
	Hipotálamo	Silenciamiento de la transcripción del gen <i>Nr3c1</i> por los microRNAs miR-18a y miR-124a. Conductas del espectro depresivo. [Ratas, cepa Fischer 344]	(Uchida <i>et al.</i> , 2008)
Agudo	Hipocampo	Hipoacetilación de histona H3 y metilación del DNA en el promotor del gen <i>Bdnf</i> . Deterioro de la memoria de miedo condicionado al contexto. [Roedores] Aumento de la trimetilación en lisina 9 y reducción de la monometilación en lisina 1 y de la trimetilación en lisina 27 de la histona H3 en células de la fascia dentada y CA1. [Roedores] Aumento de la fosfoacetilación de la histona H3 y la expresión de factores de transcripción (c-Fos y EGR-1) en neuronas de la fascia dentada. Incremento de respuesta de inmovilidad en nado forzado. [Roedores]	(Bilang-Bleuel <i>et al.</i> , 2005; Chandramohan, Droste and Reul, 2007; Fuchikami <i>et al.</i> , 2009, 2010; Hunter <i>et al.</i> , 2009; Reul <i>et al.</i> , 2009)

El hecho de que los cambios epigenéticos inducidos por el estrés sean reversibles implica que el uso de fármacos, como inhibidores de las desacetilasas de histonas, pueden ser agentes terapéuticos en el tratamiento de alteraciones del comportamiento y en enfermedades cuyo desencadenamiento o empeoramiento ocurre como consecuencia del estrés (ansiedad, depresión, enfermedades neurodegenerativas, trastornos del aparato digestivo, entre otras).

Actualmente, se desconocen los mecanismos epigenéticos asociados a los efectos deletéreos del estrés agudo sobre la consolidación de la memoria dependiente del hipocampo y el potencial de los inhibidores de las HDACs para revertir tales efectos.

### 1.3. Inhibidores de las Desacetilasas de Histonas

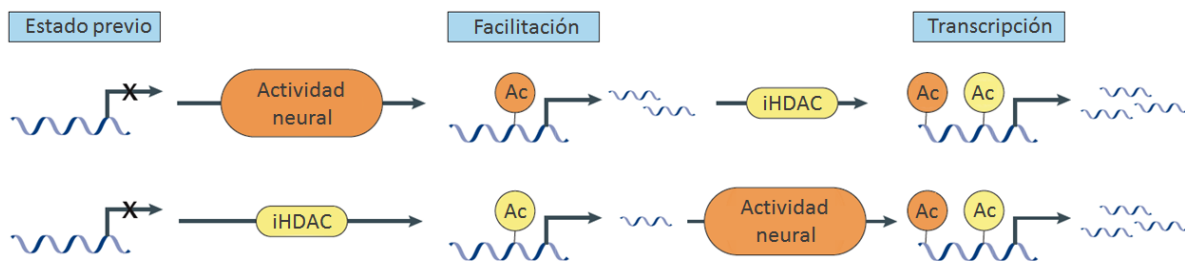
Como se describió antes, uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados es el control del estado de acetilación de las histonas por el balance de actividad de enzimas que transfieren grupos acetilo a sus colas (HATs) y enzimas que los remueven (HDACs). La actividad de las **HATs** (acetilación) favorece la apertura de la cromatina, el reclutamiento de proteínas “lectoras” (con bromodominios que reconocen los residuos de lisina acetilados) y el acceso de la maquinaria transcripcional al DNA; por el contrario, la actividad de las **HDACs** (desacetilación) revierte estos procesos (Volmar and Wahlestedt, 2015). La actividad catalítica de las HDACs puede ser inhibida por una amplia variedad de moléculas pequeñas (ácidos alifáticos, benzamidas, péptidos cíclicos e hidroxamatos); tales inhibidores tienen diferente selectividad con respecto a los distintos tipos de HDACs. Se ha propuesto que sin importar cuál es su mecanismo de acción, el efecto de los iHDAC conduce a un proceso denominado “facilitación epigenética”; es decir, que estas moléculas tienen efectos permisivos (más no inductivos) del efecto activador de la expresión génica desencadenado por eventos tales como la exposición a la novedad o el entrenamiento en tareas de aprendizaje.

#### 1.3.1. Facilitación epigenética

El concepto de facilitación epigenética surgió en el contexto de la investigación en terapéutica del cáncer, donde los **iHDAC** se utilizan para aumentar la sensibilidad de células cancerígenas frente a otros tratamientos (Park, Thomas and Munster, 2015). En estos estudios, aunque los iHDAC administrados aisladamente tienen poco o ningún efecto curativo, potencian la efectividad de otros tratamientos cuando se administran de forma simultánea. Se propuso, entonces, que los iHDAC favorecen la de expresión programas génicos inducidos por otros eventos, pero necesitan que tales programas estén activos para tener influencia sobre el fenotipo (Gräff and Tsai, 2013a).

El concepto de facilitación epigenética es aplicable a la acción de los iHDAC sobre la consolidación de la memoria (Gräff and Tsai, 2013b; Penney and Tsai, 2014). En efecto, la administración de iHDAC, en ausencia de otro tratamiento, tiene escasos efectos en la transcripción génica en regiones como el hipocampo (Lopez-Atalaya *et al.*, 2013). Sin embargo, la administración de iHDAC, en estrecha relación temporal

con el entrenamiento en distintas tareas de aprendizaje, favorece la expresión génica y la consolidación de la memoria (Levenson *et al.*, 2004; Vecsey *et al.*, 2007; Miller, Campbell and Sweatt, 2008; Dagnas *et al.*, 2015; Villain, Florian and Rouillet, 2016; Zhu *et al.*, 2016). La inhibición de las HDACs acentúa los incrementos en la acetilación de histonas inducidos por el entrenamiento prevenir la desacetilación de las mismas; esto explica también el hecho de que el efecto facilitador de estos fármacos ocurre tanto si son administrados antes como después del entrenamiento (Gräff and Tsai, 2013a) (Figura 6).



**Figura 5. Modelo teórico de facilitación epigenética por iHDAC.** La inhibición de las desacetilasas de histonas tiene efectos mínimos en regiones donde la cromatina está cerrada y no se ha reclutado la maquinaria transcripcional. La actividad neural activa vías de señalización y promueve la acetilación de histonas (y otras modificaciones epigenéticas) en regiones discretas del DNA donde se recluta la maquinaria transcripcional. Los inhibidores de las HDAC impiden la desacetilación de las histonas, favoreciendo por tanto la hiperacetilación de las mismas y por tanto la expresión de génica. iHDAC: inhibidores de las HDACs; Ac: Acetilación. Adaptado de (Gräff and Tsai, 2013a).

### 1.3.2. Tipos de inhibidores de las HDACs y usos terapéuticos

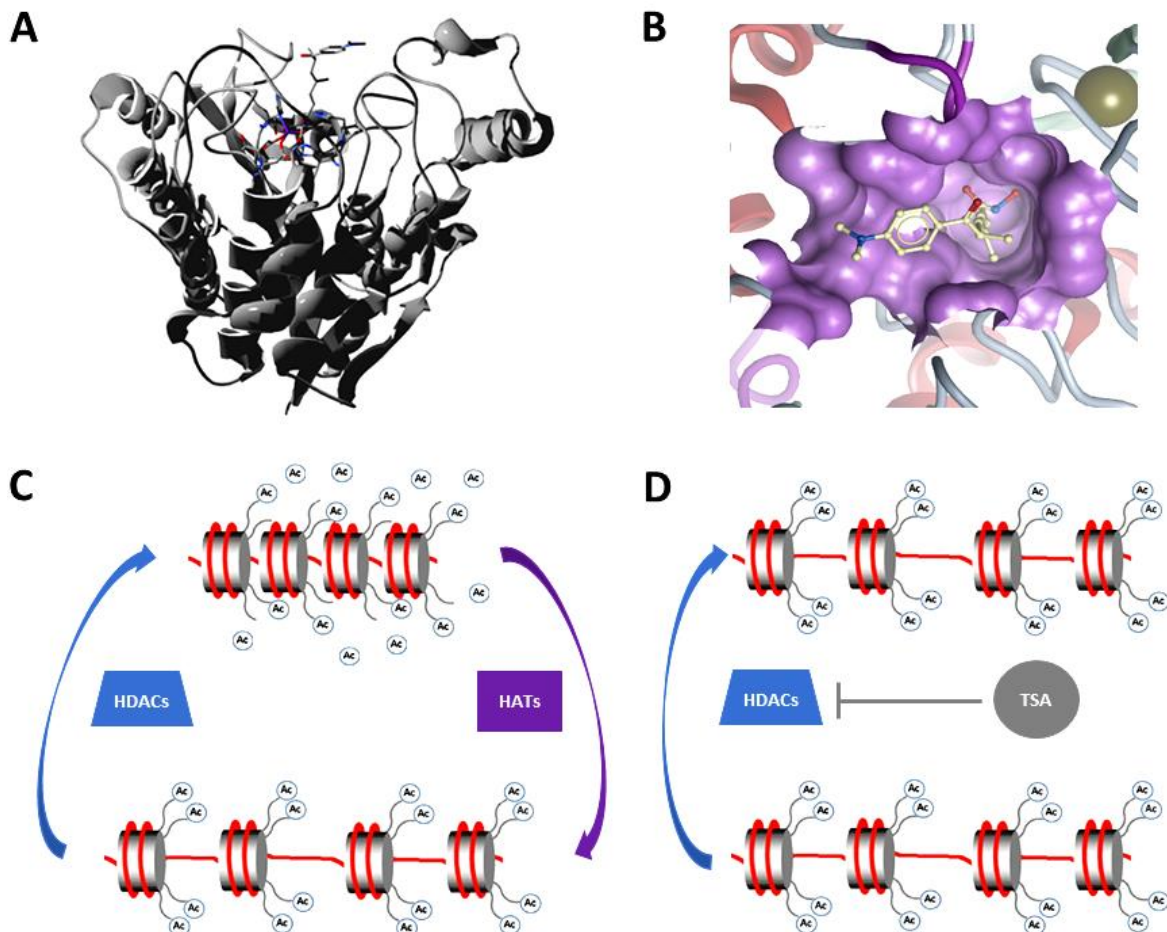
Como se mencionó antes, las moléculas pequeñas que inhiben la actividad de las HDACs se agrupan según su estructura molecular (tabla 4) en cuatro clases: ácidos hidroxámicos, ácidos alifáticos, benzamidas, y péptidos cíclicos (Dokmanovic, Clarke and Marks, 2007; Ververis and Karagiannis, 2012; Gräff and Tsai, 2013b). Estos compuestos varían en su mecanismo de acción, selectividad por diferentes tipos de desacetilasas de histonas y concentraciones a las que son efectivas.

Los **ácidos hidroxámicos** son compuestos que tienen un grupo hidroxilamino insertado en un ácido carboxílico. Son miembros de este grupo: Tricostatina A (TSA), ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA, Vorinostat o Zolinza), piroxamida, escriptaida, oxamflatina, NVP-LAQ824 y NVP-LBH589, los dos últimos hacen parte de las psammaplina, derivados del ácido hidroxámico 4-aminometilcinnámico que son sintetizados por la esponja marina *Psammaplysilla purpurea* (Gräff and Tsai, 2013b). Los fármacos de este grupo inhiben la actividad catalítica de las HDACs dependientes de zinc (tipo I, II o IV) y sus concentraciones efectivas están en el rango nanomolar (Ververis and Karagiannis, 2012). Los hidroxamatos han sido ampliamente evaluados para el tratamiento de diversos tipos de cáncer y en modelos animales de neurodegeneración (Kouraklis and Theocharis, 2006; Benedetti, Conte and Altucci, 2015; Ganai, Ramadoss and Mahadevan, 2016). TSA y SAHA han sido evaluados en modelos animales de amnesia, trastornos de ansiedad (Miyagawa, Tsuji and Takeda, 2012; Tran *et al.*, 2014), depresión (Weaver *et al.*, 2004) y trastornos gastrointestinales inducidos por estrés (Tran *et al.*, 2013, 2014). Dentro de los hidroxamatos, la TSA es el iHDAC más potente, su efectividad es entre 3 a 30 veces superior a la de otros inhibidores de la misma familia o inhibidores que ejercen su efecto por un mecanismo distinto (Codd *et al.*, 2009) y por ello, como se ve en la tabla 4, ha sido usado con frecuencia en investigación básica con modelos animales en distintos tipos de patologías y alteraciones del comportamiento. En la Figura 7 se representa el mecanismo de acción de la TSA.

Los **ácidos alifáticos o carboxílicos** son los iHDAC menos potentes y sus concentraciones efectivas están en el rango milimolar. En este grupo están el fenilbutirato (FB), el butirato de sodio (NaB) y el ácido valproico (VPA). Estas sustancias se prueban actualmente en ensayos clínicos como potenciales agentes terapéuticos para enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson y Huntington), isquemia cerebral y atrofia muscular (Ganai, Ramadoss and Mahadevan, 2016). La molécula más estudiada dentro de esta clase es el NaB. En modelos animales el NaB mejora la plasticidad sináptica a largo plazo (Pandey, Sharma and Sharma, 2015) y la consolidación de memorias, sin importar si son dependientes o no del hipocampo (Levenson *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2007; Lattal, Barrett and Wood, 2007; Itzhak, Liddie and Anderson, 2013; Castino, Cornish and Clemens, 2015;



Pandey, Sharma and Sharma, 2015; Zhu *et al.*, 2016). Recientemente, se demostró, además, su efectividad para revertir el deterioro de la consolidación de la memoria provocado por envejecimiento (Peleg *et al.*, 2010; Reolon *et al.*, 2011) u otras intervenciones (infección, anestesia, dieta alta en grasas) (Zhong *et al.*, 2014; Barichello *et al.*, 2015; Sharma, Taliyan and Ramagiri, 2015; Steckert *et al.*, 2015; Yoo *et al.*, 2015).



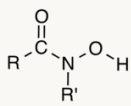
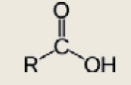
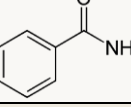
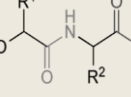
**Figura 7. TSA y acetilación de histonas.** A) Representación de la TSA inhibiendo HDAC2. La TSA se une al átomo de zinc que se encuentra próximo al sitio catalítico de las HDAC2 y desplaza una molécula de agua que es necesaria para la reacción catalítica. B) Ampliación de la molécula de TSA en el dominio catalítico de HDAC2; se aprecia el grupo aromático de la molécula bloqueando el bolsillo donde se encuentra el dominio catalítico de HDAC2. C) La cromatina se encuentra condensada cuando las HDACs remueven los grupos acetilo puestos por las HATs en las colas de las histonas. D) La TSA inhibe las HDACs previniendo que retiren los grupos acetilo de las colas de las histonas. Adaptado de Codd *et al.* 2009.

Dentro de las **benzamidas** están fármacos como MS-275, SNDX-275, RGFP136, MGCD0103, Crebinostat y Tubastatin. Estos compuestos tienen concentraciones efectivas en el rango micromolar y tienen cierta selectividad hacia las HDACs de clase I (HDAC1, 2, 3, o 6). MS-275 y RGFP136 son efectivos para reducir la neuroinflamación y mejorar la memoria de reconocimiento de ubicación de objetos en animales (Hawk, Florian and Abel, 2011; McQuown *et al.*, 2011; Zhang and Schluesener, 2013). Crebinostat mejora la memoria de miedo condicionado al contexto e incrementan la expresión de Sinapsina-I y BDNF en neuronas de cultivos primarios de hipocampo (Fass *et al.*, 2013). En ratones transgénicos con taupatía (transgénicos rTg4510), Tubastatin revierte los déficits de memoria (miedo condicionado al contexto y espacial), la hiperactividad y la expresión de la proteína Tau hiperfosforilada en hipocampo y neocorteza (Selenica *et al.*, 2014).

Finalmente, Los **péptidos cíclicos o tetrapéptidos** son el grupo estructuralmente más complejo de los iHDAC. Trapoxina, Clamidocina, toxina HC y Depsipéptido son miembros de este grupo. Estos fármacos son relativamente selectivos para las HDACs de tipo I o IIa y sus concentraciones efectivas se encuentran en el rango de nanomolar. Dado que muchas formas de cáncer se asocian con hipoacetilación de histonas y regulación a la baja de la expresión génica (Peixoto and Lansiaux, 2006), se ha probado con éxito el Depsipéptido (Romidepsin, Istodax, FK228) como agente anticancerígeno en diversas neoplasias: linfomas de células T (Iyer and Foss, 2015), carcinoma pulmonar no-microcítico (Gerber *et al.*, 2015) y neuroblastoma (Panicker *et al.*, 2010). Recientemente se ha probado el Depsipéptido como agente terapéutico en un modelo de enfermedad de Alzheimer (EA) (Pagar, Sardar and Vavia, 2014).

Actualmente se encuentran en pruebas preclínicas múltiples compuestos que inhiben de manera selectiva desacetilasas de histonas como las HDAC1, 2, 3, 6, 8 (Falkenberg and Johnstone, 2014). Su efectividad para mejorar la memoria o prevenir los efectos del estrés sobre el comportamiento aún no se ha determinado. En la tabla 4 se presentan los distintos tipos de iHDAC que han mostrado efectividad para mejorar la memoria o alteraciones en el comportamiento.

**Tabla 4.** Efectos de los inhibidores de las HDACs sobre el comportamiento.

Clase	Tipo	Efectos	Referencias
<p>Ácidos hidroxámicos</p> 	TSA	<p>Mejoría de memoria espacial, de reconocimiento / ubicación de objetos, miedo condicionado a estímulos o al contexto en roedores.</p> <p>Rescate del fenotipo depresivo/ansioso de ratas adultas descendientes de madres negligentes.</p> <p>Prevención de la ansiedad inducida por estrés.</p> <p>Prevención de ansiedad, dolor visceral e hipersensibilidad somática inducidas por administración crónica de glucocorticoides.</p> <p>Rescate de memoria de reconocimiento de objetos en ratones transgénicos que expresan la histona acetil-transferasa CBP sin actividad catalítica.</p> <p>Rescate de memoria de reconocimiento de objetos en modelos de neurodegeneración (inducida por kainato) y envejecimiento (ratones SAMP-8).</p> <p>Rescate de memoria de miedo condicionado en modelo de EA (ratones APP/PS1).</p>	<p>(Weaver <i>et al.</i>, 2004; Korzus, Rosenfeld and Mayford, 2004; Vecsey <i>et al.</i>, 2007; Fontán-Lozano <i>et al.</i>, 2008; Federman, Fustiñana and Romano, 2009; Francis <i>et al.</i>, 2009; Hawk, Florian and Abel, 2011; Maddox and Schafe, 2011; Monsey <i>et al.</i>, 2011; Miyagawa, Tsuji and Takeda, 2012; Tran <i>et al.</i>, 2013, 2014; Dagnas <i>et al.</i>, 2015; Sharma, Taliyan and Ramagiri, 2015)</p>
	SAHA	<p>Prevención de ansiedad, dolor visceral e hipersensibilidad somática inducidas por administración crónica de glucocorticoides.</p> <p>Rescate de memoria de miedo condicionado al contexto en ratones deficientes de CBP</p> <p>Rescate de memoria de miedo condicionado en roedores envejecidos.</p>	<p>(Alarcón <i>et al.</i>, 2004; Peleg <i>et al.</i>, 2010; Miyagawa, Tsuji and Takeda, 2012; Tran <i>et al.</i>, 2014)</p>
<p>Ácidos alifáticos</p> 	NaB	<p>Mejoría de memoria espacial, memoria de reconocimiento de objetos y miedo condicionado al contexto en roedores.</p> <p>Rescate de memoria de miedo condicionado en roedores envejecidos.</p> <p>Rescate de memoria espacial y miedo condicionado al contexto en ratones con sobreproducción de p25 (CK-p25).</p> <p>Rescate de memoria de miedo condicionado en modelo de EA (APP/PS1).</p> <p>Rescate de memoria de reconocimiento objetos en ratones transgénicos con el dominio catalítico mutado de CBP (CBP<sup>K1X/K1X</sup>).</p>	<p>(Levenson <i>et al.</i>, 2004; Fischer <i>et al.</i>, 2007; Lattal, Barrett and Wood, 2007; Federman, Fustiñana and Romano, 2009; Peleg <i>et al.</i>, 2010; Kilgore <i>et al.</i>, 2010; Reolon <i>et al.</i>, 2011; Govindarajan <i>et al.</i>, 2011; Haettig <i>et al.</i>, 2011; Itzhak, Liddle and Anderson, 2013; Castino, Cornish and Clemens, 2015; Pandey, Sharma and Sharma, 2015; Zhu <i>et al.</i>, 2016)</p>
	VPA	<p>Mejoría de memoria espacial en ratas.</p> <p>Rescate de memoria de miedo condicionado en modelo de EA (APP/PS1).</p>	<p>(Murphy <i>et al.</i>, 2001; O'Loinsigh <i>et al.</i>, 2004; Kilgore <i>et al.</i>, 2010)</p>
	FB	<p>Rescate de memoria espacial y miedo condicionado en modelos de EA (APP/PS1, Tg2576).</p>	<p>(Kilgore <i>et al.</i>, 2010; Penney and Tsai, 2014)</p>
<p>Benzamidas</p> 	MS-275	<p>Mejoría de memoria de ubicación de objetos y miedo condicionado al contexto.</p>	<p>(Hawk, Florian and Abel, 2011; Zhang and Schluesener, 2013)</p>
	RGFP-136	<p>Mejoría de memoria de ubicación de objetos</p>	<p>(McQuown <i>et al.</i>, 2011)</p>
<p>Tetrapéptidos</p> 	Depsi-péptido	<p>En pruebas como agente terapéutico en un modelo de enfermedad de Alzheimer (EA)</p>	<p>(Pagar, Sardar and Vavia, 2014)</p>

#### 1.4. Pregunta de Investigación e Hipótesis

Como hemos visto, la regulación de la expresión génica por la acetilación de las histonas es un mecanismo epigenético central tanto al proceso de consolidación de la memoria de largo plazo como a la respuesta del organismo a eventos estresantes. Dado que el balance de los niveles de acetilación de histonas puede ser manipulado farmacológicamente, en la última década se ha probado la efectividad de los inhibidores de las HDACs para mejorar la memoria, y más recientemente, para prevenir algunos de los efectos nocivos del estrés. Sin embargo, poco se conoce acerca de los mecanismos epigenéticos que median los efectos nocivos del estrés agudo sobre la consolidación de la memoria, y se desconoce si la inhibición farmacológica de las HDACs prevendría tal efecto. Dado que la evidencia indica que el entrenamiento en tareas dependientes del hipocampo y el estrés intenso afectan de manera opuesta el balance de acetilación de las histonas, nos preguntamos si ¿Los efectos deletéreos del estrés agudo sobre la memoria espacial están mediados por alteraciones en el balance de la acetilación de histonas? De ser el caso, la administración de un inhibidor de HDACs impediría los efectos deletéreos del estrés sobre la memoria espacial.

A fin de poner a prueba nuestra hipótesis y obtener información relacionada sobre cambios tardíos en los niveles de corticosterona, la acetilación de histonas y la expresión génica, realizamos una serie de experimentos en los cuales se analizaron los efectos del estrés agudo por restricción de movimientos y la inhibición de las HDACs con el fármaco TSA sobre: a) la memoria espacial a largo plazo en el laberinto de Barnes, b) los niveles de corticosterona en plasma, c) los niveles de acetilación de la histona H3 en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala, d) la expresión y co-localización de GR y HDAC2 en estas mismas regiones cerebrales y, e) la transcripción de mRNA codificante para el receptor de GR (*Nr3c1*), la HDAC2 (*Hdac2*), y subunidades del receptor NMDA (*Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b*) como marcadores de plasticidad sináptica en estas regiones del cerebro.

Los efectos del estrés, la TSA, y su interacción se determinaron en animales entrenados (Sección 4.2) y no entrenados en la tarea espacial (Sección 4.1). Los efectos dependientes de la presencia/ausencia de entrenamiento espacial se analizaron de manera separada, y se presentan en el ANEXO E.

## 1.5. Justificación

La exposición a eventos estresantes, de forma intensa o repetida, se asocia al desarrollo de una amplia variedad de problemas de comportamiento que incluyen problemas de memoria, ansiedad y depresión, además de inducir o empeorar otros problemas de salud que incluyen, enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes, del aparato digestivo o cardiovasculares. Conocer en detalle los mecanismos mediante los cuales el estrés altera la neurobiología de tales procesos permitirá señalar posibles dianas terapéuticas e intervenciones para prevenir o revertir los efectos nocivos del estrés.

En la última década, se ha descrito que el estrés intenso o crónico induce cambios epigenéticos a largo plazo, incluyendo alteraciones en el balance de acetilación de las histonas en la corteza prefrontal, el hipocampo o la amígdala, los cuales se asocian al deterioro de la memoria; sin embargo, se desconoce si el estrés agudo genera cambios epigenéticos comparables a los del estrés intenso o crónico, o si el restablecimiento del balance en los niveles de acetilación de histonas podría prevenir los efectos deletéreos del estrés sobre la memoria.

En el presente estudio se evaluó la efectividad de la inhibición sistémica de las desacetilasas de tipo I y II para prevenir el deterioro en la consolidación de la memoria espacial causado por el estrés agudo, así como su capacidad para evitar los cambios inducidos por el estrés en los niveles de corticosterona en plasma, la acetilación de histonas, y la expresión del receptor de glucocorticoides, la histona desacetilasa 2 y subunidades del receptor NMDA en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala de ratas Wistar macho adultas.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1. Objetivo General

Evaluar la efectividad de la inhibición de las desacetilasas de histonas de tipo I y II para impedir los efectos deletéreos del estrés agudo sobre la consolidación de la memoria espacial, y los cambios en la concentración de corticosterona en plasma, la acetilación de la histona H3, la expresión y co-localización del receptor GR y la HDAC2, y la síntesis de mRNA para los genes *Nr3c1* y *Hdac2* y subunidades de los receptores NMDA (*Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b*) en estructuras selectas del cerebro de ratas Wistar macho adultas.

## 2.2. Objetivos Específicos

1. Determinar los efectos a largo plazo del estrés agudo por restricción de movimientos sobre los niveles de plasmáticos de corticosterona, la acetilación de la histona H3, la expresión y co-localización de GR y HDAC2, y la transcripción de los genes *Nr3c1*, *Hdac2*, *Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b* en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala de ratas Wistar macho adultas.
2. Determinar los efectos a largo plazo del estrés agudo en animales entrenados en el laberinto de Barnes sobre la consolidación de la memoria espacial, los niveles de corticosterona, la acetilación de la histona H3, la expresión y co-localización de GR y HDAC2, y la transcripción de los genes *Nr3c1*, *Hdac2*, *Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b* en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala de ratas Wistar macho adultas.
3. Evaluar la efectividad de la inhibición sistémica de las desacetilasas de histonas de tipo I y II con TSA para prevenir los efectos del estrés agudo en animales entrenados y no entrenados en la tarea espacial.

### **3. METODOLOGÍA**



### 3.1. Sujetos Experimentales

En los experimentos se emplearon 134 machos adultos de *Rattus norvegicus*, de la cepa Wistar, con un peso de  $300 \pm 20$  g, suministrados por el bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS) de Colombia. Los animales se alojaron en grupos de cuatro, en cajas de policarbonato (caja hogar), con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (luces encendidas entre las 07:00 - 19:00 horas), temperatura entre 19 y 21 °C, con acceso libre a agua y comida. Antes de cualquier procedimiento experimental, los animales se aclimataron durante siete días a las condiciones ambientales de la cabina de alojamiento; a partir del tercer día la experimentadora los manipuló durante cinco minutos cada día. El alojamiento de los animales y los experimentos comportamentales se realizaron en las instalaciones del Laboratorio Neurociencias del Departamento de Psicología de la Universidad Nacional de Colombia.

El número de sujetos a emplear en los experimentos se calculó con base en la fórmula que recomienda la guía para el cuidado y uso de mamíferos en neurociencia e investigación comportamental (Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research - National Research Council -US-). La fórmula utilizada para el cálculo del  $n$  fue:

$$n = 1 + 2C\left(\frac{s}{d}\right)^2$$

#### Fórmula 1.

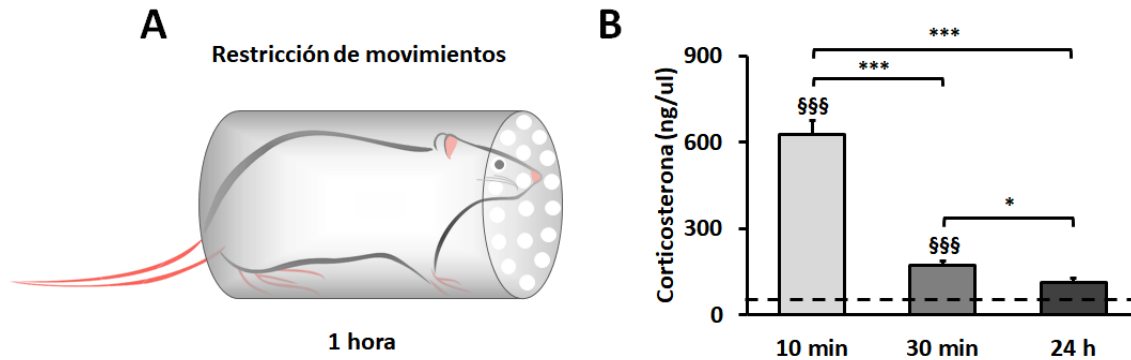
Donde,  $n$ = número de sujetos.  $C$ = constante para los valores escogidos para error tipo I ( $\alpha$ : 0.05) y tipo II ( $1-\beta$ : 0.08) correspondiente a 7.85.  $s$ : desviación estándar de la latencia de llegada al agujero meta observada en un grupo de animales entrenados en la tarea espacial (22 s).  $d$ : valor de la diferencia mínima que se espera encontrar entre grupos (30 s). Con estos parámetros, el valor obtenido para  $n$  fue de 8.981. En consecuencia, a cada grupo experimental se asignaron entre 9 animales. Este número de sujetos para cada grupo es consistente con otros experimentos realizados por el Grupo de Neurofisiología Comportamental.

### 3.2. Inducción de Estrés Agudo por Restricción Motora

Para provocar estrés agudo, en los sujetos asignados a dicha condición, se usó el modelo de restricción de movimientos. Este procedimiento induce una elevación significativa de las concentraciones plasmáticas de corticosterona y ACTH (García *et al.*, 2000), además de otros efectos sobre la fisiología de múltiples sistemas, así como sobre el comportamiento (para revisión ver Buynitsky and Mostofsky 2009). Un protocolo basado en este modelo ha sido utilizado en trabajos previos del Grupo de Neurofisiología Comportamental y se ha encontrado que provoca una rápida elevación de los niveles plasmáticos de corticosterona (Acosta, 2007), incremento en la fosforilación de ERK-1/2 (1 hora) y reducción de la expresión de PP2B (4 horas), además de una rápida hipoacetilación de la histona H3 en el hipocampo (1 hora) después de su inducción (Ureña, 2016). La inducción de estrés agudo con este modelo altera de manera diferencial distintas fases de la memoria espacial (Troncoso *et al.*, 2010; Ortiz-Montero, 2011; Ortega *et al.*, 2013; Ureña, 2016). Además, 24 horas después de la restricción de movimientos se han observado incrementos en respuestas defensivas en el laberinto en cruz elevado (LCE) y aumento de la liberación de corticosterona ante la exposición al LCE (ANEXO A; resultados derivados de mi primera estancia de investigación la División de Neurociencias de la Universidad Pablo de Olvide).

El protocolo de estrés usado en la presente investigación se describe a continuación. Los animales se introdujeron con suavidad en el interior del restrictor, conformado por un cilindro de Plexiglás (18 cm de longitud x 6 cm de diámetro). En el extremo rostral, el cilindro tiene una tapa fija con agujeros que permite la respiración de los animales; el extremo caudal se sella con una tapa deslizante luego de que el sujeto se encuentra completamente introducido en el restrictor. Los animales permanecieron durante 1 hora en estas condiciones de movilidad restringida en el sentido rostro-caudal y dorso-ventral (Figura 8A). Dado que el efecto deletéreo del estrés sobre la memoria ocurre cuando se permite un intervalo temporal entre su inducción y el entrenamiento (Cadle and Zoladz, 2015), los animales se devolvieron a su caja hogar al finalizar la hora de restricción de movimientos, donde permanecieron durante 30 min antes de iniciar el entrenamiento espacial. Este período permitió, además, evitar efectos motores inespecíficos de la restricción de movimientos sobre el desempeño de los animales en los ensayos de entrenamiento. Para comprobar la

eficacia de este procedimiento de inducción de estrés, se midió la concentración plasmática de corticosterona en un grupo de animales sin tratamiento (basal,  $n = 4$ ) y tres grupos de animales con estrés ( $n = 4$  cada uno) a los cuales se les tomó la muestra de sangre a los 10 min, 30 min, o 24 h después de terminada la restricción de movimientos (Figura 8B).



**Figura 8. Estrés agudo por restricción de movimientos.** A. Representación del animal insertado en el tubo restrictor de movimientos (1-h). B. Niveles de corticosterona observados a distintos intervalos temporales después de retirado el animal del dispositivo. Abreviaturas: \*, diferencias significativas entre grupos; §, diferencias significativas con respecto al grupo basal (---).

### 3.3. Entrenamiento en el Laberinto Espacial de Barnes

Los sujetos se entrenaron en un laberinto circular elevado descrito originalmente por Carol Barnes (1979), y se siguió el protocolo descrito por Vargas-López et al. 2011.

#### 3.3.1. Laberinto

El laberinto es una plataforma circular de acrílico negro de 122 cm de diámetro que se eleva 90 cm sobre el piso. Centrados a 10 cm de su perímetro hay 18 agujeros de 9.5 cm de diámetro distribuidos de manera regular (un agujero dista del siguiente 20° de arco). Debajo de uno de los agujeros, escogido al azar para cada sujeto (agujero meta), se emplaza una caja (caja de escape) a la cual se puede acceder con facilidad a través del agujero meta. A la zona comprendida por el agujero meta y los dos agujeros adyacentes a él se le designa zona meta (Figura 9A). El laberinto está en el centro de una habitación rectangular (2.5 m x 1.9 m), con las paredes pintadas de blanco; en el centro de cada una de las paredes, 15 cm por encima del nivel del laberinto, se encuentra fija una figura geométrica diferente en color negro, tales figuras sirven como claves espaciales extra-laberínticas (Figura 9 B, C y D).

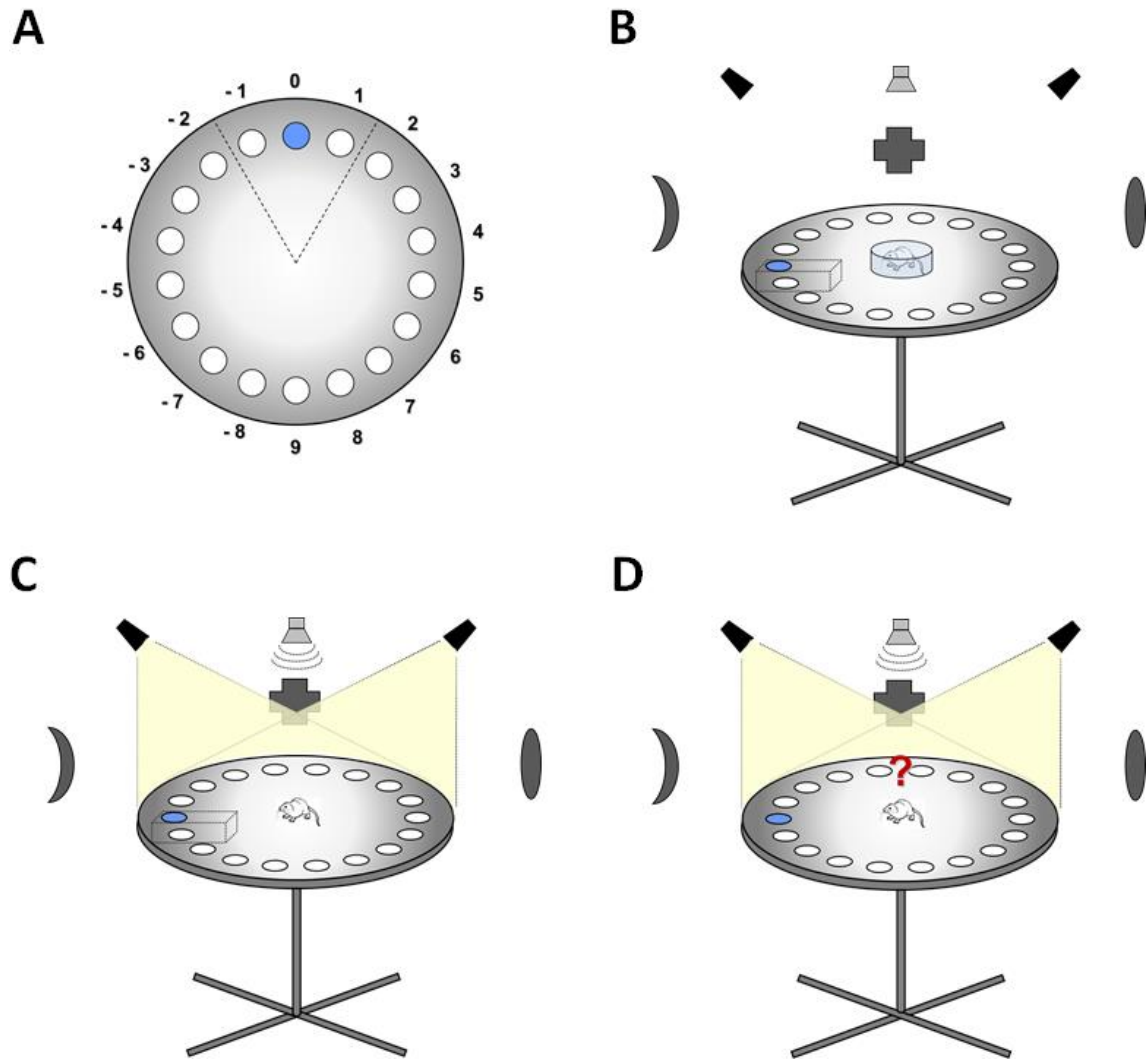
### **3.3.2. Habitación**

Un día antes de iniciar el entrenamiento los animales se habituaron a los elementos a los que luego estuvieron expuestos durante el entrenamiento. Para ello, se trasladó cada rata en una caja de poliestireno desde el bioterio hacia la habitación experimental; una vez allí, los animales se dejaron por dos minutos en una caja plástica opaca (largo: 45 cm, ancho: 25 cm, alto: 40 cm), con viruta, y ubicada en el suelo de la habitación, junto a la puerta. Pasado este tiempo, se introdujo el animal en la caja de salida (25 x cm de diámetro y 15 cm de altura), ubicada en el centro del laberinto, por dos minutos (se sostuvo la caja para prevenir que el animal escapara) y luego el animal fue devuelto a la caja opaca, donde permaneció por un minuto. El animal fue luego puesto por dos minutos en el interior de la caja de escape (largo: 24 cm, ancho: 8,5 cm, alto: 10 cm, ubicada sobre el laberinto), y ésta se cubrió con una tapa acrílica; pasado este intervalo el animal fue devuelto a la caja opaca por un minuto. Finalmente, al animal se le permitió introducirse en la caja de escape emplazada debajo de uno de los agujeros del laberinto, donde permaneció por dos minutos; el agujero se cubrió con una tapa acrílica para prevenir que el animal escapara. Al pasar este intervalo, se retiró la caja del laberinto, se tomó el animal, y éste fue transportado en la caja de poliestireno de vuelta al bioterio.

### **3.3.3. Entrenamiento**

El entrenamiento se hizo en una sesión de ocho ensayos (ensayos de adquisición), separados entre ellos por un intervalo de 240 s. Al inicio de cada ensayo (Figura 9B), se puso el animal en el centro del laberinto cubierto por la caja de salida. Tras 30 s, la caja de salida se levantó mediante un sistema de poleas, dejando al animal en libertad para explorar el laberinto. Al mismo tiempo, se encendió una lámpara de luz blanca y se activó una fuente de sonido (ruido blanco, con una intensidad de 60 dB) (Figura 9C). Cada ensayo tuvo una duración máxima de 240 s, durante los cuales el sujeto pudo explorar el laberinto libremente. El ensayo finalizó, bien cuando el sujeto entraba en la caja de escape, o bien cuando terminaba el período de 240 s; en este segundo caso, el experimentador introdujo suavemente al animal en la caja de escape. Al terminar cada ensayo, se apagaron las luces y el ruido blanco, y se le permitió al animal permanecer en la caja de escape durante 60 s. Pasado este tiempo, el animal se retornó a la caja opaca durante 240 s (intervalo entre ensayos). Al finalizar el último ensayo de entrenamiento se devolvió al animal a su caja hogar en el bioterio. El

comienzo de la sesión de entrenamiento para cada sujeto se fijó siempre en el período comprendido entre las 07:00 y las 12:00, con el propósito de que la concentración de corticosterona basal se encontrara en el nadir de su ciclo circadiano.



**Figura 9. Protocolo de entrenamiento espacial en el laberinto circular de Barnes.**

A. Vista superior del laberinto en la que se representa la ubicación y numeración de los dieciocho agujeros; el agujero meta se destaca en azul; las líneas punteadas delimitan los agujeros que se incluyen en la zona meta. B. Antes del inicio de los ensayos de adquisición el animal se ubica en el centro del laberinto dentro de la caja de salida. C. En los ensayos de adquisición se libera al animal retirando la caja de salida, al mismo tiempo que se encienden las luces y la fuente de ruido blanco hasta que el animal entra en la caja emplazada bajo el agujero meta (caja de escape) o transcurren 240 s. D. En la prueba de memoria, realizada 24 horas después del entrenamiento, el procedimiento del ensayo es semejante a los ensayos de adquisición, con la salvedad de que no hay caja de escape. En, B, C y D se ilustran las claves extra-laberínticas presentes en los muros de la sala experimental. Adaptado de Troncoso et al. 2010.

### **3.3.4. Prueba de memoria espacial a largo plazo**

A las 24 h del final del entrenamiento se realizó un ensayo de evaluación de la memoria espacial. Este ensayo se desarrolló de la misma forma que los ensayos de adquisición, con la salvedad de que no se colocó la caja de escape debajo del agujero meta. Durante la prueba de memoria, se permitió a los animales explorar libremente el laberinto durante 240 s (Figura 9D). Inmediatamente después de finalizada la prueba, los animales se llevaron a una habitación especialmente destinada para su sacrificio, donde se recolectaron muestras de plasma y tejido cerebral.

### **3.3.5. Registro y análisis del comportamiento**

Los ensayos de comportamiento se grabaron y su análisis se realizó off-line mediante el uso del software X-Plor-Rat 2005 desarrollado por Khallil Taverna Chaim y Silvio Morato en el Laboratorio de Conducta Exploratoria en la Universidad de San Pablo - Brasil.

Los siguientes indicadores se cuantificaron tanto en los ensayos de adquisición como en los de evaluación de la memoria:

Latencia de inicio (s): Tiempo transcurrido desde el inicio del ensayo hasta que el animal exploró por primera vez cualquier agujero del laberinto. Para determinar que el sujeto exploró un agujero determinado se tomó como criterio la inflexión de la cabeza del animal hacia el interior de dicho agujero.

Latencia a meta (s): Tiempo transcurrido desde el inicio del ensayo hasta que el animal exploró por primera vez el agujero meta. En el caso de que el animal no hubiera explorado el agujero meta durante el ensayo, se asignó el valor de 240 s a este indicador.

Errores de exploración (#): Conteo total de las veces que el animal exploró agujeros distintos al meta antes de explorar el agujero meta por primera vez.

Errores ponderados (cm): Sumatoria de la multiplicación del número de veces que el animal exploró cada agujero distinto del meta por la distancia desde dicho agujero hasta el agujero meta.

Distancia recorrida (cm): Sumatoria de la distancia entre el centro del laberinto y el primer agujero explorado, más las distancias entre los agujeros visitados sucesivamente por el animal hasta el final del ensayo.

Velocidad media (cm/s): Distancia recorrida dividida por la latencia a meta.

Los siguientes indicadores se cuantificaron específicamente durante el ensayo de evaluación para identificar los patrones de exploración de todos los agujeros del laberinto durante los cuatro minutos de la prueba:

Tiempo de exploración por agujero (s): Sumatoria del tiempo dedicado por el sujeto durante cada exploración de un agujero determinado a lo largo del ensayo. Este indicador se cuantificó para cada uno de los agujeros del laberinto.

Tiempo total de exploración (s): Sumatoria del tiempo de exploración por agujero de todos los agujeros del laberinto durante el ensayo.

Tiempo de exploración del agujero meta (s): Sumatoria del tiempo de cada una de las exploraciones del agujero meta.

Tiempo de exploración en la zona meta (s): Sumatoria del tiempo de cada una de las exploraciones del agujero meta y de los agujeros adyacentes a este.

Porcentaje de tiempo de exploración del agujero meta (%): Cien multiplicado por la relación entre el tiempo de exploración del agujero meta y el tiempo total de exploración.

Porcentaje de tiempo de exploración de la zona meta (%): Cien multiplicado por la relación entre la suma del tiempo de exploración de los agujeros de la zona meta (-1, 0 y 1; Figura 9A) y el tiempo total de exploración.

### **3.4. Inhibición Sistémica de las Desacetilasas de Histonas**

Para inhibir las desacetilasas de histonas se utilizó TSA, un fármaco que se puede administrar efectivamente de forma sistémica en tanto atraviesa la barrera hematoencefálica y sus concentraciones óptimas están en el rango nanomolar. La TSA administrada por vía intraperitoneal en dosis de 0,5 mg/kg a ratas de 100 a 200 g de peso es detectable en el plasma a los 2 min y llega a una concentración máxima de 3,5 ng/ml; a los 5 minutos; esta concentración es siete veces superior a la necesaria para inhibir las HDACs (0,5 ng/ml). La vida media de la TSA es de aproximadamente 10 min, pero su concentración plasmática tras la dosis intraperitoneal antes mencionada es superior a 0,5 ng/ml durante 60 min; además, algunos de sus metabolitos activos (desmetil-tricostatina A, tricostatina A amida, ácido tricostático *N*-desmetil, ácido tricostático) continúan inhibiendo las HDACs de tipo I y II por varias horas (Sanderson *et al.*, 2004).

La TSA (T8552, Sigma) se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% y, luego, se diluyó en solución salina hasta alcanzar una concentración de DMSO de 18% y una concentración de TSA de 1 mg/ml, de acuerdo con lo descrito en la literatura (Shafaati et al. 2009). El fármaco se administró a los animales por vía intraperitoneal (i.p.), en dosis de 1 mg/kg; dada la concentración final de la solución, el volumen inyectado fue de 1 ml/kg. La efectividad de la administración sistémica de TSA para inhibir las HDACs en el sistema nervioso central se confirmó al encontrar hiper-acetilación en el hipocampo 30 min después de su administración (ANEXO B).

### **3.5. Cuantificación de los Niveles de Corticosterona en Plasma**

Veinticuatro horas después de la inyección de TSA o de DMSO al 18% se tomaron muestras de sangre central en animales de cada uno de los grupos experimentales. En el caso de los animales que recibieron entrenamiento, éstas se obtuvieron inmediatamente después de la prueba de memoria. Las muestras de sangre se sometieron a centrifugación a 2500 rpm durante 10 min para separar el plasma de los elementos formes. El plasma se congeló a -20 °C y se almacenó a esta temperatura hasta su uso. Para determinar la concentración de corticosterona se utilizó un kit (ab108821 Abcam) de ensayo de inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA), siguiendo las recomendaciones del fabricante y realizando mediciones para cada muestra por triplicado. Así, se abrió el plato de ELISA y se adicionaron 25 µl de cada uno de los estándares a los pozos para obtener la curva de calibración. Posteriormente se adicionaron 25 µl de cada muestra (diluida 1:200). Inmediatamente después se adicionó a cada pozo 25 µl de corticosterona biotinilada, se cubrió el plato y se incubó por 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido este periodo se descartaron los contenidos del plato y éste se lavó 5 veces con la solución de lavado suministrada en el kit. Luego del lavado, se adicionaron 50 µl de conjugado estreptavidina/biotina a cada pozo y esta solución se dejó allí por 30 min. De nuevo, se descartaron los contenidos del plato y éste se lavó. Se adicionaron entonces 50 µl del sustrato cromógeno suministrado en el kit y esta solución se dejó allí por 30 minutos. Pasado este intervalo de tiempo se puso la solución de parada sobre el sustrato cromógeno y el plato se puso inmediatamente en el espectrofotómetro (lector de platos Ultramark) para cuantificar la absorbancia de los estándares y las muestras a una longitud de onda de 450 nm. Los valores obtenidos de las absorbancias se transformaron en



concentraciones  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  usando la herramienta para cálculos de inmunoensayos de Penninsula Laboratories International Inc. (<http://penlabs.com/wp-content/uploads/2014/03/ImmunoAssay-CalculationsV7.4-Penlabs-techsupport.xls>). El coeficiente de variación entre ensayos fue de 3.9%.

### **3.6. Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia**

#### **3.6.1. Fijación y sección del tejido cerebral**

Para obtener muestras de tejido cerebral se sacrificó a los animales administrando una dosis letal de uretano (1,5 g/kg) por vía intraperitoneal 24 horas después de la inyección de TSA o de vehículo; en el caso de los animales entrenados, la muestra se tomó inmediatamente después de la prueba. Una vez los animales estuvieron profundamente anestesiados se practicó perfusión intracardiaca con solución salina al 0.9%, seguida de paraformaldehído (PFA) al 4% en solución salina tamponada (pH 7,4) con fosfatos al 0,1 M (PBS, por su sigla en inglés), para fijar las proteínas. Terminada la perfusión, se extrajo el cerebro del cráneo y se dejó en post-fijación en PFA al 4% en PBS a 4°C. Los cerebros se pasaron entonces a una solución hipertónica de sacarosa al 30% en agua destilada para crioproteger el tejido y se mantuvieron allí hasta que se impregnaron por completo, lo que se evidenció por precipitación del cerebro en el recipiente (este proceso tomó entre 48 y 72 h). En estas condiciones, los cerebros se congelaron rápidamente sumergiéndolos en isopentano enfriado con hielo seco y se almacenaron en un congelador Revco a -70 °C. Para obtener los cortes histológicos, se tomaron los cerebros y se cortaron en un criostato (Leica CM1850) en secciones sagitales de 30  $\mu\text{m}$  que incluyeron las regiones de interés (entre 0,40 mm y 0,90 mm y entre 3,90 mm a 4,20 mm lateral a la línea media, según el atlas del cerebro de ratas adultas de Paxinos and Watson 1997). Los cortes de las regiones de interés se separaron en 5 series para su posterior procesamiento de inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.

#### **3.6.2. Detección por inmunohistoquímica histona H3 acetilada en la lisina 14**

Los cortes de las regiones de interés se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.5% en PBS (PBS+). Se lavó nuevamente el tejido con PBS y se procedió a incubar en una solución de agua oxigenada (1,66%) y etanol (50%) en PBS durante 20 min para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Los cortes

se lavaron nuevamente con PBS y se realizó una permeabilización adicional con PBS+. Inmediatamente después, se sumergieron los cortes en una solución de PBS+ a la que se adicionó suero fetal bovino (10%) y gelatina de piel de porcino (0,2%) y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente, a fin de reducir la asociación inespecífica del anticuerpo primario con proteínas distintas a la proteína objetivo. A continuación, se incubó el tejido en una solución de suero fetal bovino (2%) y gelatina (0,2%) en PBS+ con el anticuerpo primario (anti-acH3K14 - EP964Y, anticuerpo primario monoclonal producido en conejo, Abcam) en concentración 1:2500 durante 18 h a 4 °C. Se lavó entonces el tejido con PBS+ para remover el exceso de anticuerpo primario y se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG de conejo producido en caballo (BA-1100, Vector Labs) a una concentración de 1:1000 en PBS+ con suero fetal bovino (2%) y gelatina (0,2%) durante 1-h a temperatura ambiente. Luego se lavó el exceso de anticuerpo secundario con PBS+, seguido de PBS y se incubaron los tejidos en una solución de avidina-biotina (kit ABC de Vectastain - PK 6101, Vector Labs). Se lavó de nuevo el tejido con PBS+, seguido de PBS y se reveló el anticuerpo secundario una solución de agua destilada, agua oxigenada, 3,3'-diaminobenzidina y níquel (Kit SK 4100, Vector Labs). La reacción se suspendió con 5 lavados de PBS a 4°C. Los cortes se montaron en láminas y se dejaron secar antes de deshidratarlos y cubrirlos con laminillas cubreobjetos sobre bálsamo de Canadá.

Una vez secos, los cortes se observaron en un microscopio de campo claro (Axioskop 40, Zeiss) y, usando un objetivo de 40X, se tomaron imágenes con un aumento de 40X de la corteza prelímbica, el hipocampo (CA1 y circunvolución dentada) y el núcleo basolateral de la amígdala usando una cámara digital (PowerShot G10, Cannon). El porcentaje del área marcada en cada imagen fue calculado automáticamente usando las herramientas de "Threshold" y "Analyze particles" del software Fiji (Schindelin *et al.*, 2012). Los valores para cada sujeto experimental en cada área analizada se normalizaron al calcular el porcentaje de marcación con relación al valor promedio para cada región en cortes de animales inyectados con una inyección de vehículo (DMSO 18%). La validez de la inmunodetección lograda usando este protocolo se estableció al observar la ausencia de señal en tejidos incubados sin anticuerpo primario y la presencia de señal en los islotes de Calleja en cortes de todos los animales de los diferentes grupos.

### 3.6.3. Detección de GR y HDAC2 por inmunofluorescencia

Los cortes de las regiones de interés se lavaron con PBS y posteriormente se montaron en láminas cargadas. Con el fin de recuperar los epítomos de las proteínas enmascarados por la fijación con PFA, se incubaron los cortes en una solución de ácida (pH 6.0, RE7114, Leica) a una temperatura de 90°C por 20 minutos, y 20 minutos más a temperatura ambiente. Acto seguido, se lavó el tejido con PBS y se incubó en una solución de cloruro de amonio (50 mM) durante 10 minutos con el fin de disminuir su autofluorescencia. Luego se permeabilizó el tejido con PBS+ y se incubó en una solución de bloqueo (PBS+, albúmina bovina sérica -BSA- 5%, suero normal de cabra -SNC- 3%, y suero fetal bovino -SFB- 3%) por 1 hora a temperatura ambiente. A partir de este punto el tejido se mantuvo en la oscuridad, incubándolo por 72 horas a 4°C con los anticuerpos anti-GR monoclonal producido en ratón (BuGR2 - ab2768, Abcam) a una concentración de 1:250, y anti-HDAC2 monoclonal producido en conejo (Y461 - ab32117, Abcam) a una concentración de 1:250, diluidos en una solución de PBS+, BSA (1%), SNC (1%) y SFB (1%). Pasado este periodo se lavó el tejido con PBS+ y se incubó por 1 hora con los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón (H+L) producido en burro y conjugado con Alexa Fluor® 488 (A-21202, Thermo) a una concentración de 1:500 y anti-IgG de conejo (H+L) producido en burro y conjugado con Alexa Fluor® 546 (A-10040, Thermo) a una concentración de 1:500, diluidos en una solución de PBS+, BSA (1%), SNC (1%) y SFB (1%). Por último, el tejido se lavó con PBS+ y se enjuagó en agua destilada antes de poner el medio de montaje Fluoroshield adicionado con DAPI (ab104139, Abcam) y cubrir el tejido con laminillas. Los bordes de las láminas se sellaron con esmalte transparente y se guardaron a 4°C. El tejido se observó en un microscopio confocal Nikon Eclipse C1 Plus (Nikon Instruments Inc.) y se tomaron imágenes de la corteza prelímbica, la región CA1 y la fascia dentada del hipocampo, y en la amígdala basolateral con un objetivo de 60X de inmersión en aceite. Se limitó la inclusión de la autofluorescencia en las cuantificaciones usando la herramienta “Subtract background” (Rolling ball radius - 50,0 pixeles) del software Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) y se realizaron análisis de densidad óptica con la herramienta “Measure” del mismo software. Para los análisis de co-localización entre el receptor de GR y HDAC2 se usó la herramienta “Colocalization test” del mismo software, limitando el análisis a los núcleos celulares (HDAC2 se expresa exclusivamente en núcleos); para esto, se seleccionó como

región de interés (ROI) el área con la señal correspondiente a HDAC2. Los valores para cada sujeto experimental en cada área analizada se normalizaron al calcular el porcentaje del valor cuantificado con relación al valor promedio de cada área de tejido de animales inyectados con una inyección de vehículo (DMSO 18%).

### **3.7. Cuantificación de la Expresión Génica por PCR en Tiempo Real**

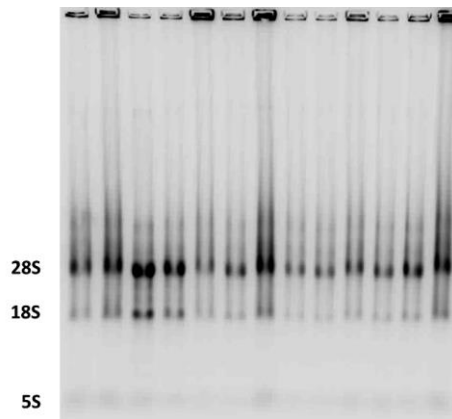
#### **3.7.1. Extracción de RNA**

Veinticuatro horas después de administrados los tratamientos, se sacrificaron los animales por decapitación y se tomaron bocados de tejido fresco de la corteza medial prefrontal, la formación amigdalina y el hipocampo entero de animales de cada uno de los grupos experimentales. En el caso de los animales con entrenamiento, las muestras se tomaron al final de la prueba de memoria. Las muestras (cada región por separado) se homogenizaron en 500  $\mu$ l de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (TRI-Reagen, T9424, Sigma) a 4°C en un homogenizador *dounce* y se almacenaron en crioviales a -70°C hasta su uso. Se usaron materiales y reactivos libres de RNAsas y DNAsas.

Se tomaron 250  $\mu$ l del tejido homogenizado y se les centrifugó por 15 min a 12,000 rpm a 4°C. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos, a los cuales se agregó 50  $\mu$ l de cloroformo; la muestra se agitó e incubó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C por 10 min lo que permitió separar la fase acuosa que contenía el RNA de la fase orgánica (proteínas y lípidos) y de la interfase (DNA). La fase acuosa se puso en un nuevo tubo, al cual se agregaron 120  $\mu$ l de isopropanol; la muestra se agitó e incubó por 10 min a temperatura ambiente. Pasada la incubación, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C por 10 minutos, obteniéndose un *pellet* de RNA, que se lavó con 250  $\mu$ l de alcohol al 70% y se centrifugó de nuevo a 12,000 rpm a 4°C por 5 min; se descartó el etanol y se repitió el lavado y la centrifugación. Posteriormente se desechó el etanol y se secó el *pellet* de RNA en una incubadora a 37 °C por 5 min. El *pellet* seco se re-suspendió en agua ultrapura libre de nucleasas (AM9932 - Thermo) usándose 20  $\mu$ l para re-suspender las muestras de corteza e hipocampo, y 10  $\mu$ l para re-suspender muestras de amígdala. Las muestras de RNA se almacenaron a -70°C hasta su uso.

### 3.7.2. Calidad y cantidad de RNA

Antes de realizar las extracciones para los ensayos de qPCR se validó que el método de extracción de RNA por fenol/cloroformo produjera RNA íntegro. Para esto se verificó la integridad del RNA aislado en geles de agarosa al 1,5% en cámaras de electroforesis horizontal (120 min, 60 V). Los ácidos nucleicos fueron visualizados con SYBR-green I (S9430, Sigma) en un equipo de fotodocumentación y análisis de geles (Genesnap/Genetools, Syngene). Se confirmó la presencia de las bandas del RNA ribosomal 28S y 18S en una proporción aproximada de 2:1 (Figura 10).



**Figura 10. Integridad del RNA.** Se determinó la integridad del RNA obtenido por el método de fenol/cloroformo mediante el tamizaje por electroforesis vertical en geles de agarosa. Se observó la presencia de las bandas 18S y 28S de RNA ribosomal indicando que el método utilizado permitió la obtención de RNA íntegro.

La cantidad y pureza de RNA de las muestras utilizadas en el estudio se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop® (ND-1000 V3.2, Nanodrop Technologies). Se cuantificó la concentración de RNA en un 1µl de muestra, y posteriormente cada muestra se diluyó en agua libre de RNAsas para alcanzar una concentración de 1µg/µl. La pureza del RNA extraído se determinó con el cociente de las absorbancias a las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm ( $A_{260nm}/A_{280nm}$ ). Se usaron las muestras con un cociente superior a 1,95.

### 3.7.3. Transcripción reversa

La transcripción reversa de RNA a cDNA se realizó con el kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones del fabricante, como se describe a continuación. Se prepararon 20 µl de reacción (10 µl 2× RT Buffer, 1 µl 20× RT Enzyme Mix, 7 µl de agua libre de nucleasas y 2 µl de muestra) y se indujo la

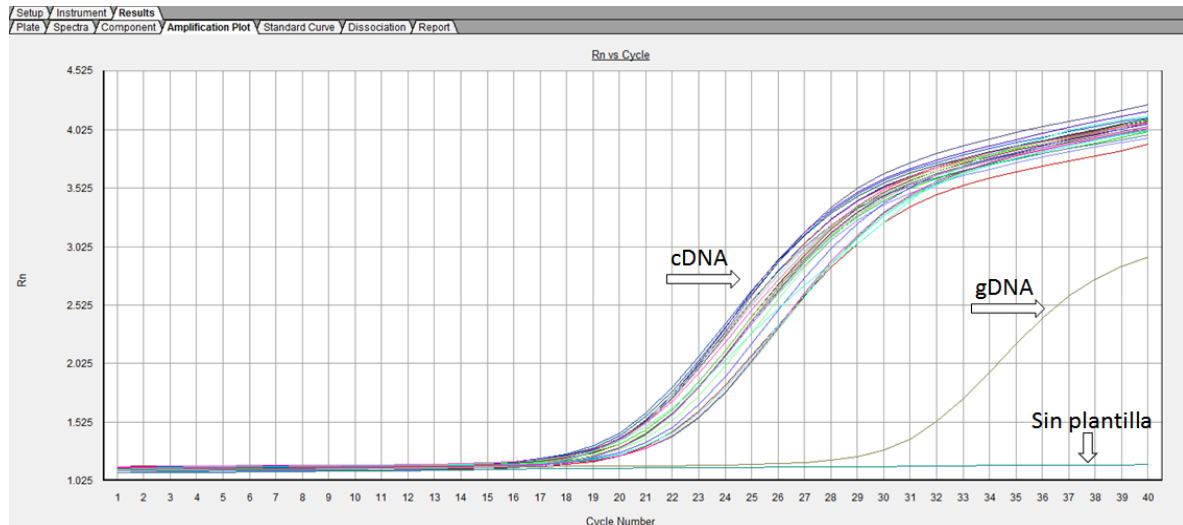
reacción en un termociclador Biorad (Cycler Biorad) siguiendo el siguiente programa: 1) 37°C x 60 min, 2) 95°C x 5 min 3). 4°C x 5 min. La concentración de cDNA se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 V3.2 (Nanodrop Technologies). La pureza del cDNA se determinó con el cociente de las absorbancias a las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm (A260nm/A280nm), aceptando un valor superior a 1,8. Después de determinadas las concentraciones de cDNA para cada muestra, éstas se diluyeron en agua libre de nucleasas para llevarlas a una concentración de 25 ng/µl. Los productos de la amplificación se congelaron a -20 °C hasta el momento de realizar la PCR cuantitativa.

#### **3.7.4. PCR cuantitativa (qPCR)**

Se utilizó el kit TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) para las reacciones de PCR cuantitativa y se siguieron las recomendaciones del fabricante como se describe a continuación. Se prepararon 20 µl reacción (1 µl 20× TaqMan® Gene Expression Assay, 10 µl 2× TaqMan® Gene Expression Master Mix, 5 µl de agua libre de nucleasas y 4 µl de plantilla de cDNA a una concentración de 25 ng/ µl) y la amplificación en tiempo real se realizó con el termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) usando el siguiente perfil de reacción: 1) 50°C x 2 min, 2) 95°C x 10 min, 3) 40 ciclos de 95°C x 15 s, 60°C x 60 s. Se usaron ensayos prediseñados (TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems) con la mezcla de cebadores y sonda (FAM, 525 nm) para la amplificación de los genes *Grin1* (Rn01436038\_m1, NMDA-NR1), *Grin2a* (Rn00561341\_m1, NMDA-NR2A), *Grin2b* (Rn00680474\_m1, NMDA-NR2B), *Nr3c1* (Rn00561369\_m1, GR), *Hdac2* (Rn01193634\_g1, HDAC2). Se usó como gen de normalización interna la proteína de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*, Rn01775763\_g1, VIC 554nm).

No se observó amplificación de DNA genómico (gDNA) en las sondas diseñadas para expandirse entre exones. Las sondas que no contaron con esta ventaja (*Hdac2* y *Gapdh*) mostraron una amplificación de gDNA 10 ciclos por encima del valor observado para las muestras de cDNA, por lo que en estos ensayos el gDNA aportó un error de tan solo 0.00158 veces por ciclo. Las reacciones sin plantilla no mostraron amplificación (valor indeterminado). En la Figura 11 se observan las curvas de amplificación para el gen *Gapdh* en muestras de hipocampo con plantilla de cDNA obtenida por transcripción reversa (derecha) y con plantilla no sometida a

transcripción reversa para identificar gDNA (izquierda); la línea azul en la parte baja representa la reacción sin plantilla.



**Figura 11. Amplificación *Gapdh*.** Curvas de amplificación para el gen *Gapdh* en muestras de hipocampo. A la izquierda se observan las curvas de amplificación de cDNA en muestras a las que se les dio transcripción reversa, mientras que la curva de la derecha muestra la amplificación de gDNA en una muestra que no fue sometida al protocolo de transcripción reversa. La línea azul aplanada en la base de la gráfica muestra la ausencia de amplificación de una reacción que se preparó sin plantilla.

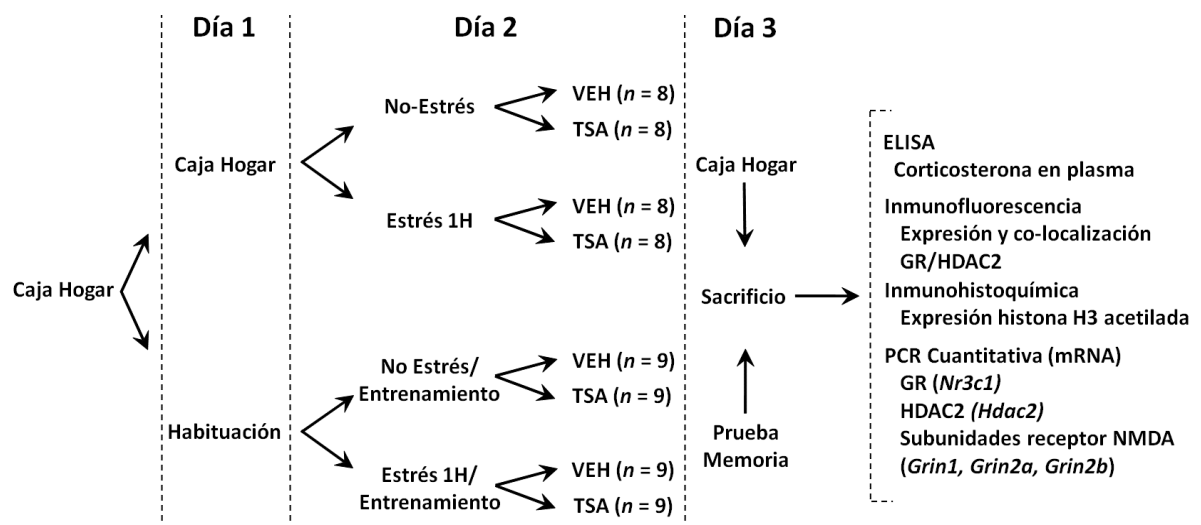
### 3.7.5. Análisis de la expresión génica relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

Se cuantificó la expresión relativa de cada gen diana en cada muestra utilizando el método comparativo del ciclo umbral o  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descrito por Pfaffl 2001 (donde,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  gen normalización –  $\Delta Ct$  gen diana), donde Ct corresponde al ciclo umbral. Se asumieron eficiencias de 1.0 en cada ciclo pues el fabricante garantizó un valor próximo en cada una de sus sondas prediseñadas ([http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/general/ocuments/cms\\_040377.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/general/ocuments/cms_040377.pdf)).

## 3.8. Diseño Experimental

Se utilizó un diseño factorial para estudiar los efectos del estrés agudo y la inhibición de las HDACs sobre la consolidación de la memoria espacial, los niveles plasmáticos de corticosterona, y cambios bioquímicos en el tejido cerebral. Este diseño permitió analizar los efectos individuales del estrés, la inhibición de las HDACs y el entrenamiento espacial, así como la interacción entre estos factores. En la Figura 12 se presenta el diseño utilizado en esta investigación. Los factores incluidos en el

diseño fueron: 1) estrés agudo (presente o ausente); 2) inhibición de las HDACs (vehículo o TSA) y, 3) entrenamiento (presente o ausente), lo que supuso la conformación de 8 grupos experimentales. Dada la complejidad del diseño, y el hecho de que en los animales entrenados las muestras fueron recolectadas inmediatamente después de la prueba de memoria, se analizaron los efectos del estrés y la inhibición de las HDACs de manera separada en animales sin entrenamiento y animales con entrenamiento. Las comparaciones para identificar los efectos del entrenamiento espacial, y su interacción con los factores de estrés e inhibición de las HDACs se hizo mediante pruebas ANOVA de tres vías, las cuales se presentan en el ANEXO E.



**Figura 12. Diseño experimental.** La mitad de los sujetos experimentales fueron habituados al laberinto de Barnes, mientras que el resto permaneció en su caja hogar. Veinticuatro horas después, la mitad de los sujetos expuestos o no a habituación, fueron estresados por restricción de movimientos y el resto permaneció en la caja hogar. Los animales habituados fueron entonces entrenados en el laberinto de Barnes. La mitad de los animales de cada grupo experimental recibió una inyección de vehículo y la otra mitad una inyección de TSA. Veinticuatro horas después se recolectaron muestras de plasma sanguíneo y tejido cerebral en sujetos de todos los grupos experimentales para realizar ensayos de ELISA para corticosterona, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y RT-PCR cuantitativa. En el caso de los animales con entrenamiento esto coincidió con el final de la prueba de memoria.

### 3.8.1. Grupos experimentales

Dado el diseño anteriormente expuesto, se conformaron los siguientes grupos experimentales:

VEH: Sujetos a los que únicamente se administró una inyección de DMSO.

TSA: Sujetos a los que únicamente se administró una inyección de TSA.



Estrés/VEH: Sujetos a los que se administró DMSO inmediatamente después de la inducción de estrés.

Estrés/TSA: Sujetos a los que se administró TSA inmediatamente después de la inducción de estrés.

Entrenamiento/VEH: Sujetos a los que se administró DMSO inmediatamente después del entrenamiento espacial. Veinticuatro horas después se realizó la prueba de memoria.

Entrenamiento/TSA: Sujetos a los que se administró TSA inmediatamente después del entrenamiento espacial. Veinticuatro horas después se realizó la prueba de memoria.

Estrés/Entrenamiento/VEH: Sujetos a los que se administró DMSO inmediatamente después del entrenamiento espacial a sujetos previamente estresados. Veinticuatro horas después se realizó la prueba de memoria.

Estrés/Entrenamiento/TSA: Se administró TSA inmediatamente después del entrenamiento espacial a sujetos previamente estresados. Veinticuatro horas después se realizó la prueba de memoria.

Las muestras de plasma y tejido cerebral se obtuvieron de animales de todos los grupos experimentales 24 horas después del momento de la administración de la inyección intraperitoneal de vehículo o TSA.

Debido a que la inyección intraperitoneal de un vehículo (solución salina) induce rápidos incrementos en los niveles de corticosterona (Cerón, 2015), y que la administración de DMSO tiene un efecto pequeños sobre la expresión de algunos genes (Karamboulas *et al.*, 2006; Sumida *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013) se realizaron experimentos piloto para determinar los efectos de la administración a de DMSO (18% en solución salina) sobre los niveles de corticosterona plasmática, la expresión de las proteínas GR y HDAC2, la acetilación de histonas, y la expresión génica. Se encontró que la inyección de DMSO tiene un efecto pequeño pero significativo sobre los niveles plasmáticos de corticosterona, y los niveles de acetilación de la histona H3 en la fascia dentada y la amígdala basolateral, pero no se observaron efectos sobre la expresión de proteínas o mRNA (ANEXO C).

También se evaluaron los efectos de la inyección de un vehículo (solución salina o DMSO 18%) sobre la consolidación de la memoria espacial en animales entrenados en la tarea espacial, la mitad de los cuales había sido sometida a estrés antes del

entrenamiento. Se encontró que, tanto la inyección de solución salina, como la inyección de DMSO empeoraron la consolidación de la memoria espacial en animales estresados, pero no en animales no estresados. Esto confirma que la administración intraperitoneal de un vehículo, es por sí misma, un evento estresante (Cerón, 2015), que potencia los efectos negativos del estrés por restricción de movimientos (ANEXO D). Dados estos resultados, los datos del grupo de animales inyectados con DMSO al 18% 24 horas antes de la toma de las muestras, se usaron como línea de base para cada uno de los ensayos realizados.

Los efectos del tratamiento farmacológico y el estrés se analizaron de forma separada en animales sin entrenamiento espacial y con entrenamiento espacial, por lo que, para determinar la interacción entre estos factores con el factor entrenamiento en la tarea espacial, se realizaron pruebas ANOVA de 3 vías, (ANEXO E).

### **3.9. Análisis Estadístico**

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una, dos o tres vías, seguidos de análisis *post-hoc* con la prueba de Holm-Sidak. Se hicieron comparaciones planeadas entre pares de grupos mediante la prueba de *t-student* y comparaciones contra el azar mediante una prueba t de una muestra (*one-sample t test*). Para los análisis de correlación entre variables dependientes se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. El valor crítico de significancia para todos los análisis estadísticos se estableció en 0,05. Los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico SigmaStat 3.01. Las Figuras muestran los valores promedio ( $\bar{x}$ ) y error estándar ( $\pm$ SEM) de los datos de cada grupo experimental.

### **3.10. Aspectos Éticos y de Bioseguridad**

Las condiciones de alojamiento, la totalidad de los procedimientos experimentales, y la disposición de los residuos biológicos y químicos se realizó observando las normativas nacionales e internacionales pertinentes: Resolución n° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Ley 84 del 27 de diciembre de 1989. También se observaron los procedimientos para el manejo y cuidado de animales de laboratorio recomendados por la normativa de la Unión Europea (8616091EU) y los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América (NIH, 2011).

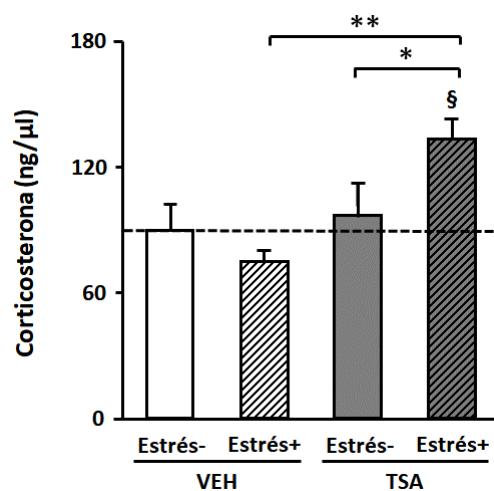
## **4. RESULTADOS**

## 4.1. Efectos del Estrés Agudo y la TSA en Animales Sin Entrenamiento Espacial

### 4.1.1. Niveles de corticosterona en plasma

Se encontraron diferencias significativas en los niveles de corticosterona entre los sujetos de los grupos experimentales y sujetos no estresados que se utilizaron como línea de base (ANOVA 1 vía:  $F_{(3, 11)} = 5.649$ ,  $p = 0.022$ ; Figura 13). Los análisis *post-hoc* mostraron que, 24 horas después del tratamiento, los animales estresados e inyectados posteriormente con TSA mostraron un incremento significativo en los niveles de la hormona (Estrés+/TSA:  $t = 3.015$ ,  $p = 0.016$ ), pero los demás grupos mostraron valores comparables con la línea de base (Estrés+/VEH:  $t = 0.914$ ,  $p = 0.387$ ; Estrés-/TSA:  $t = 0.537$ ,  $p = 0.606$ ).

Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 13) mostraron un efecto significativo del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 11)} = 9.973$ ,  $p = 0.013$ ) y de la interacción entre el tratamiento farmacológico y el estrés ( $F_{(1, 11)} = 5.751$ ,  $p = 0.043$ ), pero no del estrés solo ( $F_{(1, 11)} = 1.222$ ,  $p = 0.301$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que la concentración de corticosterona en plasma de los animales estresados e inyectados con TSA fue significativamente mayor que la de los animales estresados e inyectados con vehículo (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 3.929$ ,  $p = 0.004$ ) y de los animales sin estrés e inyectados con TSA (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 2.477$ ,  $p = 0.038$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 0.914$ ,  $p = 0.387$ ; Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.537$ ,  $p = 0.606$ ).

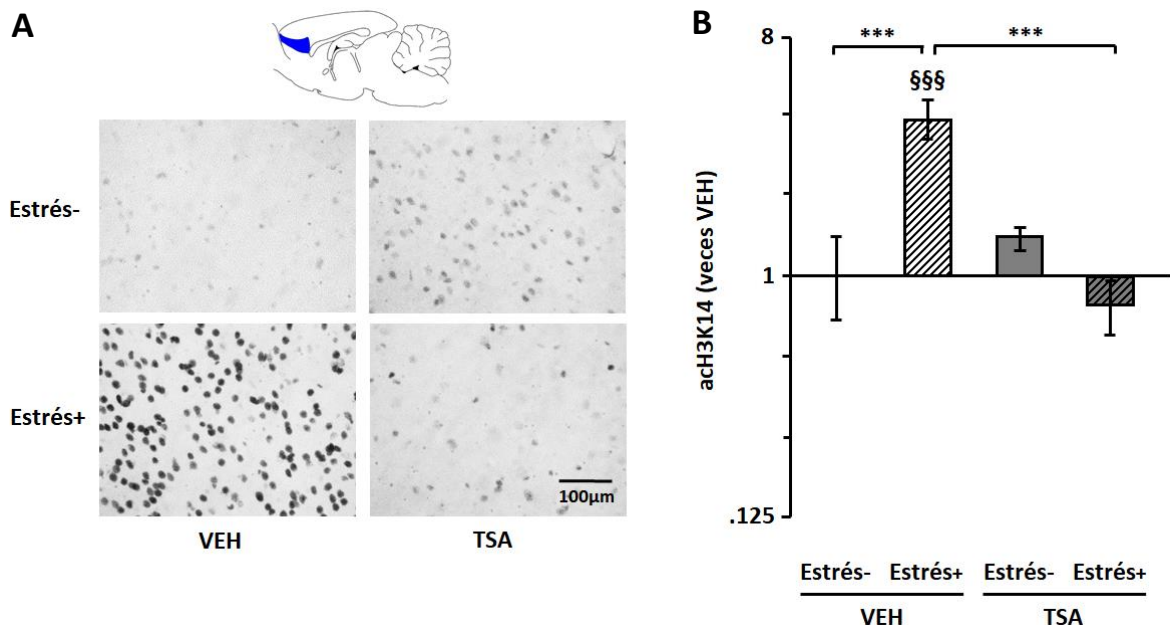


**Figura 13.** La inducción de estrés seguida de la inyección de TSA incrementó a largo plazo los niveles de corticosterona por encima del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con relación a la línea de base; --- línea de base.

## 4.1.2. Acetilación de lisina 14 de la histona H3 en tejido cerebral

### 4.1.2.1. Corteza prefrontal

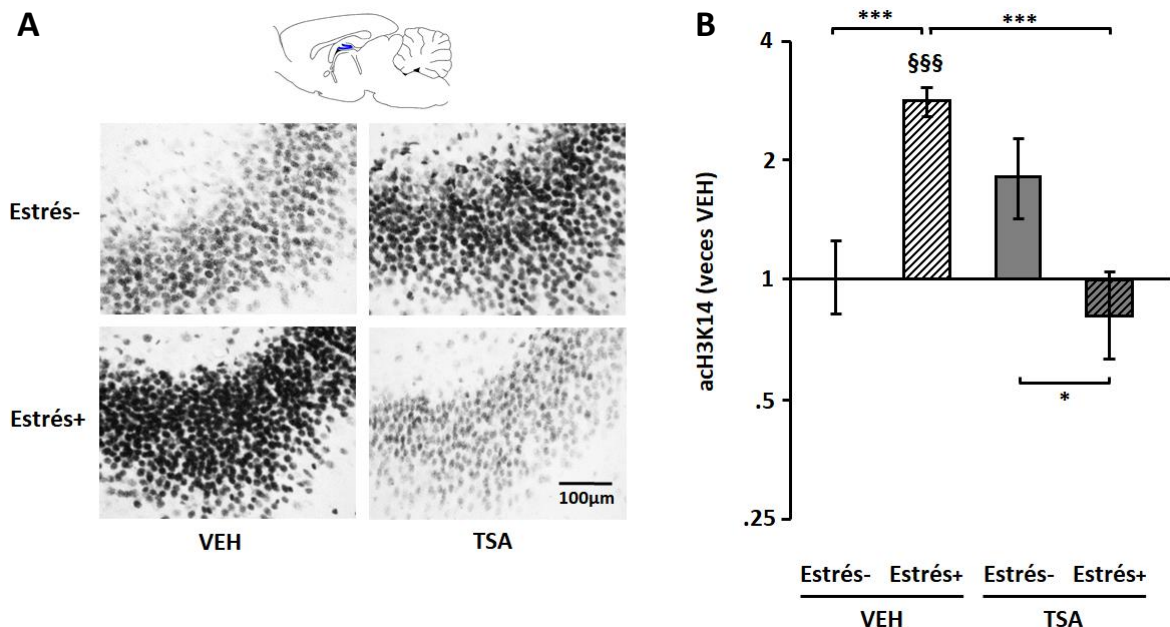
Los niveles de acH3K14 en la **corteza prefrontal** en los grupos experimentales fueron significativamente diferentes del nivel basal (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 13.174$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 14). Los análisis *post-hoc* mostraron un incremento significativo en los niveles de acH3K14 en animales estresados inyectados con vehículo (Estrés+/VEH:  $t = 5.152$ ,  $p < 0.001$ ), pero no en los demás grupos experimentales (Estrés-/TSA:  $t = 0.693$ ,  $p = 0.502$ ; Estrés+/TSA:  $t = 0.398$ ,  $p = 0.698$ ). La comparación entre grupos experimentales de los niveles de acH3K14 en esta región (ANOVA 2 vías; Figura 14) mostró efectos significativos del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 11.794$ ,  $p = 0.005$ ), del estrés ( $F_{(1, 15)} = 8.246$ ,  $p = 0.014$ ), y de la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 19.483$ ,  $p < 0.001$ ). Los análisis *post-hoc* confirmaron que, en los animales inyectados con vehículo, el estrés provocó un aumento significativo de los niveles de acH3K14 (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 5.152$ ,  $p < 0.001$ ) y que la TSA previno este efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 5.549$ ,  $p < 0.001$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.693$ ,  $p = 0.502$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 1.091$ ,  $p = 0.297$ ).



**Figura 14. La TSA previno que el estrés provocara un incremento de acH3K14 en la corteza prefrontal.** A. Microfotografías ilustrativas. B. Nivel de acH3K14. Resultados expresados como veces del nivel basal (animales que solo recibieron inyección de vehículo 24-h antes). Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

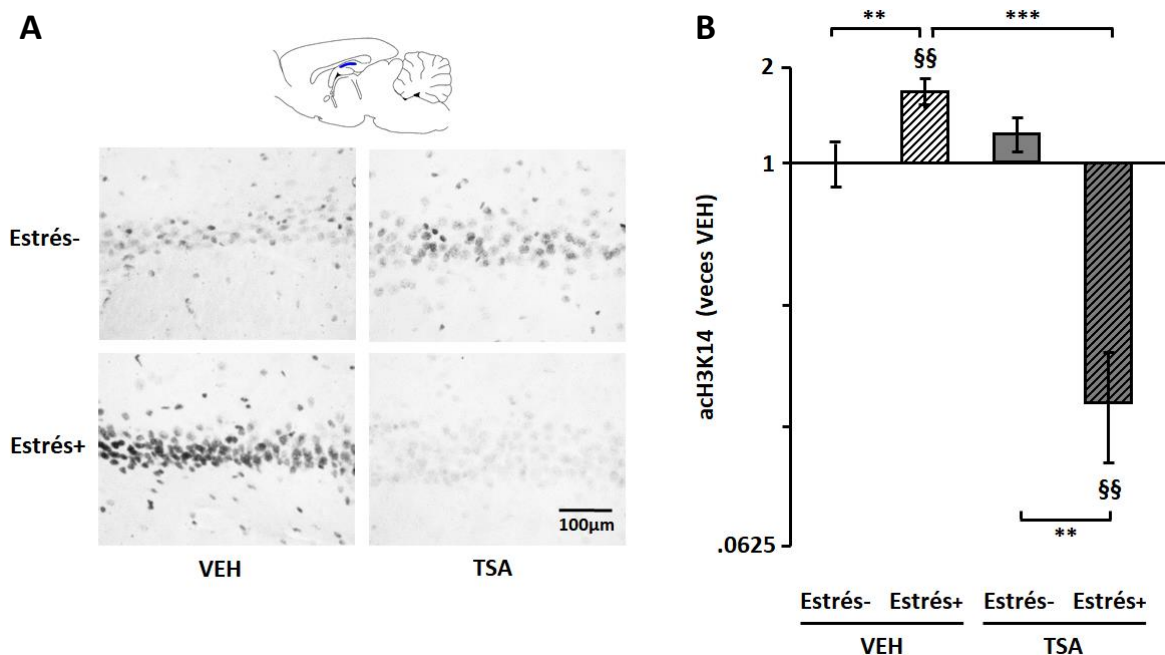
#### 4.1.2.2. Hipocampo

Los niveles de acH3K14 en la **fascia dentada** en los grupos experimentales fueron significativamente diferentes del nivel basal (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 9.636$ ,  $p = 0.002$ ; Figura 15). Los análisis *post-hoc* mostraron un incremento significativo de acH3K14 con respecto al nivel basal en animales estresados inyectados con vehículo (Estrés+VEH:  $t = 4.364$ ,  $p < 0.001$ ), mientras que en los demás grupos no hubo diferencias significativas con respecto al nivel basal (Estrés-/TSA:  $t = 2.005$ ,  $p = 0.068$ ; Estrés+/TSA:  $t = 0.436$ ,  $p = 0.670$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 15) mostraron un efecto significativo de la interacción entre el tratamiento farmacológico y el estrés ( $F_{(1, 15)} = 23.156$ ,  $p < 0.001$ ) sobre los niveles de acetilación; sin embargo, el factor tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 3.904$ ,  $p = 0.072$ ) o el factor estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.847$ ,  $p = 0.199$ ) por sí solos no afectaron los niveles de acH3K14. Los análisis *post-hoc* confirmaron que el estrés en animales inyectados con vehículo incrementó los niveles de acH3K14 (Estrés+VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 4.364$ ,  $p = 0.001$ ) y que la TSA previno este efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+VEH:  $t = 4.800$ ,  $p < 0.001$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 2.005$ ,  $p = 0.068$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 2.442$ ,  $p = 0.031$ ).



**Figura 15. La TSA evitó que el estrés provocara un aumento significativo de acH3K14 en la fascia dentada.** A. Microfotografías ilustrativas. B. Nivel de acH3K14. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

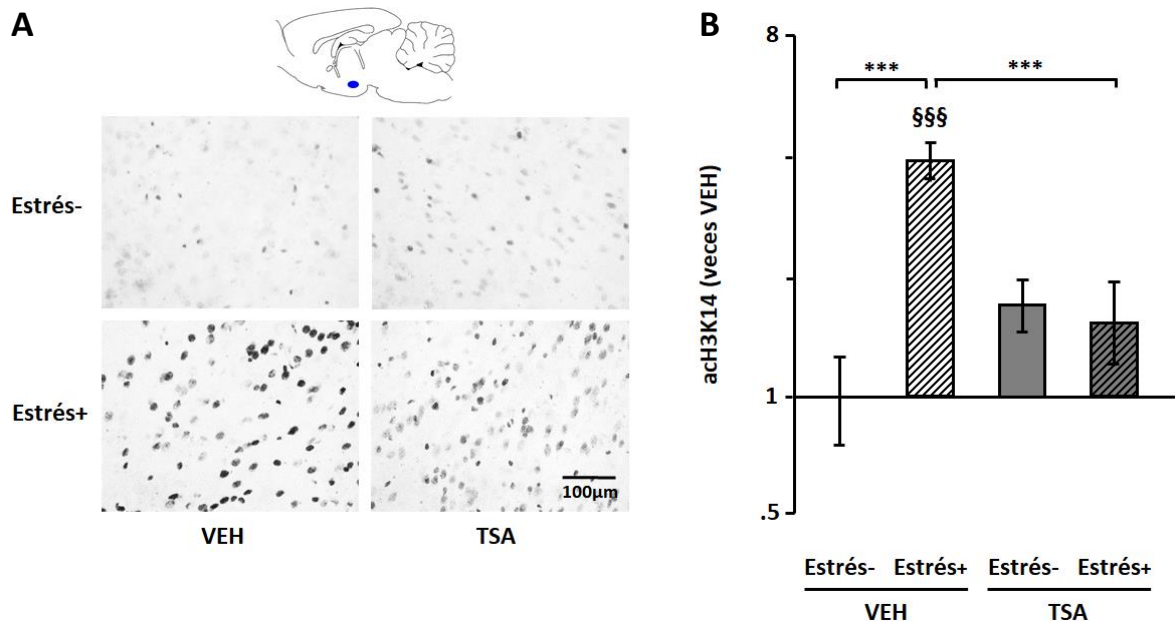
De manera semejante, en la **región CA1** se observaron niveles **acH3K14** diferentes a los basales en los grupos experimentales (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 19.359$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 16). Los análisis *post-hoc* mostraron un incremento en los niveles de acetilación de la histona H3 en animales estresados inyectados con vehículo (Estrés+/VEH:  $t = 3.353$ ,  $p = 0.005$ ), y un decremento en la acetilación en animales estresados inyectados con TSA (Estrés+/TSA:  $t = 4.072$ ,  $p = 0.001$ ). Los animales sin estrés inyectados con TSA mostraron niveles semejantes al basal (Estrés-/TSA:  $t = 1.124$ ,  $p = 0.283$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 16) mostraron un efecto significativo del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 19.847$ ,  $p < 0.001$ ) y de la interacción entre fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 36.533$ ,  $p < 0.001$ ) sobre los niveles de acetilación de la H3; mientras que el factor estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.698$ ,  $p = 0.217$ ) no tuvo efectos. Los análisis *post-hoc* confirmaron que el estrés en los animales inyectados con vehículo incrementó los niveles de acH3K14 (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 3.353$ ,  $p = 0.006$ ), efecto revertido por la inyección de TSA (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 7.424$ ,  $p < 0.001$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 5.195$ ,  $p < 0.001$ ; Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.124$ ,  $p = 0.283$ ).



**Figura 16. La TSA evitó que el estrés provocara aumento de acH3K14 en CA1.** A. Microfotografías ilustrativas. B. Nivel de acH3K14. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

#### 4.1.2.3. Amígdala

Los niveles de acH3K14 en el **núcleo basolateral** de la amígdala en los grupos experimentales fueron significativamente diferentes del nivel basal (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 15.234$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 17). Los análisis *post-hoc* mostraron marcado incremento de los niveles de acH3K14 en animales estresados inyectados con vehículo (Estrés+/VEH:  $t = 6.236$ ,  $p < 0.001$ ), mientras que los demás grupos no mostraron diferencias significativas con respecto a la línea de base (Estrés-/TSA:  $t = 1.498$   $p = 0.160$ ; Estrés+/TSA:  $t = 1.090$ ,  $p = 0.297$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 17) mostraron efectos significativos del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 6.652$ ,  $p = 0.024$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 16.983$ ,  $p = 0.001$ ) y la interacción entre ambos factores ( $F_{(1, 15)} = 22.066$ ,  $p < 0.001$ ) sobre los niveles de acH3K14. Los análisis *post-hoc* confirmaron que, en animales inyectados con vehículo, el estrés provocó un incremento significativo de acH3K14 (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 6.236$ ,  $p < 0.001$ ) y que la TSA previno este efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 5.145$ ,  $p < 0.001$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.408$ ,  $p = 0.691$ ; Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.498$ ,  $p = 0.160$ ).



**Figura 17. La TSA evitó que el estrés provocara aumento significativo de acH3K14 en la amígdala basolateral.** A. Microfotografías ilustrativas. B. Nivel de acH3K14. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

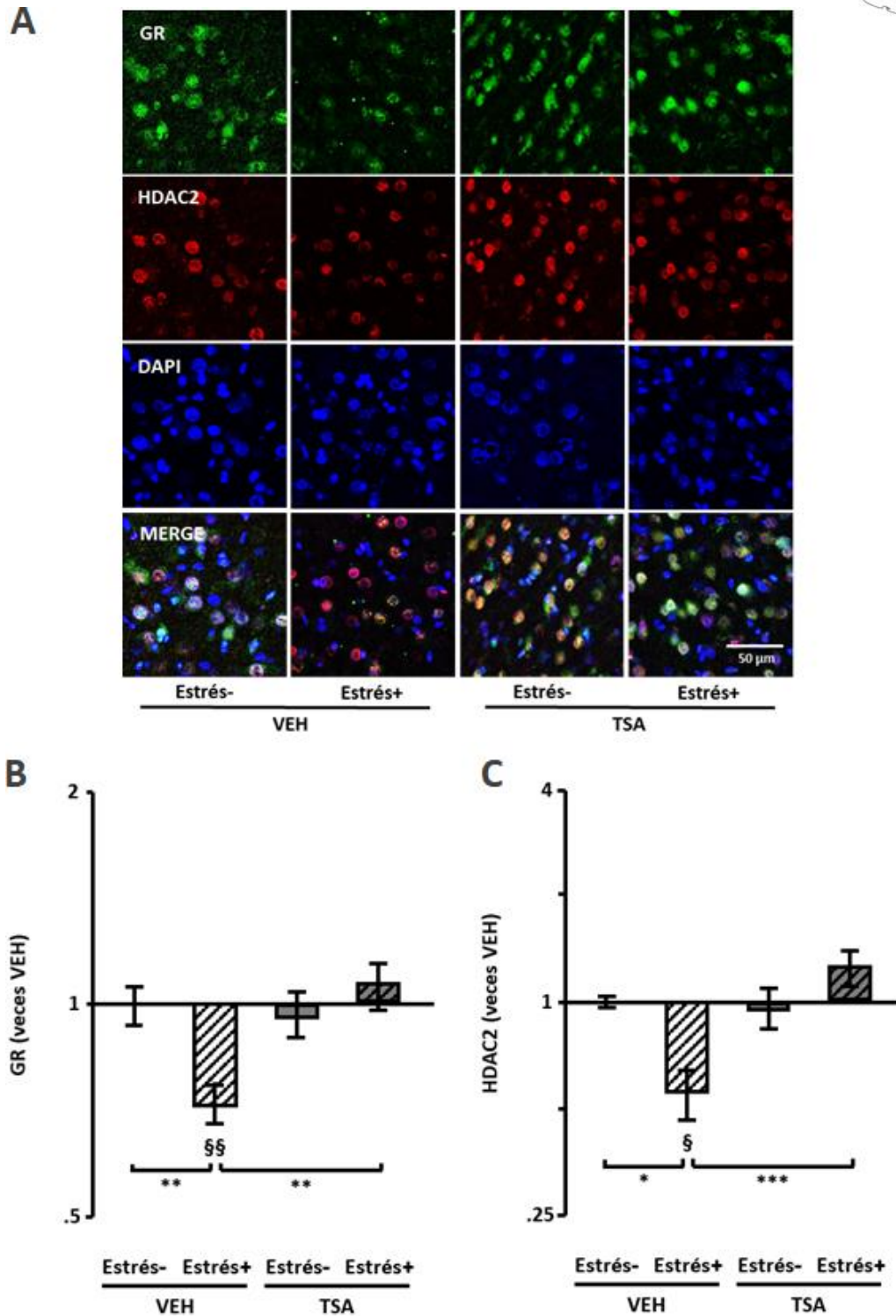
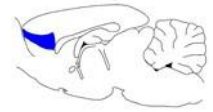


### 4.1.3. Expresión y co-localización de GR y HDAC2 en tejido cerebral

#### 4.1.3.1. Corteza prefrontal

Se encontraron diferencias significativas en la **expresión de GR** en células de la corteza prefrontal entre sujetos de los grupos experimentales y sujetos de línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 6.124$ ,  $p = 0.009$ ; Figura 18B). Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales estresados e inyectados con vehículo tuvieron una expresión de GR significativamente menor que los de la línea de base (Estrés+/VEH:  $t = 3.280$ ,  $p = 0.006$ ). Los sujetos de los demás grupos no mostraron diferencias significativas con los de la línea de base (Estrés-/TSA:  $t = 0.419$ ,  $p = 0.683$ ; Estrés+/TSA:  $t = 0.703$ ,  $p = 0.495$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 18B) mostraron un efecto significativo del tratamiento farmacológico sobre la expresión de GR en esta región del cerebro ( $F_{(1, 15)} = 6.353$ ,  $p = 0.027$ ) y la interacción entre el tratamiento farmacológico y estrés ( $F_{(1, 15)} = 9.691$ ,  $p = 0.009$ ), pero no del estrés solo ( $F_{(1, 15)} = 2.328$ ,  $p = 0.153$ ). Los análisis *post-hoc* confirmaron que el estrés redujo la expresión de receptores GR (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 3.280$ ,  $p = 0.007$ ), y la TSA previno tal efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 3.984$ ,  $p = 0.002$ ). No se observaron otras diferencias significativas (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.419$ ,  $p = 0.683$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 1.122$ ,  $p = 0.284$ ).

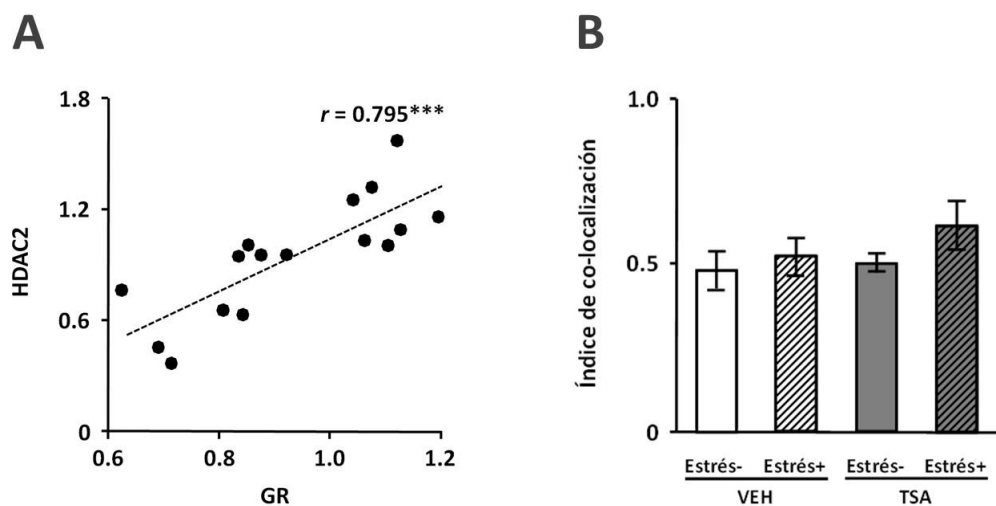
Por su parte, los tratamientos experimentales también modificaron significativamente la **expresión de HDAC2** en la corteza prefrontal con respecto a la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 7.294$ ,  $p = 0.005$ ; Figura 18C). Los análisis *post-hoc* mostraron que la expresión de HDAC2 en esta región fue menor en los animales sometidos a estrés (Estrés+/VEH:  $t = 3.003$ ,  $p = 0.017$ ). La expresión de HDAC2 en los demás grupos fue comparable a la línea de base (Estrés-/TSA:  $t = 0.222$ ,  $p = 0.828$ ; Estrés+/TSA:  $t = 1.593$ ,  $p = 0.137$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 18C) mostraron un efecto significativo del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 9.569$ ,  $p = 0.009$ ) y la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 11.607$ ,  $p = 0.005$ ) sobre la expresión de HDAC2; sin embargo, el factor estrés por sí mismo no tuvo efectos significativos ( $F_{(1, 15)} = 0.706$ ,  $p = 0.417$ ). Los análisis *post-hoc* confirmaron que los animales estresados e inyectados con vehículo tuvieron menor expresión de HDAC2 (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 3.003$ ,  $p = 0.011$ ), la administración de TSA previno este efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 4.596$ ,  $p < 0.001$ ).



**Figura 18.** La TSA previno que el estrés provocara un decremento en la expresión de GR y HDAC2 en la corteza prelámbica. A. Imágenes representativas. B. Nivel de expresión de GR. C. Nivel de expresión de HDAC2. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.222$ ,  $p = 0.828$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 1.815$ ,  $p = 0.095$ ).

La expresión de GR y de HDAC2 en la corteza prelámbica se **correlacionó** de forma positiva y altamente significativa ( $r_{(16)} = 0.795$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 19A). Sin embargo, si bien se encontró **co-localización** entre GR y HDAC2 en el núcleo de las células de las corteza de animales de todos los grupos experimentales (alrededor de 0.5), el análisis de varianza (ANOVA 2 vías), no mostró efectos del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 1.415$ ,  $p = 0.257$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.703$ ,  $p = 0.216$ ), o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.332$ ,  $p = 0.575$ ) sobre los niveles de co-localización (Figura 19B).



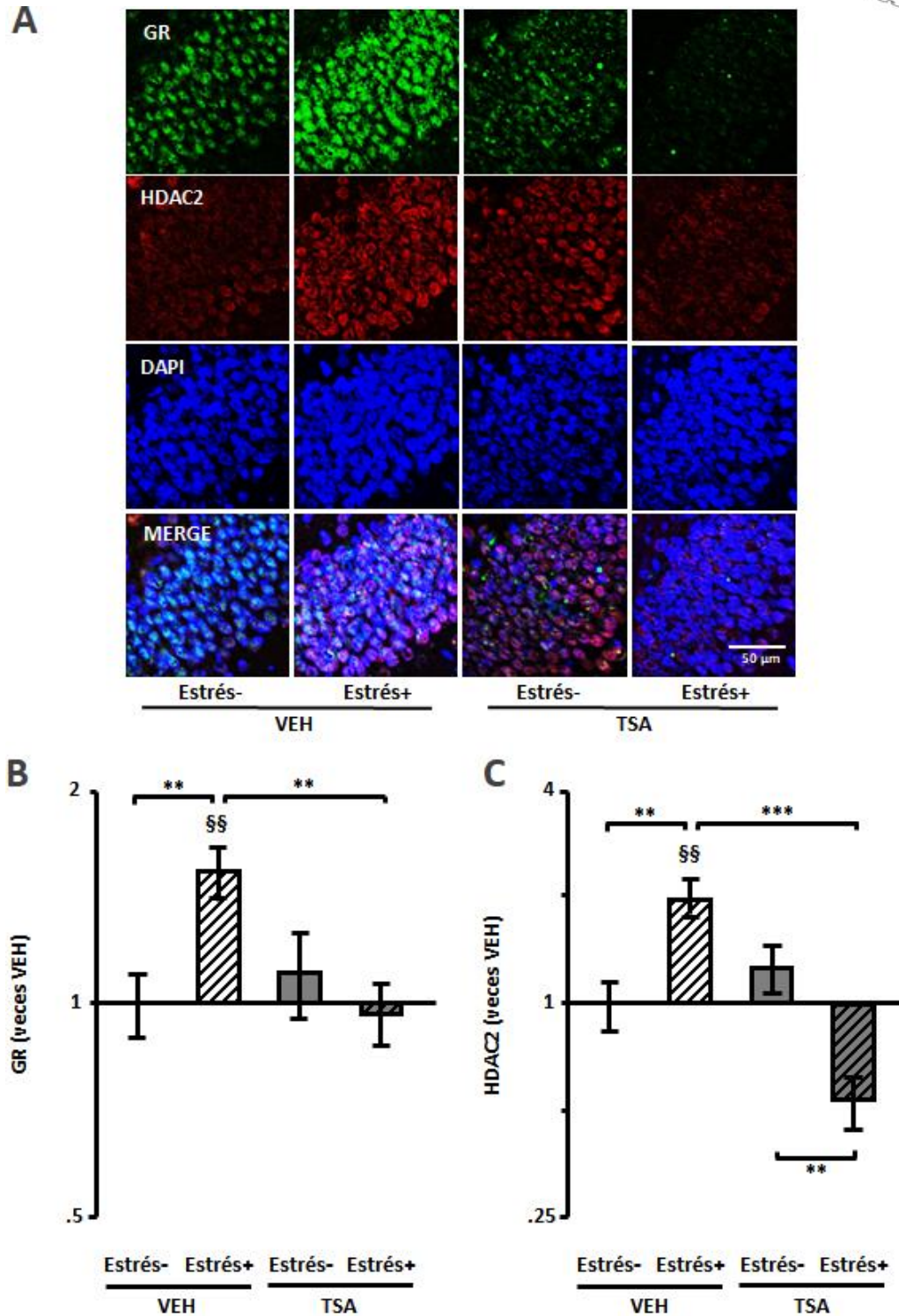
**Figura 19. La expresión de GR y HDAC2 correlacionó positivamente en la corteza prelámbica, pero los tratamientos no alteraron su co-localización en el núcleo.** A. Correlación entre niveles de expresión. B. Co-localización de proteínas en el núcleo. Abreviaturas: \* valores significativos; --- línea de tendencia.

#### 4.1.3.2. Hipocampo

La **expresión de GR** en células de la **fascia dentada** tuvo diferencias significativas entre los grupos experimentales y la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 4.606$ ,  $p = 0.023$ ; Figura 20B). Los análisis *post-hoc* mostraron que la expresión de GR fue significativamente mayor en los animales estresados inyectados con vehículo (Estrés+/VEH:  $t = 3.120$ ,  $p = 0.008$ ), mientras que los animales de los demás grupos no tuvieron cambios significativos con respecto a la línea de base (Estrés-/TSA:  $t = 0.643$ ,  $p = 0.532$ ; Estrés+/TSA:  $t = 0.151$ ,  $p = 0.883$ ). Las comparaciones entre grupos

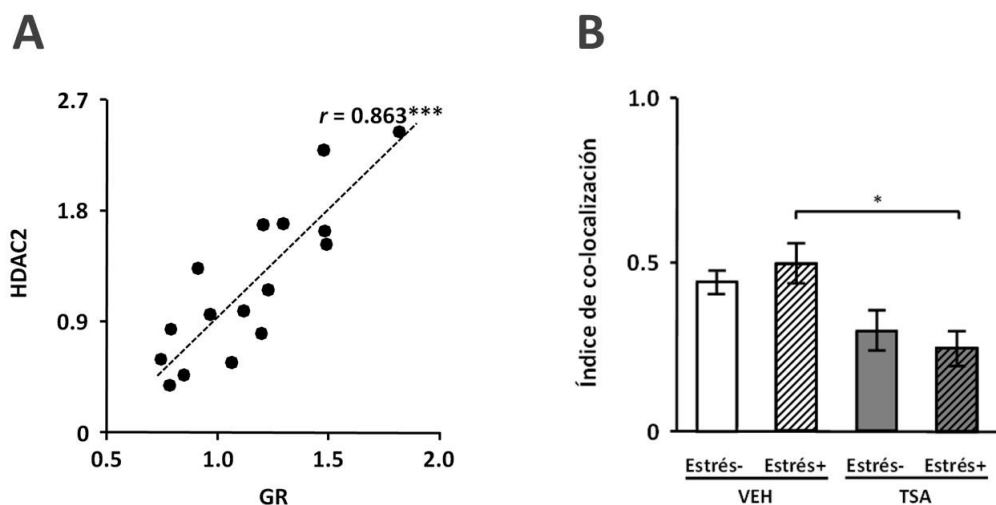
experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 20B) mostraron un efecto un efecto significativo de la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 7.661$ ,  $p = 0.017$ ) sobre la expresión de GR en esta región del cerebro, la cual no fue alterada por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 3.452$ ,  $p = 0.088$ ) o el estrés ( $F_{(1, 15)} = 2.705$ ,  $p = 0.126$ ) por sí mismos. Los análisis *post-hoc* confirmaron que el estrés indujo un incremento en la expresión de GR en los animales inyectados con vehículo (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 3.120$ ,  $p = 0.009$ ), y que la TSA previno tal efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 3.271$ ,  $p = 0.007$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.643$ ,  $p = 0.532$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.794$ ,  $p = 0.443$ ).

Por su parte, los tratamientos experimentales modificaron significativamente la **expresión de HDAC2**, en células de la de la **fascia dentada**, con respecto a la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 10.720$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 20C). Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales estresados e inyectados con vehículo sufrieron un incremento significativo de la expresión de HDAC2 en esta región (Estrés+/VEH:  $t = 3.790$ ,  $p = 0.002$ ), mientras que en los otros grupos no mostraron cambios significativos (Estrés-/TSA:  $t = 0.969$ ,  $p = 0.351$ ; Estrés+/TSA:  $t = 1.746$ ,  $p = 0.106$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 20C) mostraron un efecto significativo del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 10.426$ ,  $p = 0.007$ ) y la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 21.158$ ,  $p < 0.001$ ) sobre la expresión de HDAC2, pero no del factor estrés por sí mismo ( $F_{(1, 15)} = 0.577$ ,  $p = 0.462$ ). Los análisis *post-hoc* confirmaron que la expresión de HDAC2 en los animales estresados inyectados con vehículo fue significativamente mayor (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 3.790$ ,  $p = 0.003$ ) y que la administración de TSA previno este efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 5.536$ ,  $p < 0.001$ ). La TSA, además, tuvo efectos opuestos en animales estresados y no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 2.715$ ,  $p = 0.019$ ). En los animales no estresados la TSA no provocó diferencia en la expresión de HDAC2 (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.969$ ,  $p = 0.351$ ).



**Figura 20. La TSA evitó que el estrés agudo incrementara la expresión de GR y HDAC2 en la fascia dentada.** A. Imágenes representativas. B. Nivel de expresión de GR. C. Nivel de expresión de HDAC2. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

Se observó una **correlación** positiva y altamente significativa ( $r_{(16)} = 0.863$ ,  $p < 0.001$ ) entre la expresión de GR y HDAC2 en la fascia dentada (Figura 21A). GR y HDAC2 co-localizaron en los núcleos de las células de la fascia dentada (alrededor de 0.4) y el análisis de varianza (ANOVA 2 vías) mostró que el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 12.201$ ,  $p = 0.004$ ) afectó la **co-localización** de ambas proteínas en el núcleo (Figura 21B), pero el estrés solo ( $F_{(1, 15)} = 0.001$ ,  $p = 0.969$ ) y la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.665$ ,  $p = 0.431$ ) no tuvieron efectos significativos. Los análisis *post-hoc* evidenciaron que la co-localización de las proteínas en animales estresados la TSA fue significativamente menor que en animales estresados inyectados con vehículo (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 3.047$ ,  $p = 0.010$ ). No se observaron otras diferencias significativas (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 0.549$ ,  $p = 0.593$ ; Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.893$ ,  $p = 0.083$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.604$ ,  $p = 0.577$ ).

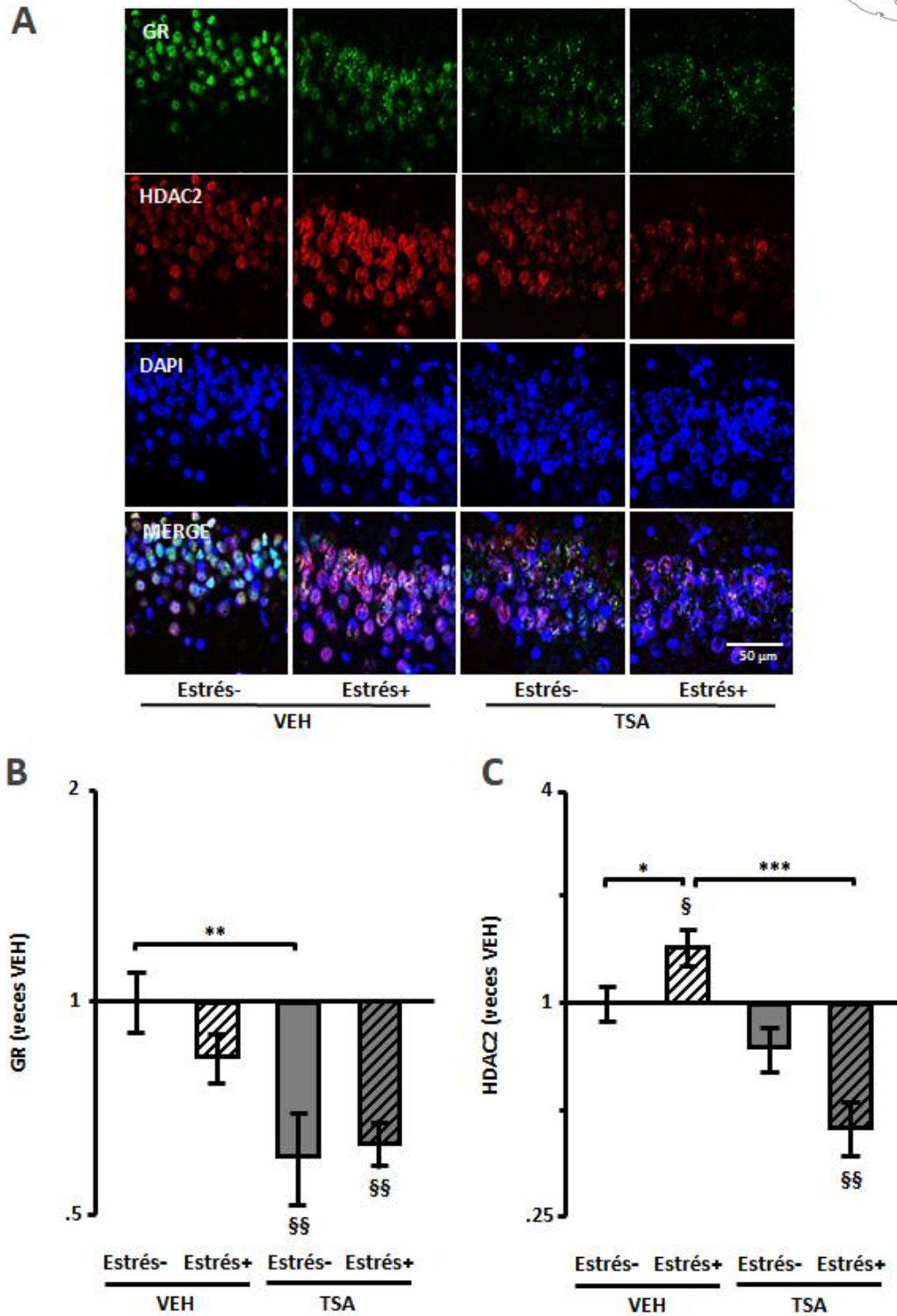


**Figura 21. La expresión de GR y HDAC2 correlacionó positivamente en la fascia dentada. La TSA redujo significativamente la co-localización de GR y HDAC2 en animales estresados.** A. Correlación entre niveles de expresión. B. Co-localización de proteínas en el núcleo. Abreviaturas: \* valores significativos; --- línea de tendencia.

La **expresión de GR** en células del **área CA1** fue significativamente diferente de la línea de base en los grupos experimentales (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 5.822$ ,  $p = 0.011$ ; Figura 22B). Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales tratados con TSA, tanto estresados (Estrés-/TSA:  $t = 3.397$ ,  $p = 0.005$ ), como no estresados (Estrés+/TSA:  $t = 3.617$ ,  $p = 0.003$ ) mostraron una reducción significativa en la expresión de GR. Los

animales estresados inyectados con vehículo no mostraron diferencias significativas con respecto a la línea de base (Estrés+/VEH:  $t = 1.512$ ,  $p = 0.156$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 22B) mostraron un efecto significativo del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 15.133$ ,  $p = 0.002$ ) sobre la expresión de GR en CA1, pero no del estrés por sí mismo ( $F_{(1, 15)} = 0.835$ ,  $p = 0.379$ ), ni de la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.500$ ,  $p = 0.244$ ). Los análisis *post-hoc* confirmaron que la TSA redujo la expresión de GR en animales no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 3.617$ ,  $p = 0.004$ ). No se encontraron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 1.885$ ,  $p = 0.084$ ; Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 1.512$ ,  $p = 0.156$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.220$ ,  $p = 0.829$ ).

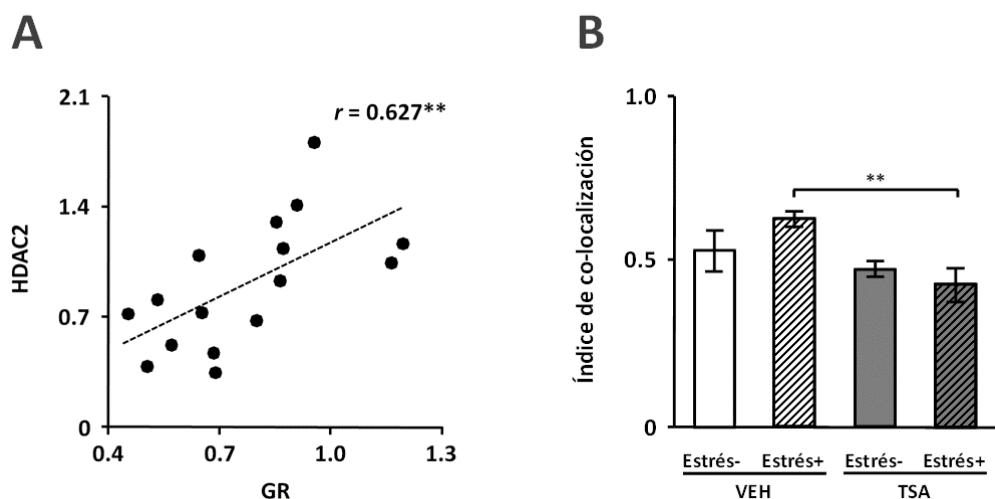
Por su parte, los tratamientos experimentales modificaron significativamente la **expresión de HDAC2** en células del **área CA1** con respecto a la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 12.132$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 22C). Los análisis *post-hoc* mostraron que la expresión de HDAC2 en CA1 fue significativamente mayor en los animales sometidos a estrés e inyectados con vehículo que en la línea base (Estrés+/VEH:  $t = 2.466$ ,  $p = 0.029$ ); en contraste, la expresión en animales estresados tratados con TSA fue significativamente menor que la basal (Estrés+/TSA:  $t = 3.307$ ,  $p = 0.006$ ). Los animales no estresados tratados con TSA mostraron niveles de expresión comparables con el nivel basal (Estrés-/TSA:  $t = 1.655$ ,  $p = 0.124$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 22C) mostraron un efecto significativo del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 27.586$ ,  $p < 0.001$ ) y de la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 8.480$ ,  $p = 0.013$ ) sobre la expresión de HDAC2 en esta región, pero no del estrés por sí mismo ( $F_{(1, 15)} = 0.332$ ,  $p = 0.575$ ). Los análisis *post-hoc* confirmaron que el estrés provocó un incremento significativo de la expresión de HDAC2 en animales inyectados con vehículo (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 2.466$ ,  $p = 0.030$ ), y que la TSA revirtió tal efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 5.773$ ,  $p < 0.001$ ). No se encontraron otras diferencias entre grupos (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 1.652$ ,  $p = 0.124$ ; Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.655$ ,  $p = 0.124$ ).



**Figura 22.** La TSA redujo la expresión de GR pero evitó que el estrés indujera la reducción de HDAC2 en CA1. A. Imágenes representativas. B. Nivel de expresión de GR. C. Nivel de expresión de HDAC2. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.



Se observó una **correlación** positiva y significativa ( $r_{(16)} = 0.627$ ,  $p = 0.009$ ) entre la expresión de GR y HDAC2 en la región CA1 (Figura 23A). GR y HDAC2 co-localizaron en el núcleo de células de CA1 (alrededor de 0.5) y el análisis de varianza (ANOVA 2 vías) mostró que el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 8.780$ ,  $p = 0.012$ ) afectó la **co-localización** de GR y HDAC2 en los núcleos de las células de esta región (Figura 23B). Ni el estrés por sí mismo ( $F_{(1, 15)} = 0.386$ ,  $p = 0.546$ ), ni la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 2.959$ ,  $p = 0.111$ ) modificaron significativamente la co-localización de estas proteínas. Los análisis *post-hoc* mostraron que en animales estresados la TSA redujo la co-localización entre GR y HDAC2 (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 3.311$ ,  $p = 0.006$ ). No se observaron otras diferencias significativas (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 1.656$ ,  $p = 0.124$ ; Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.879$ ,  $p = 0.397$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.777$ ,  $p = 0.452$ ).



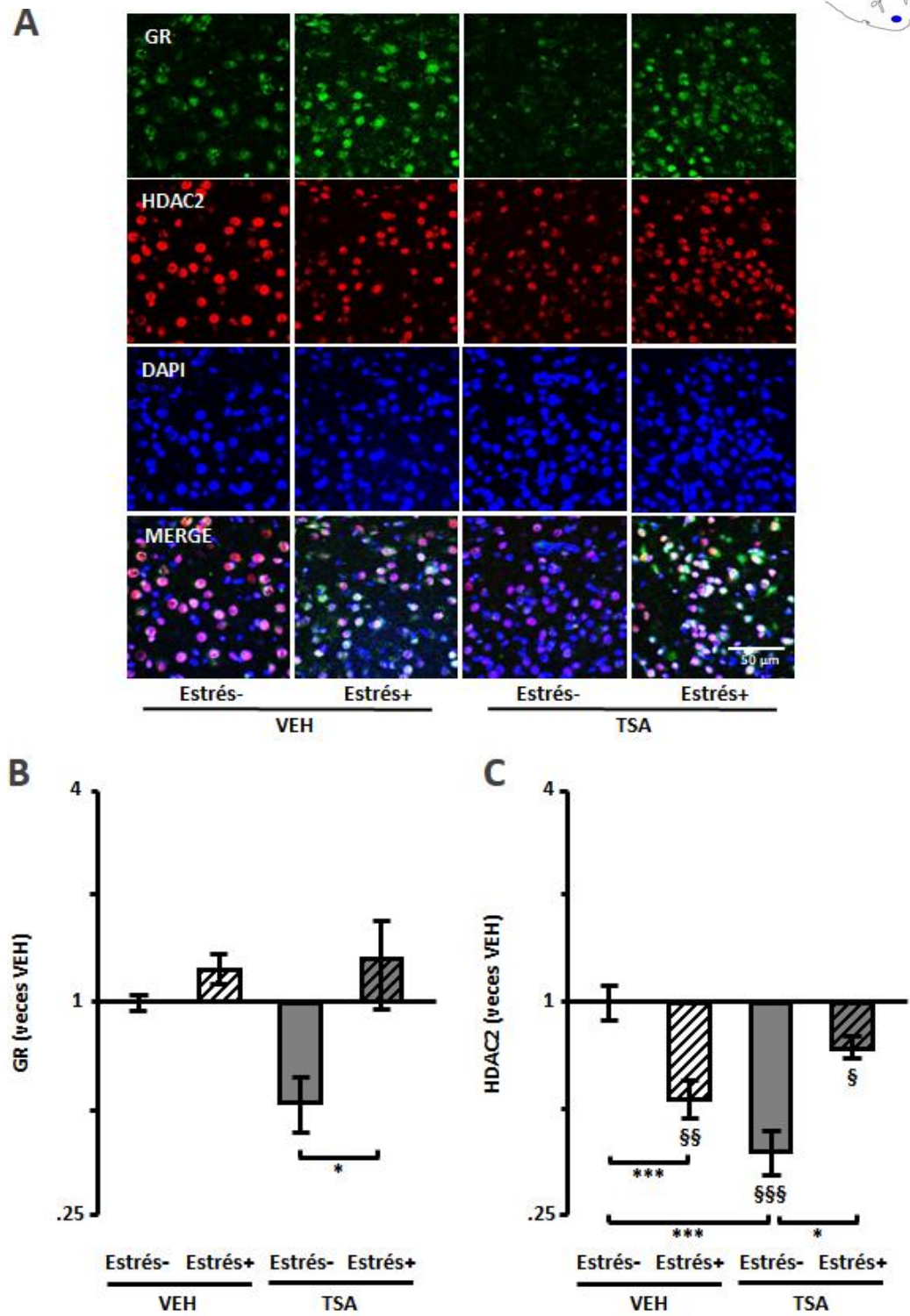
**Figura 23. La expresión de GR y de HDAC2 correlacionó positivamente en CA1, y la TSA redujo su co-localización en animales estresados.** A. Correlación entre niveles de expresión. B. Co-localización de proteínas en el núcleo. Abreviaturas: \* valores significativos; --- línea de tendencia.

#### 4.1.3.3. Amígdala

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales y la línea de base para la **expresión de GR** en células del **núcleo basolateral** de la amígdala (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 3.225$ ,  $p = 0.061$ ; Figura 24B). Sin embargo, las

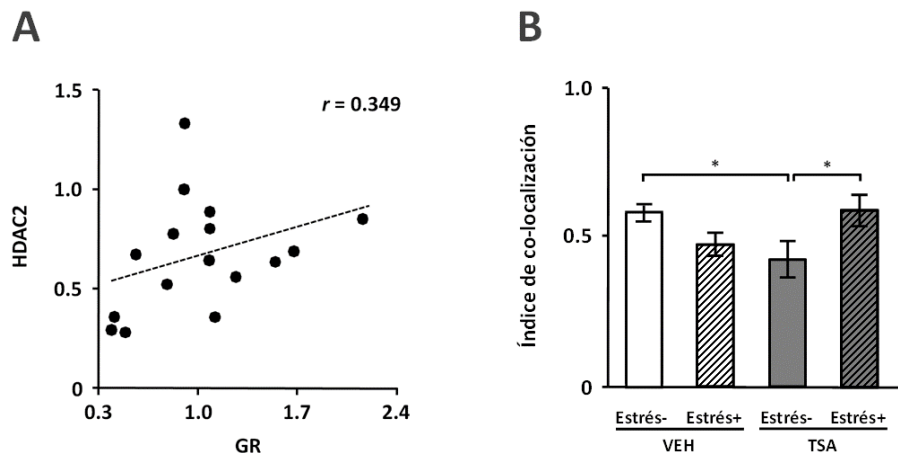
comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 24B) mostraron un efecto significativo del estrés ( $F_{(1, 15)} = 6.711, p = 0.024$ ) sobre la expresión de GR en la amígdala basolateral. Ni el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 1.153, p = 0.304$ ), ni la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.811, p = 0.203$ ) tuvieron efectos significativos. Los análisis *post-hoc* mostraron que la reducción de la expresión de GR provocada por la TSA en animales no estresados no ocurrió en animales estresados (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 2.783, p = 0.017$ ). No se encontraron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 0.880, p = 0.396$ ; Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 0.192, p = 0.851$ ; Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.711, p = 0.113$ ).

Por su parte, los tratamientos experimentales modificaron significativamente la **expresión de HDAC2** en células de la **amígdala basolateral** con respecto a la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 13.094, p < 0.001$ ; Figura 24C). Los análisis *post-hoc* mostraron una reducción significativa de la expresión de HDAC2 en esta región en animales sometidos a estrés e inyectados con vehículo (Estrés+/VEH:  $t = 4.262, p = 0.001$ ), efecto que también se observó en animales inyectados con TSA, tanto sin estrés (Estrés-/TSA:  $t = 5.966, p < 0.001$ ), como con estrés (Estrés+/TSA:  $t = 2.408, p = 0.033$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 24C) mostraron un efecto significativo del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 8.457, p = 0.013$ ) y de la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 30.578, p < 0.001$ ) sobre la expresión de HDAC2 en esta región; el estrés por sí mismo no tuvo efecto ( $F_{(1, 15)} = 0.247, p = 0.628$ ). Los análisis *post-hoc* confirmaron que el estrés indujo una disminución significativa de la expresión de HDAC2 (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 4.262, p < 0.001$ ), pero la TSA no previno tal efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 1.854, p = 0.089$ ). La TSA provocó una reducción significativa de los niveles de expresión de HDAC2 en animales sin estrés (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 5.966, p < 0.001$ ), disminución que fue significativamente menos profunda en animales estresados (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 3.559, p = 0.004$ ).



**Figura 24. El estrés y la TSA redujeron la expresión de HDAC2 en la amígdala; sin embargo, esta reducción fue menor en animales estresados inyectados con TSA.** A. Imágenes representativas. B. Nivel de expresión de GR. C. Nivel de expresión de HDAC2. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

No se encontró **correlación** ( $r_{(16)} = 0.349$ ,  $p = 0.186$ ) entre la expresión de GR y HDAC2 en células de la amígdala basolateral (Figura 25A). Las proteínas **co-localizaron** en los núcleos de las células de la **amígdala basolateral** (+/- 0.5) y el análisis de varianza (ANOVA 2 vías) mostró que la interacción entre el tratamiento farmacológico y el estrés afectó la co-localización del receptor de GR y HDAC2 (Figura 25B) en los núcleos de las células de la amígdala basolateral ( $F_{(1, 15)} = 6.672$ ,  $p = 0.024$ ). Ni el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.253$ ,  $p = 0.624$ ) ni el estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.427$ ,  $p = 0.526$ ) por sí mismo tuvieron efectos significativos sobre la co-localización. Los análisis *post-hoc* mostraron que la TSA provocó una reducción de la co-localización de GR y HDAC2 en animales no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 2.182$ ,  $p = 0.049$ ) y que en los animales tratados con TSA que habían sido estresados no ocurrió tal reducción (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 2.289$ ,  $p = 0.041$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 1.364$ ,  $p = 0.198$ ; Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 1.471$ ,  $p = 0.167$ ).

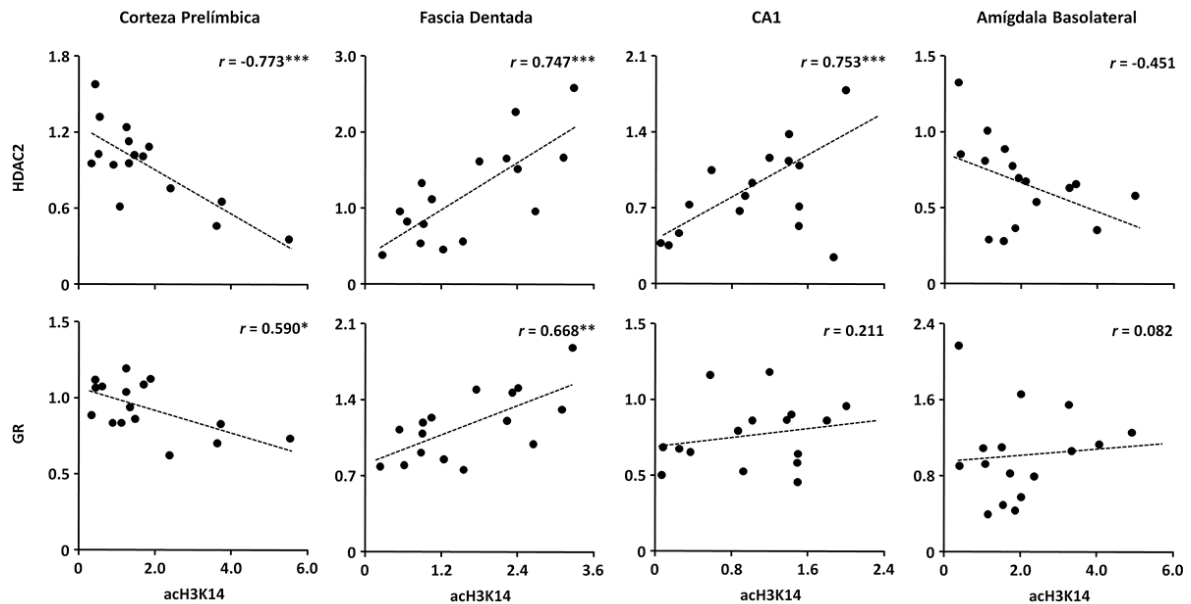


**Figura 25. La expresión de GR y HDAC2 no correlacionó en la amígdala; sin embargo, la TSA redujo su co-localización en animales no estresados.** A. Correlación entre niveles de expresión. B. Co-localización de proteínas en el núcleo. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; --- línea de tendencia.

#### 4.1.3.4. Correlaciones entre los niveles de expresión de acH3K14, HDAC2 y GR.

Se encontraron **correlaciones** significativas entre los niveles de expresión de **acH3K14** y **HDAC2** (Figura 26, fila superior) en corteza prelímbica ( $r_{(16)} = -0.773$ ,  $p < 0.001$ ) e hipocampo (fascia dentada:  $r_{(16)} = 0.753$ ,  $p < 0.001$ ; CA1:  $r_{(16)} = 0.747$ ,  $p < 0.001$ ), pero no en amígdala basolateral ( $r_{(16)} = -0.451$ ,  $p = 0.079$ ).

Se encontraron **correlaciones** significativas entre los niveles de expresión de **acH3K14** y **GR** (Figura 26, fila inferior) en corteza ( $r_{(16)} = -0.590$ ,  $p = 0.016$ ) y fascia dentada ( $r_{(16)} = 0.668$ ,  $p = 0.04$ ), pero no en CA1 ( $r_{(16)} = 0.211$ ,  $p = 0.433$ ), ni en amígdala basolateral ( $r_{(16)} = 0.082$ ,  $p = 0.762$ ).



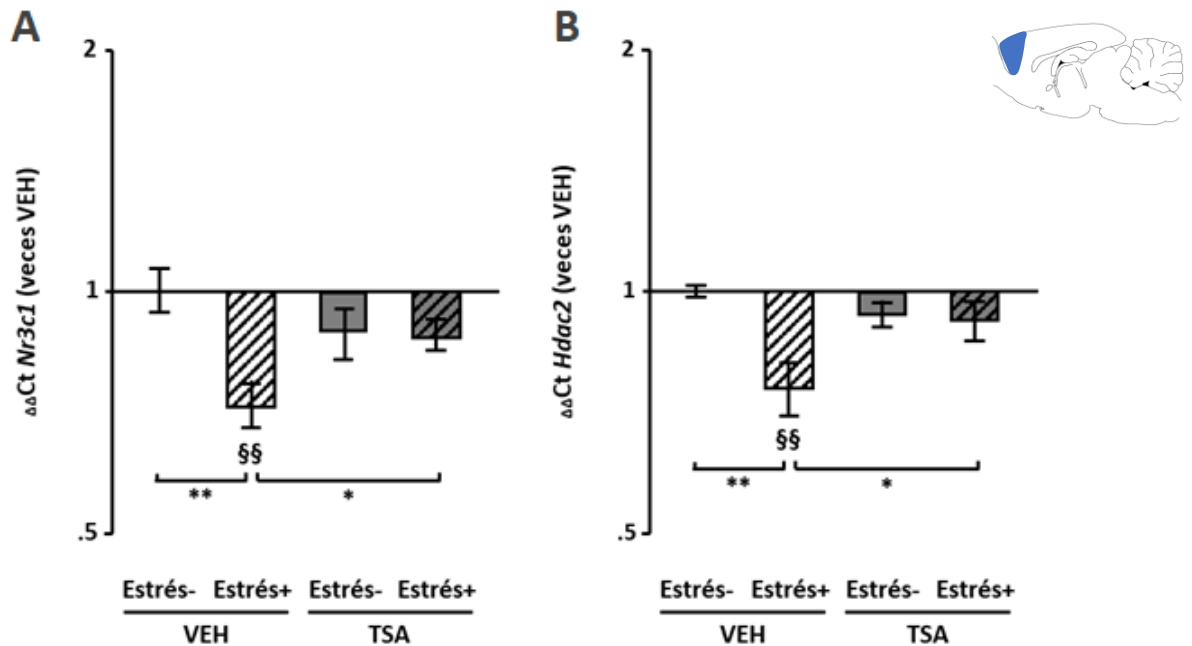
**Figura 26. Correlaciones entre el nivel de acH3K14 y la expresión de HDAC2 o GR en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala.** Abreviaturas: \* valores significativos; --- línea de tendencia.

#### 4.1.4. Expresión génica en tejido cerebral

##### 4.1.4.1. Corteza prefrontal

La expresión del gen **Nr3c1** (GR) en la corteza prefrontal fue significativamente diferente de la línea de base en los grupos experimentales (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 4.984$ ,  $p = 0.018$ ; Figura 27A). Los análisis *post-hoc* mostraron que sólo los animales estresados inyectados con vehículo expresaron el gen significativamente por debajo de la línea de base (Estrés+/VEH:  $t = 3.840$ ,  $p = 0.002$ ), mientras que la transcripción en los animales de los otros grupos no fue significativamente diferente de la basal (Estrés-/TSA:  $t = 1.570$ ,  $p = 0.142$ ; Estrés+/TSA:  $t = 1.634$ ,  $p = 0.128$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 27A) mostraron un efecto significativo del estrés ( $F_{(1, 15)} = 7.619$ ,  $p = 0.017$ ) y de la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 7.132$ ,  $p = 0.020$ ), pero no del tratamiento farmacológico por sí mismo ( $F_{(1, 15)} = 0.202$ ,  $p = 0.661$ ), sobre la expresión de **Nr3c1** en corteza

prefrontal. Los análisis *post-hoc* confirmaron que el estrés indujo un decremento en la transcripción de *Nr3c1* en los animales inyectados con vehículo (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 3.840$ ,  $p = 0.002$ ) y que la TSA previno este efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.206$ ,  $p = 0.048$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.570$ ,  $p = 0.142$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.063$ ,  $p = 0.951$ ).



**Figura 27. La TSA evitó que el estrés provocara disminución de la transcripción de *Nr3c1* y *Hdac2* en la corteza prefrontal.** A. Expresión relativa de *Nr3c1*. B. Expresión relativa de *Hdac2*. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

Por su parte, la expresión del gen ***Hdac2*** (HDAC2) en la corteza prefrontal fue significativamente distinta de la línea de base en los grupos experimentales (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 6.005$ ,  $p = 0.010$ ; Figura 27B). Los análisis *post-hoc* mostraron que la transcripción del gen en los animales estresados inyectados con vehículo fue significativamente menor que la basal (Estrés+/VEH:  $t = 4.071$ ,  $p = 0.001$ ), mientras que la transcripción en los animales de los otros grupos no fue significativamente diferente de la basal (Estrés-/TSA:  $t = 1.097$ ,  $p = 0.294$ ; Estrés+/TSA:  $t = 1.299$ ,  $p = 0.218$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 27B) mostraron un efecto significativo del estrés ( $F_{(1, 15)} = 9.129$ ,  $p = 0.011$ ) y de la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 7.484$ ,  $p = 0.018$ ), pero no del tratamiento

farmacológico por sí mismo ( $F_{(1, 15)} = 1.402, p = 0.259$ ), sobre la expresión de *Hdac2* en corteza prefrontal. Los análisis *post-hoc* confirmaron que el estrés indujo un incremento en la transcripción de *Hdac2* en los animales inyectados con vehículo (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 4.071, p = 0.002$ ) y que la TSA previno este efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.772, p = 0.017$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.097, p = 0.294$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.202, p = 0.843$ ).

La expresión de los genes *Nr3c1* y *Hdac2* en la corteza prefrontal **correlacionó** de forma positiva y significativa ( $r_{(16)} = 0.639, p = 0.007$ ).

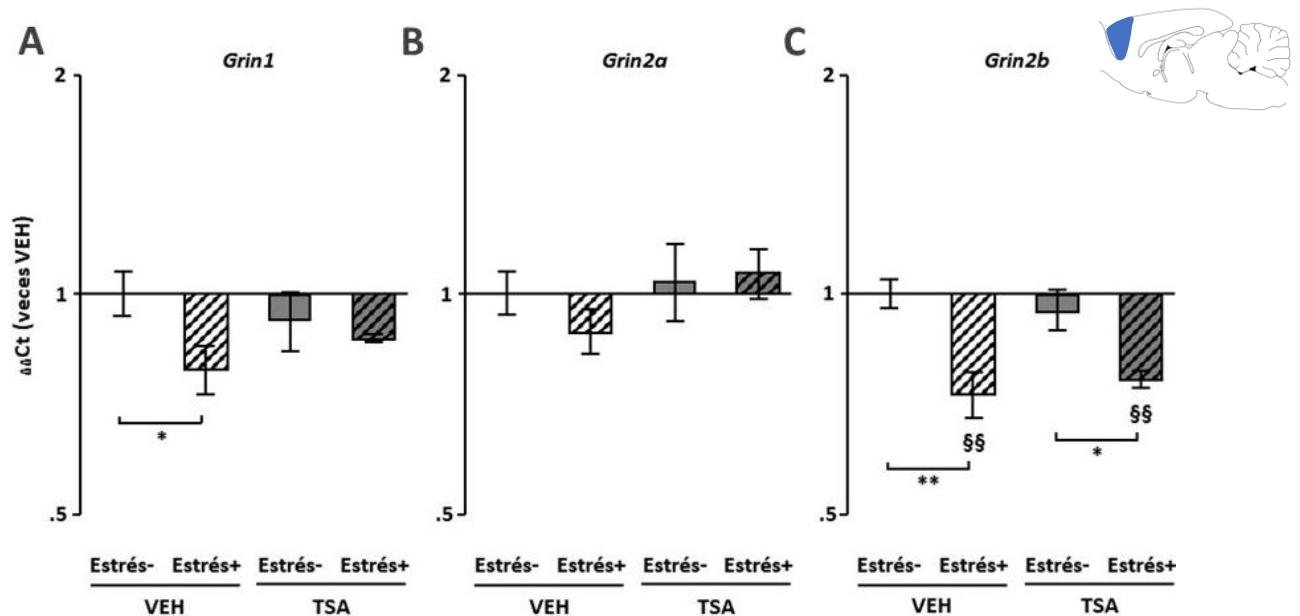
Se analizó el efecto de los tratamientos experimentales sobre la transcripción de mRNA codificante para las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor **NMDA** como marcadores de plasticidad sináptica.

No hubo diferencias significativas en la expresión del gen ***Grin1* (NR1)** en la corteza prefrontal entre los grupos experimentales y la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 2.134, p = 0.149$ ; Figura 28A). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 28A) mostraron un efecto significativo del estrés ( $F_{(1, 15)} = 4.790, p = 0.049$ ), pero no del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.010, p = 0.921$ ), ni la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.602, p = 0.230$ ), sobre la expresión de *Grin1* en la corteza prefrontal. Los análisis *post-hoc* confirmaron que el estrés redujo la transcripción de *Grin1* en los animales inyectados con vehículo (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 2.443, p = 0.031$ ); sin embargo, la TSA no previno este efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 0.823, p = 0.427$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.967, p = 0.353$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.652, p = 0.526$ ).

Por su parte, no hubo diferencias significativas en la expresión de ***Grin2a* (NR2A)** en la corteza prefrontal entre los grupos experimentales y la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 0.788, p = 0.523$ ; Figura 28B). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 28B) no mostraron efectos del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 1.413, p = 0.258$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.262, p = 0.618$ ) o su interacción ( $F_{(1, 15)} = 0.690, p = 0.422$ ) sobre la expresión de *Grin2a* en corteza.

En contraste, se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen ***Grin2b* (NR2B)** en corteza prefrontal entre los grupos experimentales y la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 8.544, p = 0.003$ ; Figura 28C). Los análisis *post-hoc*

mostraron que la transcripción de *Grin2b* en los animales estresados, inyectados con vehículo (Estrés+/VEH:  $t = 4.195$ ,  $p = 0.001$ ), o con TSA (Estrés+/TSA:  $t = 3.639$ ,  $p = 0.003$ ), fue significativamente menor que la basal; los animales sin estrés inyectados con TSA no mostraron cambios con relación al nivel basal (Estrés-/TSA:  $t = 0.810$ ,  $p = 0.434$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 28C) mostraron un efecto significativo del estrés ( $F_{(1, 15)} = 24.668$ ,  $p < 0.001$ ), pero no del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.032$ ,  $p = 0.861$ ) o de la interacción tratamiento farmacológico-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.932$ ,  $p = 0.353$ ), sobre la expresión de *Grin2b* en corteza prefrontal. Los análisis *post-hoc* confirmaron que el estrés indujo una reducción significativa de la transcripción de *Grin2b* en los animales inyectados con vehículo (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 4.195$ ,  $p = 0.001$ ), pero que la TSA no previno este efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 0.556$ ,  $p = 0.589$ ). El efecto de la TSA fue opuesto según los animales hubieran sido sometidos o no a estrés (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 2.829$ ,  $p = 0.015$ ), mientras que la TSA no tuvo efectos en animales sin estrés (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.810$ ,  $p = 0.434$ ).



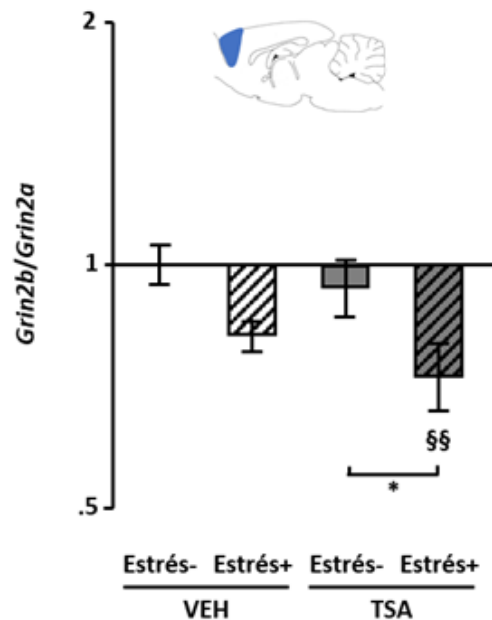
**Figura 28. La TSA no evitó que el estrés indujera la reducción de la transcripción de *Grin1* y *Grin2b* en la corteza prefrontal.** A. Expresión relativa de *Grin1*. B. Expresión relativa de *Grin2a*. C. Expresión relativa de *Grin2b*. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

La expresión en la corteza prefrontal de *Grin1* y *Grin2a* tuvo una **correlación** positiva y significativa ( $r_{(16)} = 0.716$ ,  $p = 0.001$ ), al igual que la expresión de *Grin1* y



*Grin2b* ( $r_{(16)} = 0.829$ ,  $p < 0.001$ ). No obstante, la transcripción de los genes *Grin2a* y *Grin2b* no mostró una correlación significativa ( $r_{(16)} = 0.457$ ,  $p = 0.075$ ).

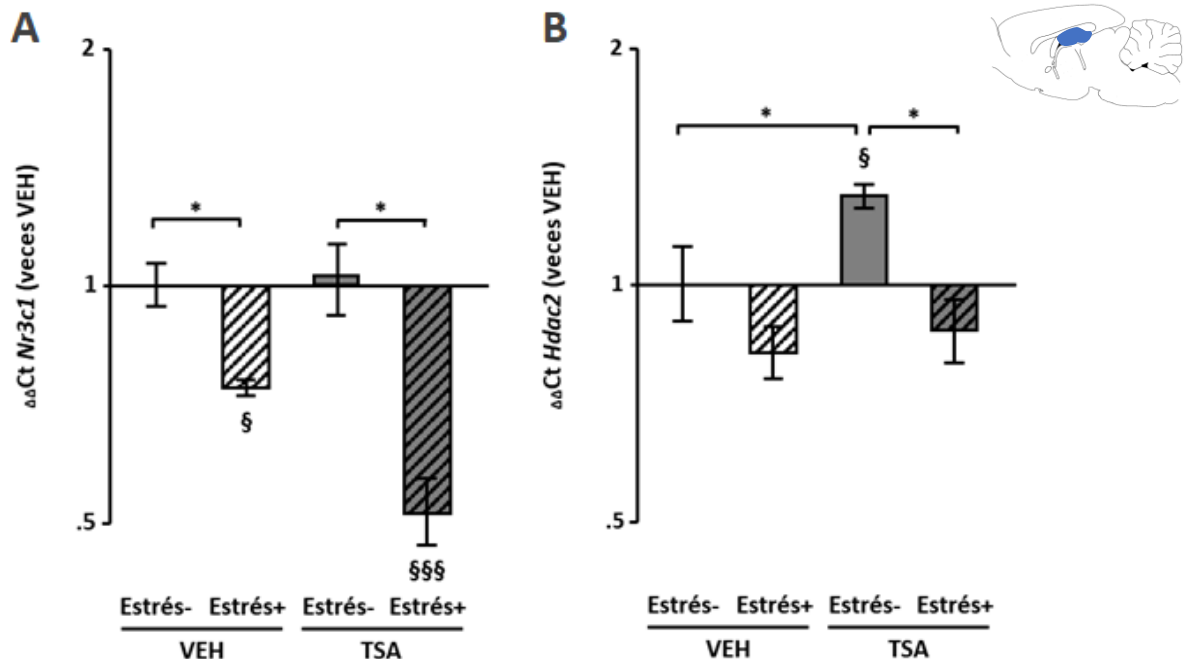
La razón entre la expresión de *Grin2b* y *Grin2a* (*Grin2b/Grin2a*) fue significativamente distinta entre los grupos experimentales y la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 3.926$ ,  $p = 0.036$ ; Figura 29). Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales estresados inyectados con TSA tuvieron una razón *Grin2b/Grin2a* significativamente menor que la basal (Estrés+/TSA:  $t = 3.143$ ,  $p = 0.008$ ), pero los demás grupos no tuvieron una razón significativamente distinta de la basal (Estrés+/VEH:  $t = 2.136$ ,  $p = 0.054$ ; Estrés-/TSA:  $t = 0.767$ ,  $p = 0.458$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 29) mostraron un efectos significativo del estrés ( $F_{(1, 15)} = 10.177$ ,  $p = 0.008$ ), pero no del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 1.573$ ,  $p = 0.234$ ) o la interacción tratamiento farmacológico-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.028$ ,  $p = 0.868$ ), sobre la razón *Grin2b/Grin2a* en corteza prefrontal. Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés profundizó la reducción de la razón *Grin2b/Grin2a* en animales que recibieron TSA (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 2.375$ ,  $p = 0.035$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 2.136$ ,  $p = 0.054$ ; Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 1.007$ ,  $p = 0.334$ ; Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.767$ ,  $p = 0.458$ ).



**Figura 29.** La inducción de estrés seguida de la inyección de TSA redujo a largo plazo la razón *Grin2b/Grin2a* en la corteza prefrontal. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos. § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

#### 4.1.4.2. Hipocampo

Se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen *Nr3c1* en el hipocampo entre los grupos experimentales y la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 10.983$ ,  $p < 0.001$  Figura 30A). Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales estresados inyectados con vehículo (Estrés+/VEH:  $t = 2.601$ ,  $p = 0.023$ ) o TSA (Estrés+/TSA:  $t = 4.776$ ,  $p < 0.001$ ) tuvieron una transcripción de *Nr3c1* significativamente menor que la basal; la transcripción en los animales sin estrés inyectados con TSA no fue significativamente distinta de la basal (Estrés-/TSA:  $t = 0.133$ ,  $p = 0.896$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 30A) mostraron un efecto significativo del estrés ( $F_{(1, 15)} = 28.201$ ,  $p < 0.001$ ), pero no del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 2.083$ ,  $p = 0.175$ ), ni de la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 2.664$ ,  $p = 0.129$ ), sobre la expresión de *Nr3c1* en el hipocampo. Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés indujo un decremento en la transcripción de *Nr3c1* en los animales inyectados con vehículo (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 2.601$ ,  $p = 0.023$ ) y que la TSA profundizó dicho decremento (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 4.909$ ,  $p < 0.001$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.133$ ,  $p = 0.896$ ; Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.175$ ,  $p = 0.050$ ).



**Figura 30. El estrés redujo la transcripción de *Nr3c1* en el hipocampo. La TSA incrementó los niveles de transcripción de *Hdac2* en animales no estresados.** A. Expresión relativa de *Nr3c1*. B. Expresión relativa de *Hdac2*. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

Por su parte, también se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen **Hdac2** en el hipocampo entre los grupos experimentales y la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 6.772$ ,  $p = 0.006$ ; Figura 30B). Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales sin estrés inyectados con TSA (Estrés-/TSA:  $t = 2.387$ ,  $p = 0.034$ ) tuvieron una transcripción del gen significativamente mayor que la basal, mientras que la de los animales de los otros grupos no fue significativamente diferente de la basal (Estrés+/VEH:  $t = 1.723$ ,  $p = 0.110$ ; Estrés+/TSA:  $t = 1.256$ ,  $p = 0.233$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 30B) mostraron un efecto significativo del estrés ( $F_{(1, 15)} = 14.401$ ,  $p = 0.003$ ), pero no del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 4.073$ ,  $p = 0.066$ ), ni la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.843$ ,  $p = 0.020$ ), sobre la expresión de *Hdac2* en el hipocampo. Los análisis *post-hoc* mostraron que la TSA provocó aumento de la transcripción de *Hdac2* en animales no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 2.387$ ,  $p = 0.034$ ), pero indujo una disminución en animales estresados (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 3.643$ ,  $p = 0.003$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 1.723$ ,  $p = 0.110$ ; Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 0.467$ ,  $p = 0.649$ ). Se encontró una **correlación** positiva y significativa en la expresión de los genes *Nr3c1* y *Hdac2* en el hipocampo ( $r_{(16)} = 0.573$ ,  $p = 0.020$ ).

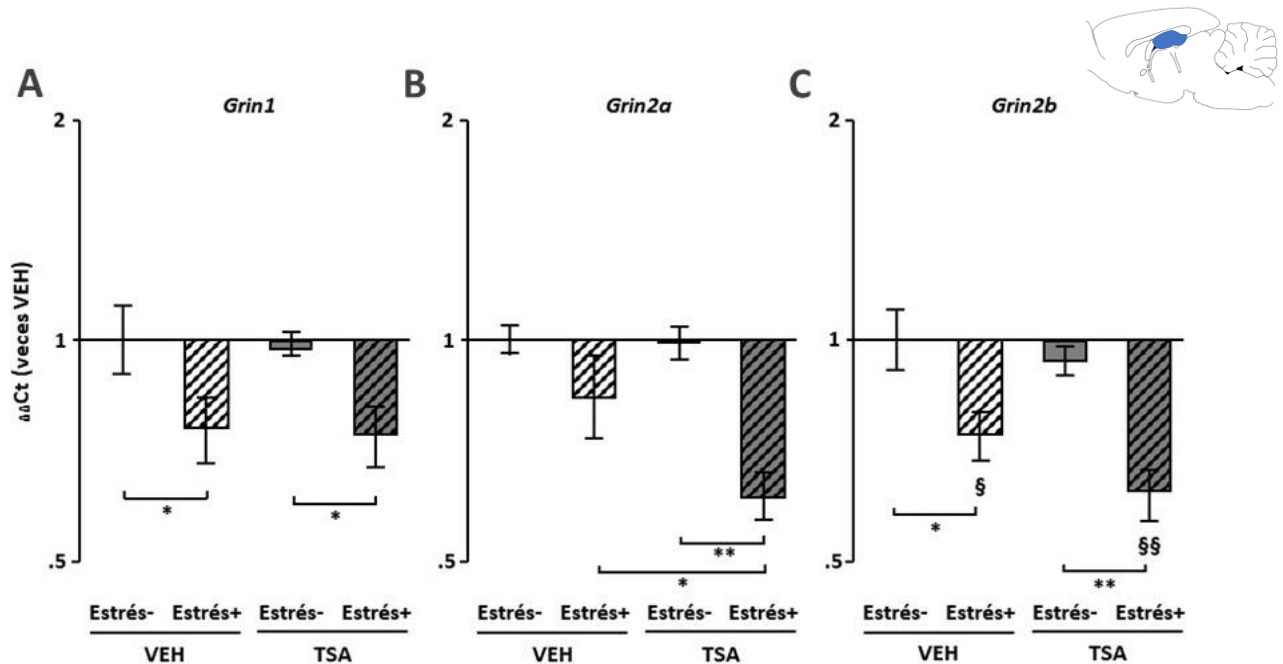
Al igual que en la corteza, se analizó el efecto de los tratamientos experimentales sobre la transcripción de mRNA codificante para las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor **NMDA** como marcadores de plasticidad sináptica en el hipocampo.

No hubo diferencias significativas en la expresión del gen **Grin1** en la corteza prefrontal entre los grupos experimentales y la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 3.566$ ,  $p = 0.047$ ; Figura 31A). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 31A) mostraron un efecto significativo del estrés ( $F_{(1, 15)} = 10.589$ ,  $p = 0.007$ ), pero no del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.090$ ,  $p = 0.769$ ), ni la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.018$ ,  $p = 0.893$ ) sobre la expresión de *Grin1* en el hipocampo. Los análisis *post-hoc* confirmaron que el estrés redujo la transcripción de *Grin1* en los animales inyectados con vehículo (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 2.398$ ,  $p = 0.034$ ); sin embargo, la TSA no previno este efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 0.116$ ,  $p = 0.910$ ). No hubo efecto de la TSA en animales sin estrés (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.310$ ,  $p = 0.762$ ), por lo que el

efecto del fármaco fue distinto en animales estresados y no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 2.204$ ,  $p = 0.048$ ).

Por su parte, no hubo diferencias significativas en la expresión del gen **Grin2a** en la corteza prefrontal entre los grupos experimentales y la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 7.071$ ,  $p = 0.005$ ; Figura 31B). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 31B) mostraron un efecto significativo del estrés ( $F_{(1, 15)} = 16.334$ ,  $p = 0.002$ ), pero no del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 2.679$ ,  $p = 0.128$ ), o la interacción con el estrés-fármaco ( $F_{(1, 15)} = 2.199$ ,  $p = 0.164$ ) sobre la expresión de *Grin2a* en el hipocampo. Los análisis *post-hoc* mostraron que la TSA redujo la expresión del gen en animales estresados (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.206$ ,  $p = 0.048$ ) pero no en animales no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 3.906$ ,  $p = 0.002$ ); no se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 1.809$ ,  $p = 0.096$ ; Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.109$ ,  $p = 0.915$ ).

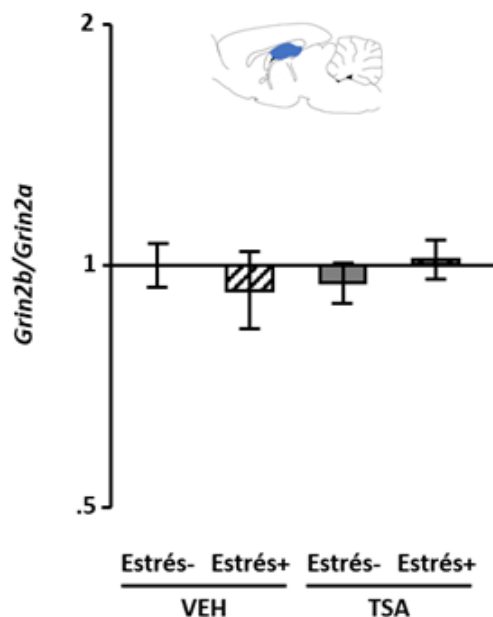
Por su parte, se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen **Grin2b** en la corteza prefrontal entre los grupos experimentales y la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 7.529$ ,  $p = 0.004$ ; Figura 31C). Los análisis *post-hoc* mostraron que la transcripción del gen se redujo en los animales estresados, inyectados con vehículo (Estrés+/VEH:  $t = 2.930$ ,  $p = 0.012$ ) o TSA (Estrés+/TSA:  $t = 4.252$ ,  $p = 0.001$ ), mientras que la transcripción del gen en animales sin estrés inyectados con TSA no fue significativamente distinta de la basal (Estrés-/TSA:  $t = 0.836$ ,  $p = 0.420$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 31C) mostraron un efecto significativo del factor estrés ( $F_{(1, 15)} = 20.143$ ,  $p < 0.001$ ) pero no del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 2.328$ ,  $p = 0.153$ ) o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.118$ ,  $p = 0.737$ ) sobre la expresión de *Grin2b* en el hipocampo. Los análisis *post-hoc* confirmaron que el estrés redujo la transcripción de *Grin2b* en los animales inyectados con vehículo (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 2.930$ ,  $p = 0.013$ ); sin embargo, la TSA no previno este efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 1.322$ ,  $p = 0.211$ ). La TSA en animales sin estrés no tuvo efectos significativos (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.836$ ,  $p = 0.420$ ), por lo que el efecto de la TSA fue diferente en animales estresados y no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 3.417$ ,  $p = 0.005$ ).



**Figura 31. La TSA no previno que el estrés provocara reducción de la transcripción de *Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b* en el hipocampo.** A. Expresión relativa de *Grin1*. B. Expresión relativa de *Grin2a*. C. Expresión relativa de *Grin2b*. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

Se encontraron **correlaciones** positivas y significativas entre la expresión de *Grin1* y *Grin2a* ( $r_{(16)} = 0.747$ ,  $p < 0.001$ ), *Grin1* y *Grin2b* ( $r_{(16)} = 0.876$ ,  $p < 0.001$ ) y *Grin2a-Grin2b* ( $r_{(16)} = 0.841$ ,  $p < 0.001$ ) en el hipocampo.

La **razón entre la expresión de *Grin2b* y la de *Grin2a*** ( $Grin2b/Grin2a$ ) de los grupos experimentales no fue significativamente diferente de la de la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 0.353$ ,  $p = 0.788$ ; Figura 32) en el hipocampo. Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 32) no mostraron efectos significativos del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.039$ ,  $p = 0.845$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.006$ ,  $p = 0.936$ ) o de la interacción tratamiento farmacológico-estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.011$ ,  $p = 0.334$ ) sobre la razón  $Grin2b/Grin2a$  en el hipocampo.

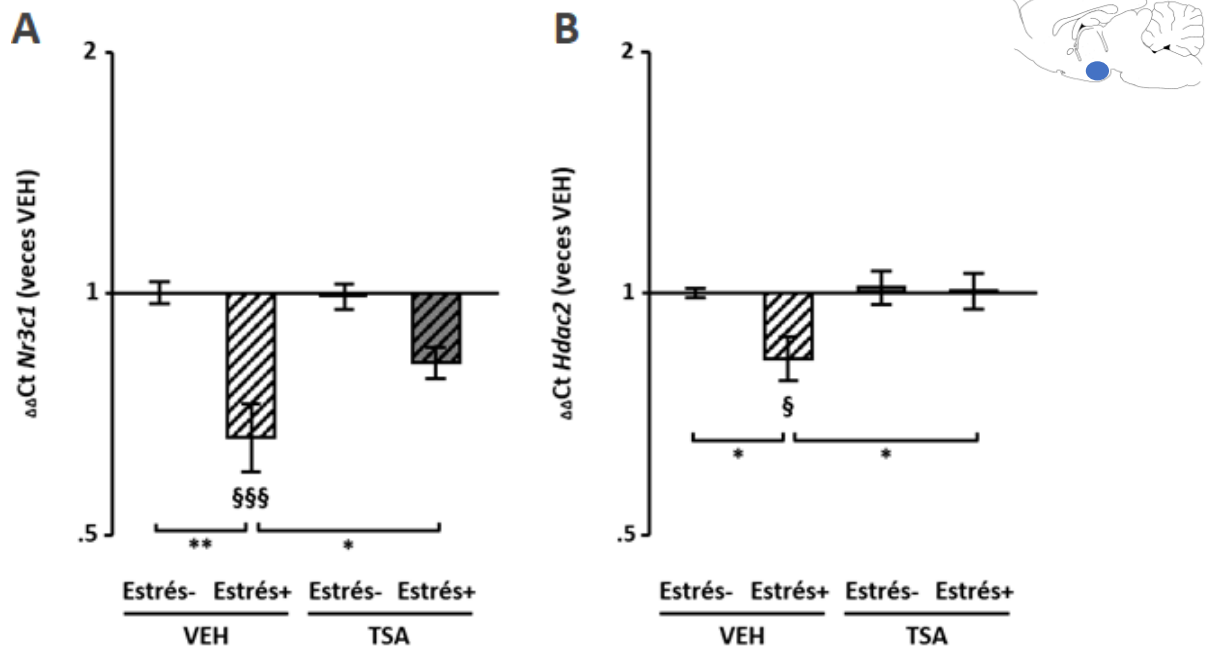


**Figura 32. Los tratamientos experimentales no alteraron la razón *Grin2b/Grin2a* en el hipocampo.** Resultados expresados como veces del nivel basal.

#### 4.1.4.3. Formación amigdalina

La expresión del gen *Nr3c1* en la amígdala de animales de los grupos experimentales fue significativamente distinta de la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 11.909$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 33A). Los análisis *post-hoc* mostraron que la transcripción del gen en los animales estresados, inyectados con vehículo (Estrés+/VEH:  $t = 5.186$ ,  $p < 0.001$ ) o TSA (Estrés+/TSA:  $t = 2.770$ ,  $p = 0.017$ ) fue significativamente menor que la basal, mientras que la expresión del gen en los animales sin estrés inyectados con TSA no fue significativamente distinta de la basal (Estrés-/TSA:  $t = 0.231$ ,  $p = 0.818$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 33A) mostraron un efecto significativo del estrés ( $F_{(1, 15)} = 29.834$ ,  $p < 0.001$ ), pero no del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 2.387$ ,  $p = 0.148$ ), ni la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 3.504$ ,  $p = 0.086$ ), sobre la expresión de *Nr3c1* en la amígdala. Los análisis *post-hoc* confirmaron que el estrés provocó una reducción significativa de la transcripción de *Nr3c1* en los animales inyectados con vehículo (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 5.186$ ,  $p < 0.001$ ), y que la TSA atenuó este efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.416$ ,  $p = 0.033$ ). La TSA no tuvo efecto en animales sin estrés (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.231$ ,  $p = 0.821$ ), teniendo efectos distintos en animales estresados y no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 2.539$ ,  $p = 0.026$ ).

Por su parte, también hubo diferencias significativas en la expresión del gen *Hdac2* en la amígdala entre los grupos experimentales y la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 4.240$ ,  $p = 0.029$ ; Figura 33B). Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales estresados inyectados con vehículo tuvieron una transcripción del gen significativamente menor que la basal (Estrés+/VEH:  $t = 2.817$ ,  $p = 0.015$ ), mientras que los animales de los otros grupos no tuvieron cambios con relación al nivel basal (Estrés-/TSA:  $t = 0.235$ ,  $p = 0.818$ ; Estrés+/TSA:  $t = 0.026$ ,  $p = 0.980$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 33B) mostraron un efecto significativo del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 4.739$ ,  $p = 0.011$ ), pero no el estrés ( $F_{(1, 15)} = 4.581$ ,  $p = 0.054$ ), ni la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 3.401$ ,  $p = 0.090$ ), sobre la expresión de *Hdac2* en la amígdala. Los análisis *post-hoc* confirmaron que el estrés provocó una reducción significativa de la transcripción de *Hdac2* en los animales inyectados con vehículo (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 2.817$ ,  $p = 0.016$ ), y que la TSA previno este efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.843$ ,  $p = 0.015$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.235$ ,  $p = 0.818$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.209$ ,  $p = 0.838$ ).



**Figura 33. La TSA evitó la reducción inducida por estrés en la transcripción de *Nr3c1* y *Hdac2* en la amígdala.** A. Expresión relativa de *Nr3c1*. B. Expresión relativa de *Hdac2*. Resultados expresados como veces el nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

La expresión de los genes *Nr3c1* y *Hdac2* **correlacionó** de forma positiva y significativa en la amígdala ( $r_{(16)} = 0.740$ ,  $p = 0.001$ ).

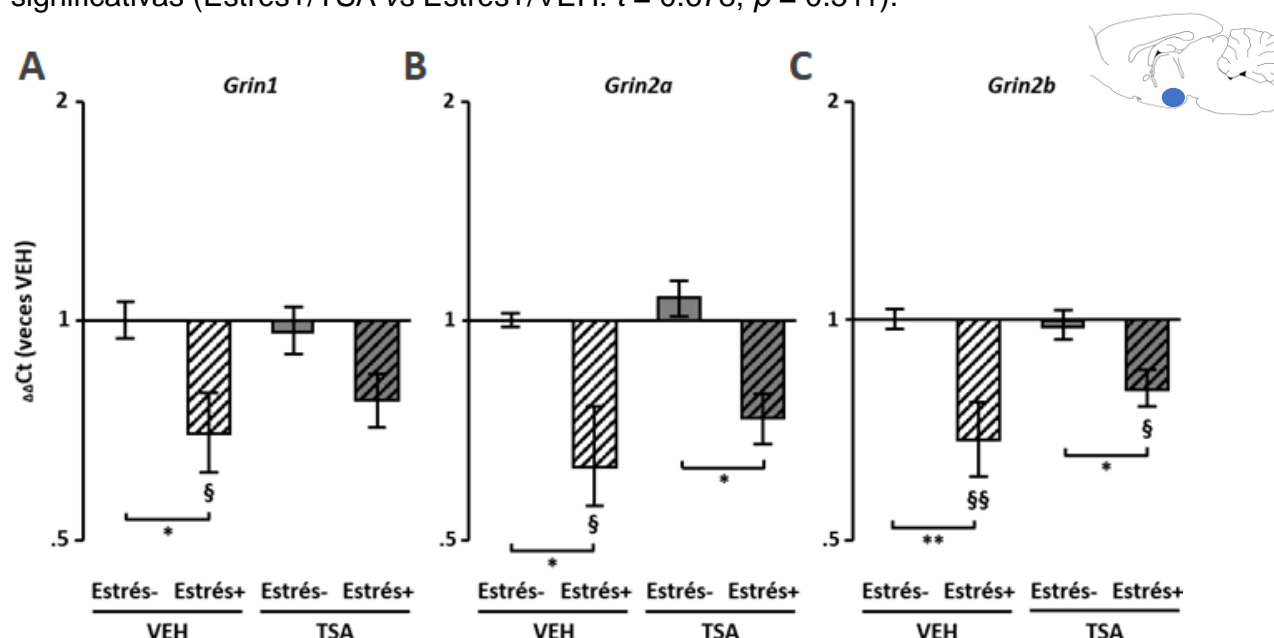
Se analizó el efecto de los tratamientos experimentales sobre la transcripción de mRNA codificante para las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor **NMDA** como marcadores de plasticidad sináptica en la amígdala.

En la amígdala, la expresión del gen ***Grin1*** en los grupos experimentales fue significativamente diferente que la basal (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 3.652$ ,  $p = 0.044$ ; Figura 34A). Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales estresados inyectados con vehículo (Estrés+/VEH:  $t = 2.787$ ,  $p = 0.016$ ) tuvieron una transcripción del gen significativamente menor que la basal, mientras que la de los animales tratados con TSA, estresados (Estrés+/TSA:  $t = 2.114$ ,  $p = 0.056$ ) y no estresados (Estrés-/TSA:  $t = 0.344$ ,  $p = 0.737$ ), no fue significativamente distinta de la basal. Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 34A) mostraron un efecto significativo del estrés ( $F_{(1, 15)} = 10.385$ ,  $p = 0.007$ ), pero no el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.053$ ,  $p = 0.820$ ), ni la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.517$ ,  $p = 0.486$ ), sobre la expresión de *Grin1* en la amígdala. Los análisis *post-hoc* confirmaron que el estrés provocó una reducción significativa de la transcripción de *Grin1* en los animales inyectados con vehículo (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 2.787$ ,  $p = 0.016$ ); sin embargo, la TSA no previno este efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 0.673$ ,  $p = 0.514$ ). La TSA no tuvo efecto significativo en animales sin estrés (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.344$ ,  $p = 0.737$ ), por lo que el efecto del fármaco fue distinto en animales estresados y no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 1.770$ ,  $p = 0.102$ ).

Por su parte, la expresión del gen ***Grin2a*** en la amígdala fue significativamente distinta entre los grupos experimentales y la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 5.244$ ,  $p = 0.015$ ; Figura 34B). Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales estresados inyectados con vehículo (Estrés+/VEH:  $t = 2.812$ ,  $p = 0.015$ ) tuvieron una expresión del gen significativamente menor que la basal; mientras que la de los otros grupos no fue significativamente distinta de la línea de base (Estrés-/TSA:  $t = 0.530$ ,  $p = 0.606$ ; Estrés+/TSA:  $t = 2.134$ ,  $p = 0.542$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 34B) mostraron un efecto significativo del estrés ( $F_{(1, 15)} = 14.991$ ,  $p = 0.002$ ), pero no del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} =$



0.729,  $p = 0.410$ ), ni de la interacción tratamiento farmacológico-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.011$ ,  $p = 0.918$ ), sobre la expresión de *Grin2a* en la amígdala. Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés provocó una disminución significativa de la expresión del gen en animales inyectados con vehículo (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 2.812$ ,  $p = 0.016$ ), y que la TSA no revirtió este efecto (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.530$ ,  $p = 0.606$ ), pero tuvo efectos distintos en animales estresados y no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 2.664$ ,  $p = 0.021$ ); no se observaron otras diferencias significativas (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 0.678$ ,  $p = 0.511$ ).



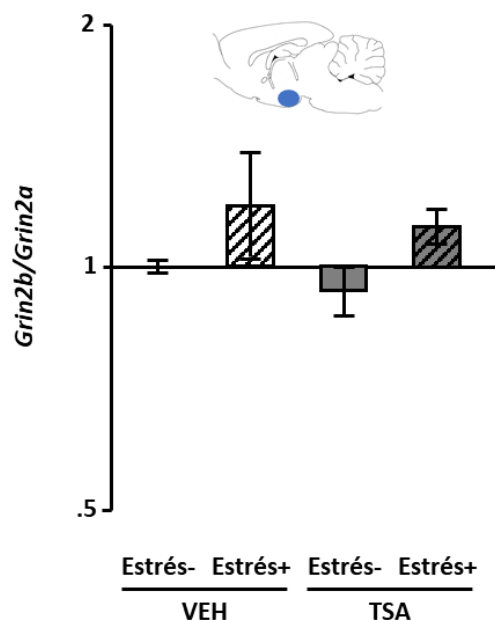
**Figura 34.** La TSA no previno que el estrés indujera la reducción de la transcripción de *Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b* en la amígdala. A. Expresión relativa de *Grin1*. B. Expresión relativa de *Grin2a*. C. Expresión relativa de *Grin2b*. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

La expresión de *Grin2b* en la amígdala fue significativamente distinta entre los grupos experimentales y la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 7.684$ ,  $p = 0.004$ ; Figura 34C). Los análisis *post-hoc* mostraron que la transcripción del gen en los animales estresados, inyectados con vehículo (Estrés+/VEH:  $t = 4.085$ ,  $p = 0.001$ ) o TSA (Estrés+/TSA:  $t = 2.531$ ,  $p = 0.026$ ) fue significativamente menor que la basal; la transcripción de los animales sin estrés inyectados con TSA no fue significativamente diferente de la basal (Estrés-/TSA:  $t = 0.198$ ,  $p = 0.846$ ). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 34C) mostraron un efecto significativo del estrés ( $F_{(1, 15)} = 20.597$ ,  $p < 0.001$ ), pero no el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} =$

0.920,  $p = 0.356$ ), ni la interacción tratamiento farmacológico-estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.536$ ,  $p = 0.239$ ), sobre la expresión de *Grin2b* en la amígdala. Los análisis *post-hoc* confirmaron que el estrés provocó una disminución significativa de la transcripción de *Grin2b* en los animales inyectados con vehículo (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 4.085$ ,  $p = 0.002$ ), y que la TSA no revirtió este efecto (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.198$ ,  $p = 0.846$ ), pero tuvo efectos distintos en animales estresados y no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 2.333$ ,  $p = 0.038$ ). No se observaron otras diferencias entre grupos (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 1.555$ ,  $p = 0.146$ ).

La expresión de *Grin1* y *Grin2a* ( $r_{(16)} = 0.855$ ,  $p < 0.001$ ), *Grin1* y *Grin2b* ( $r_{(16)} = 0.725$ ,  $p = 0.001$ ) y *Grin2a-Grin2b* ( $r_{(16)} = 0.892$ ,  $p < 0.001$ ) en la amígdala tuvo una **correlación** positiva y significativa.

La **razón entre la expresión de *Grin2b* y la de *Grin2a*** (*Grin2b/Grin2a*) en la amígdala no fue significativamente diferente entre los grupos experimentales y la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(3, 15)} = 1.186$ ,  $p = 0.356$ ; Figura 35). Las comparaciones entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 35) no mostraron efectos significativo del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.654$ ,  $p = 0.434$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.058$ ,  $p = 0.813$ ) o la interacción tratamiento farmacológico-estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.702$ ,  $p = 0.217$ ) sobre la relación *Grin2b/Grin2a* en la amígdala.



**Figura 35.** Los tratamientos experimentales no alteraron la razón entre la expresión *Grin2b/Grin2a* en la amígdala. Resultados expresados como veces del nivel basal.

## 4.2. Efectos del Estrés Agudo y la TSA en Animales con Entrenamiento en la Tarea Espacial

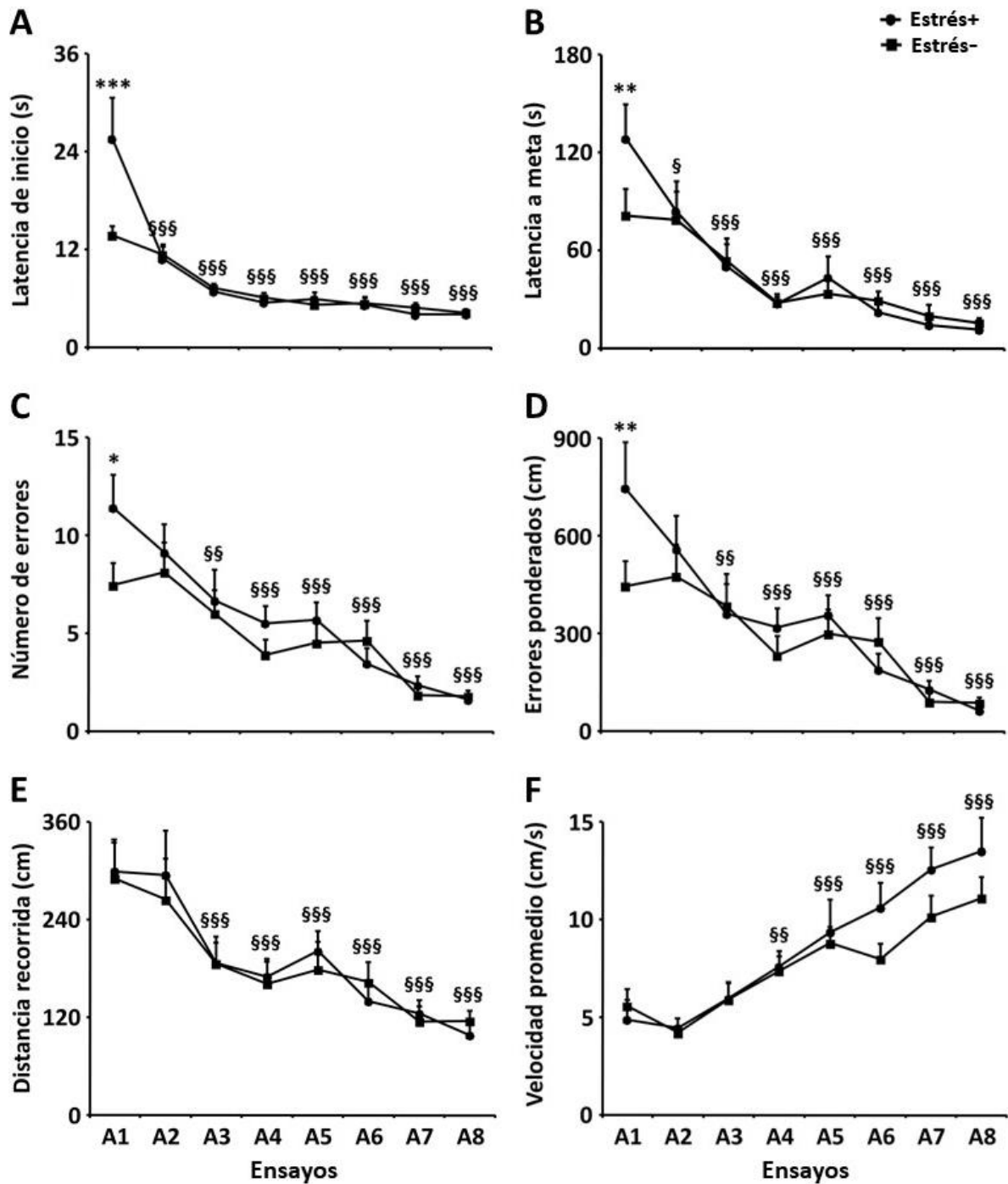
### 4.2.1. Aprendizaje de la tarea espacial

Se realizaron pruebas ANOVA de dos vías de medidas repetidas para identificar los efectos del estrés sobre la **adquisición de la tarea espacial en el laberinto de Barnes** a lo largo de ocho ensayos consecutivos de entrenamiento (Figura 36).

La **latencia de inicio** para explorar los agujeros en el laberinto (Figura 36A) disminuyó a lo largo de los ensayos ( $F_{(7, 287)} = 25.802, p < 0.001$ ), reduciéndose significativamente a partir del segundo ensayo ( $p < 0.001$ ). Al considerar la totalidad del proceso de adquisición no se observaron diferencias entre animales estresados y no estresados ( $F_{(1, 287)} = 2.200, p = 0.147$ ). Sin embargo, se observó una interacción significativa entre ensayos y grupo ( $F_{(1, 7)} = 4.368, p < 0.001$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales estresados presentaron una latencia de inicio inferior a la de los animales no estresados durante el primer ensayo de adquisición ( $t = 5.639, p < 0.001$ ).

La **latencia a meta** (Figura 36B) también disminuyó a lo largo de los ensayos ( $F_{(7, 287)} = 16.842, p < 0.001$ ), reduciéndose significativamente a partir del segundo ensayo ( $p < 0.05$ ). Al considerar la totalidad del proceso de adquisición no se observaron diferencias entre animales estresados y no estresados ( $F_{(1, 287)} = 0.532, p = 0.471$ ). Tampoco se observó interacción significativa entre ensayos y grupo ( $F_{(1, 7)} = 1.250, p = 0.276$ ). Los análisis *post-hoc*, sin embargo, mostraron que los animales estresados presentaron una latencia de escape inferior a la de los animales no estresados durante el primer ensayo ( $t = 2.850, p < 0.01$ ).

De manera semejante, el **número de errores** (Figura 36C) disminuyó a lo largo de los ensayos ( $F_{(7, 287)} = 14.521, p < 0.001$ ), reduciéndose significativamente a partir del tercer ensayo ( $p < 0.01$ ). Al considerar la totalidad del proceso de adquisición no se observaron diferencias entre animales estresados y no estresados ( $F_{(1, 287)} = 2.416, p = 0.129$ ). Tampoco se observó interacción significativa entre ensayos y grupo ( $F_{(1, 7)} = 0.964, p = 0.458$ ). Los análisis *post-hoc*, sin embargo, mostraron que los animales estresados cometieron menos errores que los animales no estresados durante el primer ensayo ( $t = 2.529, p < 0.05$ ).



**Figura 36. El estrés no alteró el proceso global de adquisición de la tarea espacial.** A) latencia para iniciar la exploración del laberinto, B) latencia para encontrar el agujero meta, C) frecuencia de exploración de agujeros diferentes al meta, D) exploración de agujeros diferentes al meta relativa a la distancia al agujero meta, E) distancia recorrida en el laberinto, F) velocidad de desplazamiento. \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con relación al primer ensayo de adquisición; A1-A8, ensayos de entrenamiento.

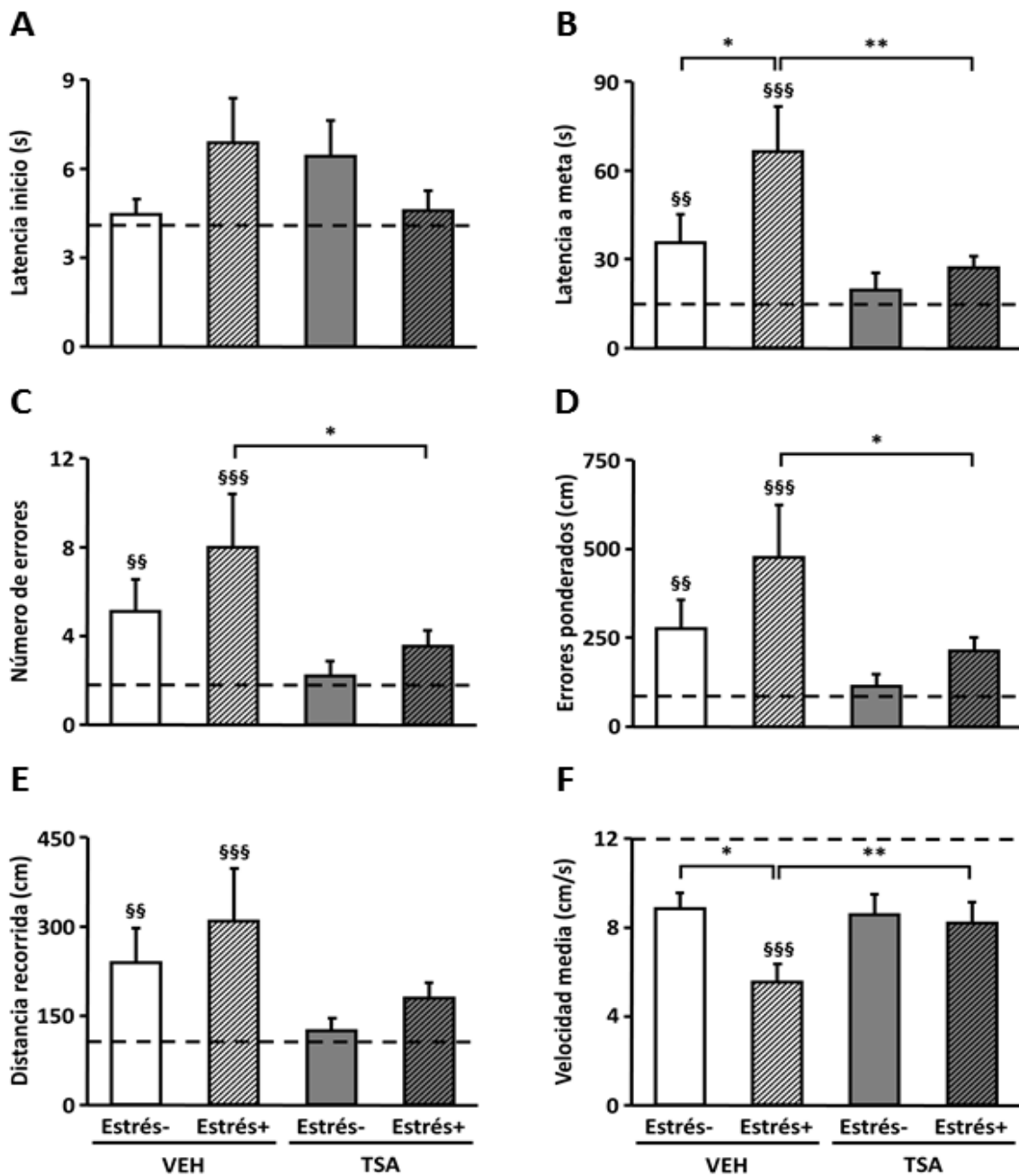
Los **errores ponderados** por su distancia al agujero meta (Figura 36D) disminuyeron a lo largo de los ensayos ( $F_{(7, 287)} = 12.350, p < 0.001$ ), reduciéndose significativamente a partir del tercer ensayo ( $p < 0.01$ ). No se observaron diferencias entre los grupos de animales estresados y no estresados al considerar la totalidad del proceso de adquisición ( $F_{(1, 287)} = 1.645, p = 0.208$ ). Tampoco se observó interacción significativa entre ensayos y grupo ( $F_{(1, 7)} = 1.267, p = 0.267$ ). Los análisis *post-hoc*, sin embargo, mostraron que los animales estresados presentaron menor cantidad de errores que los animales no estresados durante el primer ensayo de adquisición ( $t = 2.847, p < 0.05$ ).

La **distancia recorrida** (Figura 36E) disminuyó significativamente a lo largo de los ensayos ( $F_{(7, 287)} = 9.700, p < 0.001$ ), reduciéndose significativamente a partir del tercer ensayo ( $p < 0.001$ ). No se observaron diferencias entre animales estresados y no estresados al considerar la totalidad del entrenamiento ( $F_{(1, 287)} = 0.089, p = 0.767$ ). Tampoco se observó interacción significativa entre ensayos y grupo ( $F_{(1, 7)} = 0.173, p = 0.990$ ). Los análisis *post-hoc* no mostraron diferencias entre animales estresados y no estresados en ningún ensayo.

Finalmente, la **velocidad media** de desplazamiento (Figura 36F) se incrementó progresivamente al transcurrir los ensayos ( $F_{(7, 287)} = 20.592, p < 0.001$ ), aumentando de forma significativa a partir del cuarto ensayo ( $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias entre animales estresados y no estresados al considerar la totalidad del entrenamiento ( $F_{(1, 287)} = 1.456, p = 0.236$ ). Tampoco se observó interacción significativa entre ensayos y grupo ( $F_{(1, 7)} = 1.048, p = 0.398$ ). Los análisis *post-hoc* no mostraron diferencias entre animales estresados y no estresados en ningún ensayo.

#### 4.2.2. Memoria espacial a largo plazo

Se comparó el desempeño de los animales durante la **prueba de memoria** con el desempeño en el último ensayo de entrenamiento, así como entre grupos experimentales (Figura 37).



**Figura 37. La TSA mejoró la memoria espacial a largo plazo en animales estresados.** A) latencia para iniciar la exploración del laberinto, B) latencia para encontrar el agujero meta, C) frecuencia de exploración de agujeros diferentes al meta, D) exploración de agujeros diferentes al meta relativa a la distancia al agujero meta, E) distancia recorrida en el laberinto, F) velocidad de desplazamiento. \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con relación al promedio del último ensayo de adquisición A8 (---).

La **latencia de inicio** de los grupos experimentales en la prueba de memoria fue significativamente diferente de la latencia de inicio en el último ensayo de adquisición (ANOVA 1 vía,  $F_{(4, 71)} = 2.930$ ,  $p = 0.027$ ; Figura 37A). Sin embargo, los análisis *post-hoc* no mostraron diferencias específicas para ningún grupo experimental (Estrés-/VEH:  $t = 0.347$ ,  $p = 0.927$ ; Estrés+/VEH:  $t = 0.371$ ,  $p = 0.927$ ; Estrés-/TSA:  $t = 2.357$ ,  $p = 0.177$ ; Estrés+/TSA:  $t = 0.483$ ,  $p = 0.981$ ). La comparación entre grupos experimentales durante la prueba (ANOVA 2 vías; Figura 37A) mostró que la latencia de inicio no se vio afectada por el estrés ( $F_{(1, 1)} = 0.078$ ,  $p = 0.781$ ), el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 1)} = 0.023$ ,  $p = 0.878$ ), o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 35)} = 4.050$ ,  $p = 0.053$ ).

La **latencia a meta** de los grupos experimentales en la prueba de memoria fue significativamente diferente de la observada en el último ensayo de adquisición (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 71)} = 11.760$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 37B). Los análisis *post-hoc* mostraron un incremento en la latencia a meta en los grupos que recibieron vehículo (Estrés-/VEH:  $t = 22.108$ ,  $p = 0.004$ ; Estrés+/VEH:  $t = 52.875$ ,  $p < 0.001$ ), pero no en los tratados con TSA (Estrés-/TSA:  $t = 1.706$ ,  $p = 0.385$ ; Estrés+/TSA:  $t = 0.736$ ,  $p = 0.464$ ). La comparación de la latencia a meta entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 37B) mostró un efecto significativo del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 1)} = 8.230$ ,  $p = 0.007$ ), pero no del estrés, ( $F_{(1, 1)} = 3.933$ ,  $p = 0.056$ ) o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 35)} = 1.472$ ,  $p = 0.234$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés incrementó la latencia para encontrar el agujero meta en los animales inyectados con vehículo (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 2.260$ ,  $p = 0.031$ ), efecto prevenido por la TSA (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.886$ ,  $p = 0.007$ ). No se encontraron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.171$ ,  $p = 0.250$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.545$ ,  $p = 0.590$ ).

El **número de errores** cometidos por los animales de los diferentes grupos experimentales en la prueba de memoria fue significativamente diferente del promedio de errores observado durante el último ensayo de entrenamiento (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 71)} = 7.999$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 37C). Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales de los grupos tratados con vehículo (Estrés-/VEH:  $t = 2.848$ ,  $p = 0.005$ ; Estrés+/VEH:  $t = 5.256$ ,  $p < 0.001$ ), pero no de los tratados con TSA (Estrés-/TSA:  $t = 0.440$ ,  $p = 0.661$ ; Estrés+/TSA:  $t = 1.551$ ,  $p = 0.126$ ) mostraron un incremento en los errores. La comparación del número de errores entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías;

Figura 37C) mostró un efecto significativo del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 1)} = 6.025$ ,  $p = 0.020$ ), pero no del estrés ( $F_{(1, 1)} = 1.997$ ,  $p = 0.167$ ) o de la interacción entre factores ( $F_{(1, 35)} = 0.271$ ,  $p = 0.606$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que la inyección de TSA redujo el número de errores en animales estresados (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.104$ ,  $p = 0.043$ ), pero no tuvo efecto en animales no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.367$ ,  $p = 0.181$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés-/VEH vs Estrés+/VEH:  $t = 1.367$ ,  $p = 0.181$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.631$ ,  $p = 0.532$ ).

Los **errores ponderados** de los grupos experimentales en la prueba de memoria mostró diferencias significativas con el promedio de errores ponderados observados en el último ensayo de adquisición (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 71)} = 9.162$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 37D). Los análisis *post-hoc* mostraron que el número de errores ponderados durante la prueba fue mayor en los animales tratados con vehículo (Estrés-/VEH:  $t = 2.842$ ,  $p = 0.041$ ; Estrés+/VEH:  $t = 5.863$ ,  $p < 0.001$ ), pero no en los tratados con TSA (Estrés-/TSA:  $t = 1.823$ ,  $p = 0.261$ ; Estrés+/TSA:  $t = 0.536$ ,  $p = 0.594$ ). La comparación entre grupos experimentales del número de errores ponderados (ANOVA 2 vías; Figura 37D) mostró un efecto significativo del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 1)} = 5.828$ ,  $p = 0.022$ ), pero no del estrés, ( $F_{(1, 1)} = 2.919$ ,  $p = 0.097$ ) o de la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 35)} = 0.322$ ,  $p = 0.574$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que la TSA administrada a animales estresados redujo el número de errores (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.108$ ,  $p = 0.043$ ); sin embargo, la TSA no tuvo efecto en los animales no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.306$ ,  $p = 0.201$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés-/VEH vs Estrés+/VEH:  $t = 1.609$ ,  $p = 0.117$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.807$ ,  $p = 0.426$ ).

La **distancia** recorrida en los grupos experimentales durante la prueba de memoria fue significativamente diferente a la observada en el último ensayo de adquisición (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 71)} = 6.287$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 37E). Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales de los grupos tratados con vehículo recorrieron una mayor distancia en la prueba que en el último ensayo de adquisición (Estrés-/VEH:  $t = 2.912$ ,  $p = 0.004$ ; Estrés+/VEH:  $t = 4.456$ ,  $p < 0.001$ ); mientras que los tratados con TSA no mostraron diferencias (Estrés-/TSA:  $t = 0.371$ ,  $p = 0.712$ ; Estrés+/TSA:  $t = 1.588$ ,  $p = 0.117$ ). La comparación de la distancia recorrida entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 37E) mostró un efecto del tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 1)} = 4.892$ ,  $p =$



0.034), pero no del estrés, ( $F_{(1, 1)} = 1.275, p = 0.267$ ) o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 35)} = 0.018, p = 0.895$ ). Los análisis *post-hoc*, sin embargo, no mostraron diferencias significativas entre pares de grupos (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 1.659, p = 0.107$ ; Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.470, p = 0.151$ ; Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 0.893, p = 0.378$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.704, p = 0.486$ ).

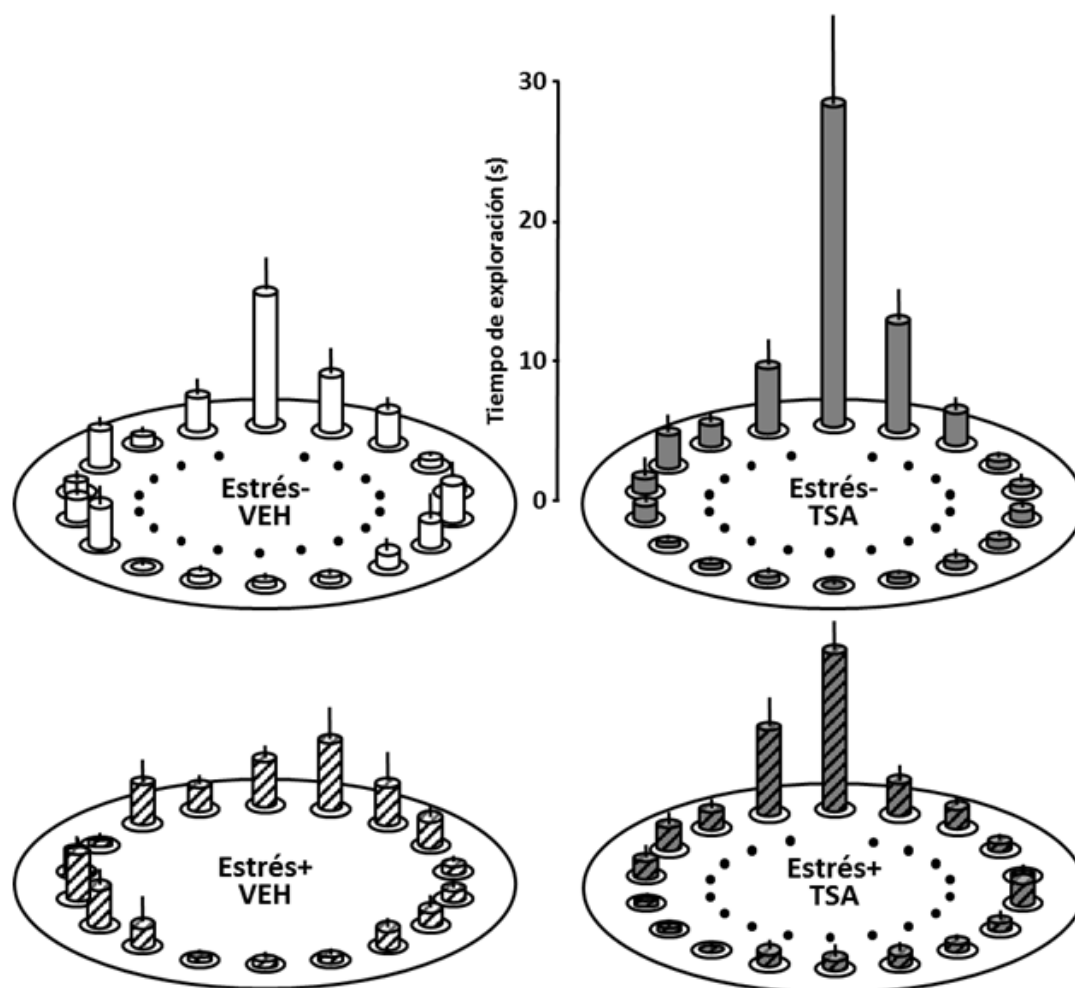
La **velocidad** de desplazamiento en los grupos experimentales durante la prueba de memoria fue significativamente diferente de la observada en el último ensayo de adquisición (ANOVA 1 vía; ( $F_{(4, 71)} = 4.878, p = 0.002$ ; Figura 37F). Los análisis *post-hoc* mostraron que la velocidad en la prueba disminuyó en los animales estresados tratados con vehículo (Estrés+/VEH:  $t = 3.864, p = 0.003$ ), pero son cambio en los demás grupos (Estrés-/VEH:  $t = 1.983, p = 0.309$ ; Estrés-/TSA  $t = 2.137, p = 0.256$ ; Estrés+/TSA:  $t = 2.352, p = 0.179$ ). La comparación de la velocidad entre grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 37B) mostró un efecto significativo del estrés ( $F_{(1, 1)} = 4.774, p = 0.036$ ), pero no del tratamiento farmacológico, ( $F_{(1, 1)} = 2.006, p = 0.166$ ) o la interacción entre fármaco-estrés ( $F_{(1, 35)} = 3.017, p = 0.092$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés redujo la velocidad de desplazamiento en sujetos inyectados con vehículo (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 2.773, p = 0.009$ ), efecto prevenido por la TSA (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.230, p = 0.033$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos experimentales (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.227, p = 0.822$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.317, p = 0.754$ ).

Como **indicadores adicionales** de la consolidación de la memoria espacial se analizó el tiempo de exploración de cada agujero del laberinto para cada grupo experimental (Figura 38), y se comparó entre grupos el tiempo total de exploración, el tiempo bruto y porcentual de exploración del agujero meta, y el tiempo bruto y porcentual de exploración de la zona meta (agujero meta y adyacentes) durante los 4 minutos de la prueba de memoria (Figura 39).

El **tiempo de exploración de los agujeros** en el laberinto no se distribuyó de manera homogénea en los **animales no estresados inyectados con vehículo** (Estrés-/VEH,  $F_{(8, 161)} = 3.714, p < 0.001$ ; Figura 38, arriba a la izquierda). Los análisis *post-hoc* mostraron una preferencia por el agujero meta (0) sobre los demás agujeros del laberinto (1:  $t = 3.336, p = 0.001$ ; 2:  $t = 4.408, p < 0.001$ ; 3:  $t = 5.431, p < 0.001$ ; 4:  $t = 5.425, p < 0.001$ ; 5:  $t = 4.044, p < 0.001$ ; 6:  $t = 4.694, p < 0.001$ ; 7:  $t = 5.053, p <$

0.001; 8:  $t = 5.599$ ,  $p < 0.001$ ; 9:  $t = 5.682$ ,  $p < 0.001$ ; -8:  $t = 5.554$ ,  $p < 0.001$ ; -7:  $t = 5.915$ ,  $p < 0.001$ ; -6:  $t = 3.901$ ,  $p < 0.001$ ; -5:  $t = 4.811$ ,  $p < 0.001$ ; -4:  $t = 5.347$ ,  $p < 0.001$ ; -3:  $t = 4.218$ ,  $p < 0.001$ ; -2:  $t = 5.477$ ,  $p < 0.001$ ; -1:  $t = 4.321$ ,  $p < 0.001$ ).

Por el contrario, los **animales estresados inyectados con vehículo** no mostraron preferencia por ningún agujero (Estrés+/VEH,  $F_{(8, 161)} = 1.441$ ,  $p = 0.127$ ; Figura 38, abajo a la izquierda).



**Figura 38. La TSA previno la pérdida de preferencia por el agujero meta inducida por el estrés.** Se presenta el tiempo de exploración de cada agujero durante la prueba. El agujero meta corresponde al agujero dibujado a las 12 en punto en cada representación del laberinto. \* diferencias significativas con relación al agujero meta.

Por su parte, los **animales sin estrés inyectados con TSA** mostraron una exploración no homogénea de los agujeros en el laberinto (Estrés-/TSA,  $F_{(8, 161)} = 9.315$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 38, arriba a la derecha). Los análisis *post-hoc* mostraron una marcada preferencia por el agujero meta sobre los otros agujeros (1:  $t = 6.005$ ,  $p = 0.001$ ;

2:  $t = 8.182, p < 0.001$ ; 3:  $t = 8.952, p < 0.001$ ; 4:  $t = 8.901, p < 0.001$ ; 5:  $t = 8.804, p < 0.001$ ; 6:  $t = 8.902, p < 0.001$ ; 7:  $t = 8.923, p < 0.001$ ; 8:  $t = 9.043, p < 0.001$ ; 9:  $t = 9.256, p < 0.001$ ; -8:  $t = 9.007, p < 0.001$ ; -7:  $t = 9.036, p < 0.001$ ; -6:  $t = 9.050, p < 0.001$ ; -5:  $t = 8.637, p < 0.001$ ; -4:  $t = 7.773, p < 0.001$ ; -3:  $t = 8.195, p < 0.001$ ; -2:  $t = 8.524, p < 0.001$ ; -1:  $t = 7.278, p < 0.001$ ).

De manera semejante, los **animales estresados e inyectados con TSA** exploraron el laberinto de manera no homogénea (Estrés+/TSA,  $F_{(8, 161)} = 8.851, p < 0.001$ ; Figura 38, abajo a la derecha). Los análisis *post-hoc* mostraron una preferencia por el agujero meta sobre los demás agujeros (1:  $t = 6.774, p < 0.001$ ; 2:  $t = 7.581, p < 0.001$ ; 3:  $t = 8.161, p < 0.001$ ; 4:  $t = 8.515, p < 0.001$ ; 5:  $t = 7.343, p < 0.001$ ; 6:  $t = 8.132, p < 0.001$ ; 7:  $t = 8.178, p < 0.001$ ; 8:  $t = 7.871, p < 0.001$ ; 9:  $t = 8.007, p < 0.001$ ; -8:  $t = 7.895, p < 0.001$ ; -7:  $t = 8.745, p < 0.001$ ; -6:  $t = 8.520, p < 0.001$ ; -5:  $t = 8.552, p < 0.001$ ; -4:  $t = 7.696, p < 0.001$ ; -3:  $t = 7.408, p < 0.001$ ; -2:  $t = 7.761, p < 0.001$ ; -1:  $t = 3.953, p < 0.001$ ).

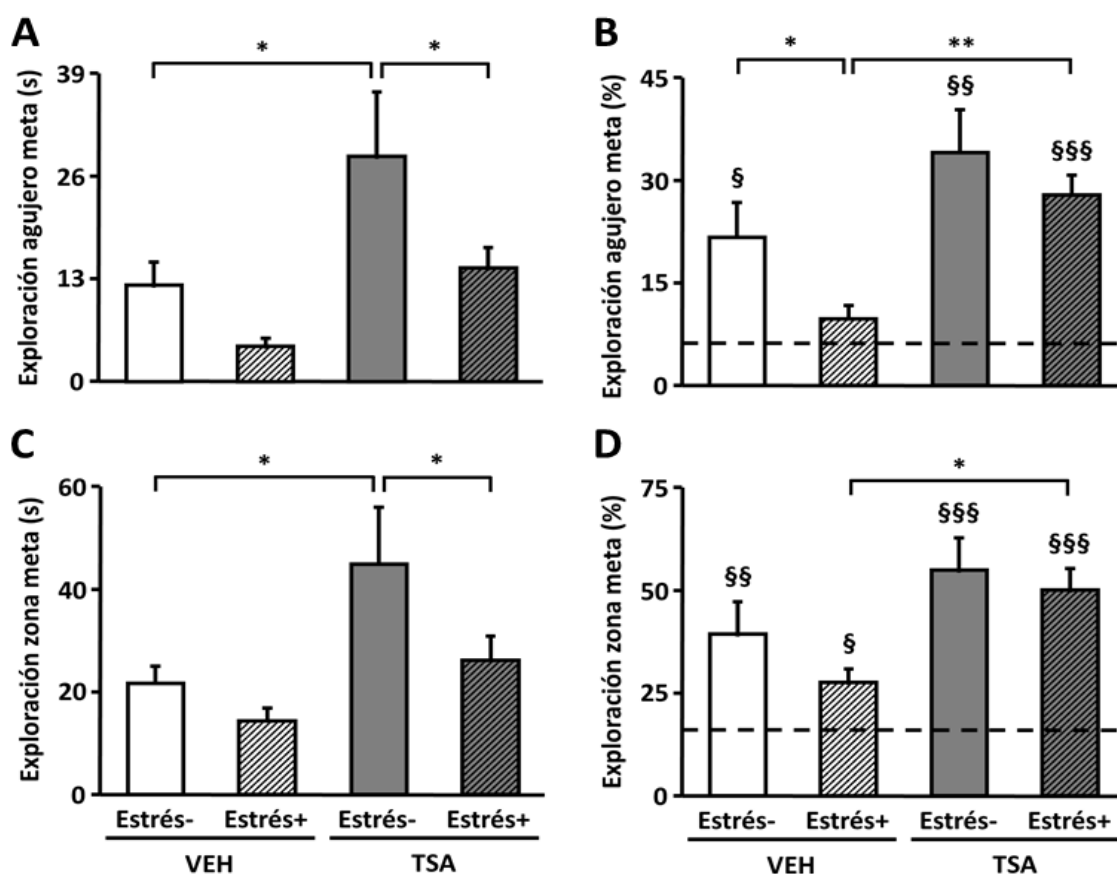
El **tiempo total de exploración** de todos los agujeros del laberinto durante la prueba de memoria no se vio afectada por el estrés ( $F_{(1, 1)} = 3.141, p = 0.086$ ), el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 1)} = 1.269, p = 0.268$ ), o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 35)} = 1.491, p = 0.231$ ).

El **tiempo de exploración del agujero meta** en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 39A) fue afectado significativamente por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 1)} = 8.841, p = 0.006$ ) y el estrés ( $F_{(1, 1)} = 6.133, p = 0.019$ ), pero no por la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 35)} = 0.585, p = 0.450$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que la inyección de TSA incrementó la exploración del agujero meta en animales estresados (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 2.292, p = 0.029$ ) y no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 2.643, p = 0.013$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 1.210, p = 0.235$ ; Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 1.562, p = 0.128$ ).

Dado que la administración de TSA tendió a aumentar el tiempo total de exploración de todos los agujeros del laberinto, se comparó el porcentaje de tiempo de exploración del agujero meta entre los grupos experimentales.

El **tiempo porcentual de exploración del agujero meta** en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 39B) fue alterado por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 1)} = 12.110, p < 0.001$ ) y el estrés ( $F_{(1, 1)} = 4.268, p = 0.047$ ), pero no por la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 35)} = 0.423, p = 0.520$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés redujo la exploración del agujero meta en animales

inyectados con vehículo (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 2.169$ ,  $p = 0.045$ ), efecto prevenido por la TSA (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH  $t = 2.921$ ,  $p = 0.006$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos experimentales (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 2.001$ ,  $p = 0.054$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 1.001$ ,  $p = 0.324$ ). Como indicador adicional de la preferencia por el agujero meta, se comparó su exploración porcentual en cada grupo experimental con el porcentaje esperado al **azar** (5.5%; prueba *t-student* con una sola muestra; Figura 39B). Se encontró que los animales sin estrés e inyectados con vehículo exploraron el agujero meta por encima del azar (Estrés-/VEH:  $t_{(8)} = 3.163$ ,  $p = 0.013$ ), pero no así los animales estresados inyectados con vehículo (Estrés+/VEH:  $t_{(8)} = 2.009$ ,  $p = 0.071$ ). Por el contrario, los animales tratados con TSA, bien sin estrés (Estrés-/TSA:  $t_{(8)} = 7.720$ ,  $p < 0.001$ ) o con estrés (Estrés+/TSA:  $t_{(8)} = 4.611$ ,  $p = 0.001$ ), mostraron una preferencia por el agujero meta por encima del azar.



**Figura 39. La TSA previno la pérdida de preferencia relativa por el agujero meta inducida por el estrés.** A) tiempo de exploración del agujero meta, B) tiempo relativo de exploración del agujero meta. C) tiempo de exploración de la zona meta, D) tiempo relativo de exploración de la zona meta. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con relación al valor de exploración al azar (---).

El **tiempo de exploración de la zona meta** (agujero meta y adyacentes) en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 39C) fue alterado por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 1)} = 7.571, p = 0.010$ ) y el estrés ( $F_{(1, 1)} = 4.145, p = 0.049$ ), pero no por la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 35)} = 0.806, p = 0.376$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que la TSA incrementó la exploración de la zona meta en animales sin estrés (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 2.580, p = 0.015$ ), teniendo un efecto distinto en los animales estresados (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 2.074, p = 0.046$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos experimentales (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 0.805, p = 0.427$ ; Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 1.311, p = 0.119$ ).

De nuevo, en tanto la administración de TSA tendió a aumentar el tiempo total de exploración de todos los agujeros del laberinto, se comparó el porcentaje de tiempo de exploración de la zona meta entre los grupos experimentales.

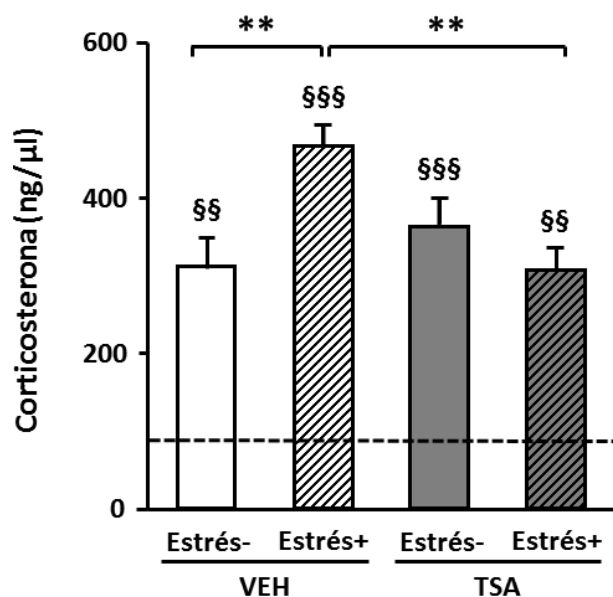
El **tiempo de exploración porcentual de la zona meta** (ANOVA 2 vías; Figura 39D) fue alterado por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 1)} = 10.583, p < 0.001$ ), pero no por el estrés, ( $F_{(1, 1)} = 2.057, p = 0.161$ ) o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 35)} = 0.361, p = 0.552$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que la TSA inyectada a animales estresados incrementó el tiempo de exploración de la zona meta (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.725, p = 0.01$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos experimentales (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.876, p = 0.070$ ; Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 1.439, p = 0.160$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.589, p = 0.560$ ). Como indicador adicional de la preferencia por la zona meta, se comparó su exploración porcentual en cada grupo experimental con el porcentaje esperado al **azar** (16.5%; prueba *t-student* con una sola muestra). Se encontró que los animales de todos los grupos experimentales exploraron la zona meta por encima del nivel del azar (Estrés-/VEH:  $t_{(8)} = 3.475, p = 0.008$ ; Estrés+/VEH:  $t_{(8)} = 3.354, p = 0.011$ ; Estrés-/TSA:  $t_{(8)} = 5.152, p < 0.001$ ; Estrés+/TSA:  $t_{(8)} = 6.460, p < 0.001$ ).

#### 4.2.3. Niveles de corticosterona después de la prueba de memoria

Las concentraciones de corticosterona en plasma en los grupos experimentales fueron significativamente diferentes de los valores de línea de base (valores observados en animales inyectados con vehículo 24 horas antes de la recolección de la muestra; ANOVA 1 vía:  $F_{(4, 14)} = 16.379, p < 0.001$ ; Figura 40). Los análisis *post-hoc*

mostraron que los niveles de corticosterona en todos los grupos experimentales fueron superiores a los niveles basales (Estrés-/VEH:  $t = 4.798$ ,  $p = 0.001$ ; Estrés+/VEH:  $t = 7.573$ ,  $p < 0.001$ ; Estrés-/TSA:  $t = 6.252$ ,  $p < 0.001$ ; Estrés+/TSA:  $t = 4.683$ ,  $p < 0.001$ ).

Los niveles de corticosterona en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 40) fueron afectados por la interacción fármaco-estrés ( $F_{(8, 11)} = 7.645$ ,  $p = 0.024$ ), pero no por el estrés ( $F_{(1, 1)} = 0.589$ ,  $p = 0.465$ ) o la TSA ( $F_{(1, 1)} = 0.835$ ,  $p = 0.387$ ) actuando de forma independiente. Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales estresados inyectados con vehículo tuvieron incrementos mayores en las concentraciones de corticosterona (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 2.498$ ,  $p = 0.037$ ), efecto prevenido por la inyección de TSA (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.601$ ,  $p = 0.032$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.309$ ,  $p = 0.227$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 1.413$ ,  $p = 0.195$ ).

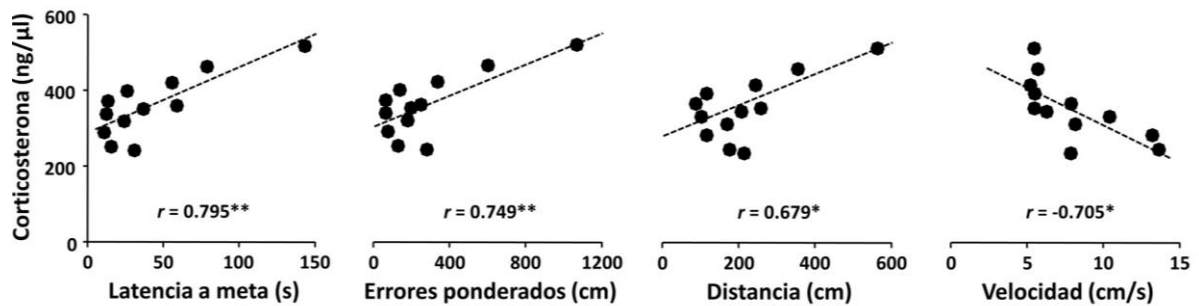


**Figura 40. La TSA previno que el estrés aumentara los niveles de corticosterona inducidos en respuesta a la prueba de memoria.** Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con relación a la línea de base; --- línea de base.

#### 4.2.3.1 Correlaciones entre niveles de corticosterona y desempeño en la prueba

Los niveles de corticosterona en plasma se correlacionaron significativamente con los indicadores comportamentales de la latencia a meta ( $r_{(16)} = 0.795$ ,  $p = 0.002$ ), errores ( $r_{(16)} = 0.775$ ,  $p = 0.003$ ), errores ponderados ( $r_{(16)} = 0.741$ ,  $p = 0.006$ ),

distancia recorrida ( $r_{(16)} = 0.679$ ,  $p = 0.015$ ) y velocidad media de desplazamiento ( $r_{(16)} = -0.705$ ,  $p = 0.011$ ) en la prueba de memoria (Figura 41). No hubo relación entre los niveles de la hormona y la latencia de inicio ( $r = 0.125$ ,  $p = 0.699$ ), el tiempo total de exploración ( $r = 0.483$ ,  $p = 0.111$ ), el tiempo de exploración del agujero meta (total:  $r = 0.059$ ,  $p = 0.854$ ; %:  $r = 0.355$ ,  $p = 0.258$ ) o el tiempo de exploración de la zona meta (total:  $r = 0.156$ ,  $p = 0.627$ ; %:  $r = 0.076$ ,  $p = 0.815$ ).

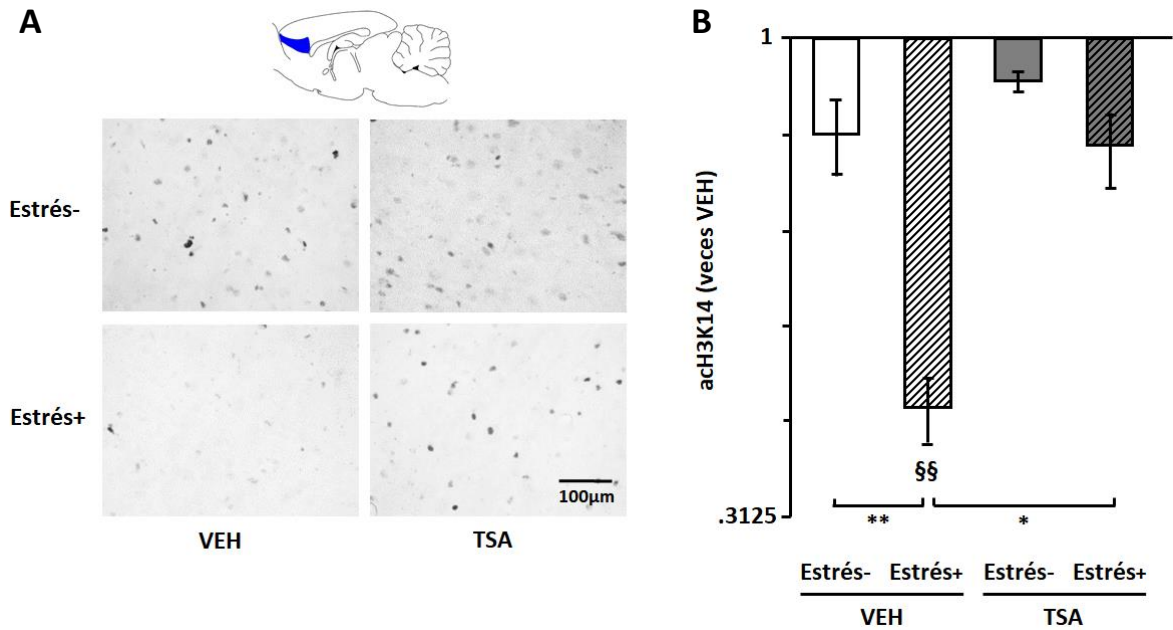


**Figura 41. La concentración de corticosterona en plasma se asoció con el desempeño en la prueba de memoria.** Abreviaturas: \* valores significativos; --- línea de tendencia.

#### 4.2.4. Acetilación de lisina 14 de la histona H3 en tejido cerebral

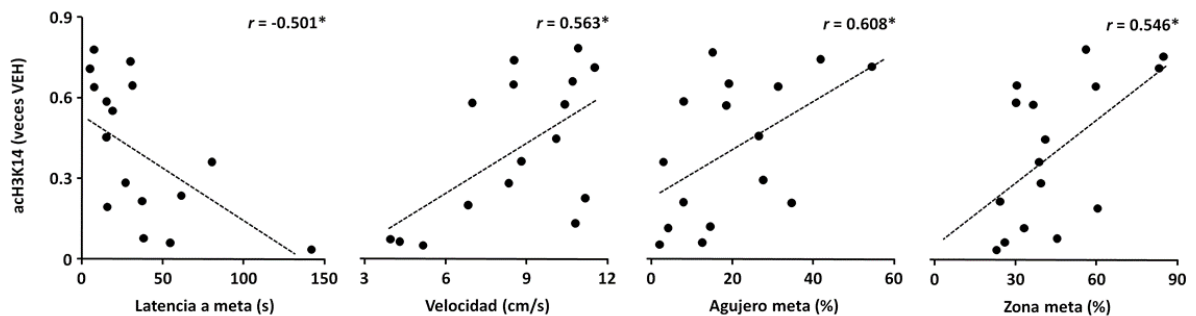
##### 4.2.4.1. Corteza prelímbica

Los niveles de **acH3K14** en la **corteza prelímbica** en los grupos experimentales fueron significativamente diferentes del nivel basal (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 3.708$ ,  $p = 0.027$ ; Figura 42). Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés antes del entrenamiento redujo los niveles de acH3k14 en animales inyectados con vehículo (Estrés+/VEH:  $t = 3.649$ ,  $p = 0.002$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre los grupos experimentales y el nivel basal (Estrés-/VEH:  $t = 1.957$ ,  $p = 0.069$ ; Estrés-/TSA:  $t = 0.983$ ,  $p = 0.341$ ; Estrés+/TSA:  $t = 2.090$ ,  $p = 0.054$ ). El nivel de acH3K14 en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 42) fue afectado por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 11.517$ ,  $p = 0.005$ ) y el estrés ( $F_{(1, 15)} = 14.057$ ,  $p = 0.003$ ), pero no por la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.613$ ,  $p = 0.449$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés en animales inyectados con vehículo redujo los niveles de acH3K14 (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 3.205$ ,  $p = 0.008$ ), efecto prevenido por la TSA (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.953$ ,  $p = 0.012$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.846$ ,  $p = 0.090$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 2.098$ ,  $p = 0.058$ ).



**Figura 42. La TSA previno que el estrés indujera la reducción del nivel de acH3K14 en la corteza prelámbica.** A. Microfotografías ilustrativas de la fascia dentada. B. Nivel de acH3K14. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

Los niveles de **acH3K14** en la corteza prelámbica **correlacionaron** con los indicadores comportamentales (Figura 43) de latencia a meta y ( $r_{(16)} = -0.501, p = 0.048$ ), velocidad ( $r_{(16)} = 0.563, p = 0.023$ ), exploración del agujero meta (tiempo:  $r_{(16)} = 0.582, p = 0.018$ ; porcentaje de tiempo:  $r_{(16)} = 0.608, p = 0.012$ ), exploración de la zona meta (tiempo:  $r_{(16)} = 0.591, p = 0.015$ ; porcentaje de tiempo:  $r_{(16)} = 0.546, p = 0.028$ ) y tiempo total de exploración de los agujeros en el laberinto ( $r_{(16)} = 0.523, p = 0.037$ ) en la **prueba de memoria**.

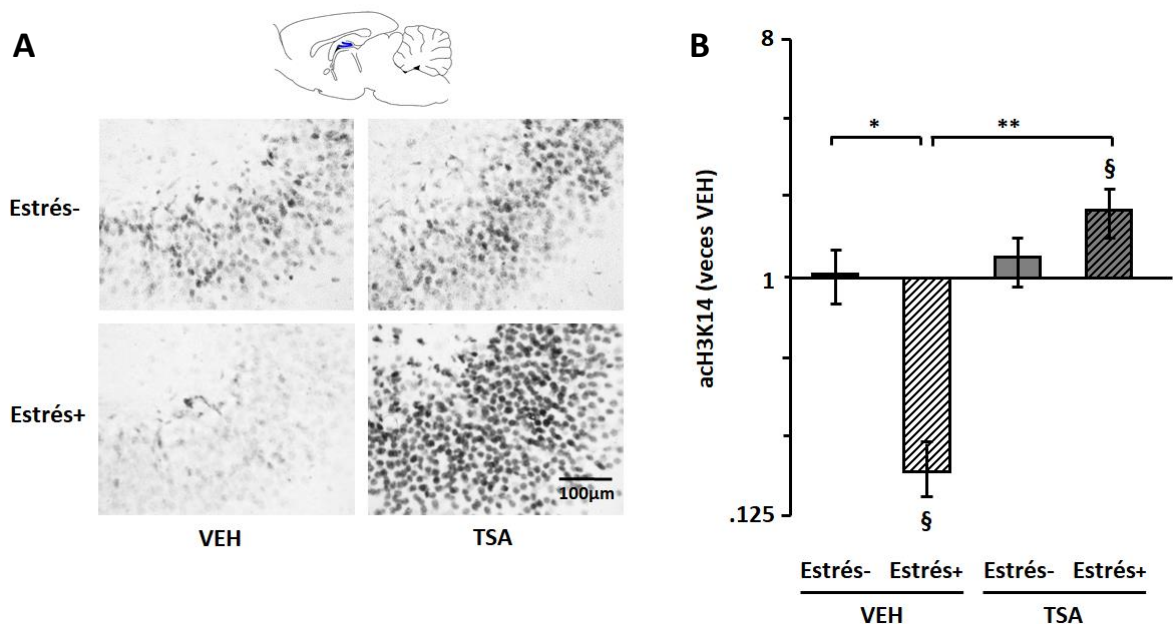


**Figura 43. El nivel de acH3K14 en la corteza prelámbica se asoció con el desempeño durante la prueba de memoria.** Abreviaturas: \* valores significativos; --- línea de tendencia.



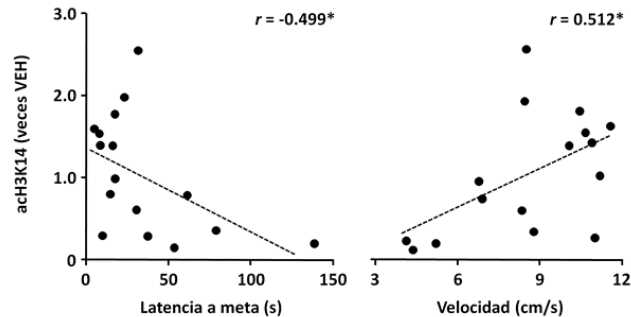
#### 4.2.4.2. Hipocampo

Los niveles de **acH3K14** en la **fascia dentada** en los grupos experimentales difirieron significativamente del nivel basal (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 5.293$ ,  $p = 0.007$ ; Figura 44). Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés antes del entrenamiento redujo los niveles de acH3K14 en animales inyectados con vehículo (Estrés+/VEH:  $t = 2.333$ ,  $p = 0.034$ ); por el contrario, la TSA incrementó los niveles de acH3K14 en animales estresados por encima de la línea de base (Estrés+/TSA:  $t = 2.228$ ,  $p = 0.041$ ). No se observaron cambios en la expresión de acH3K14 en los demás grupos (Estrés-/VEH:  $t = 0.069$ ,  $p = 0.952$ ; Estrés-/TSA:  $t = 0.461$ ,  $p = 0.652$ ). Los niveles de acH3K14 en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 44) fueron afectados por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 11.410$ ,  $p = 0.005$ ) y la interacción entre fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 8.027$ ,  $p = 0.015$ ), pero no por estrés actuando de forma independiente ( $F_{(1, 15)} = 0.182$ ,  $p = 0.677$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés antes del entrenamiento redujo los niveles de acH3K14 (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 2.305$ ,  $p = 0.040$ ), efecto prevenido por la TSA (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 4.392$ ,  $p = 0.001$ ). No se observaron otras diferencias entre grupos (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.385$ ,  $p = 0.707$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 1.702$ ,  $p = 0.115$ ).



**Figura 44. La TSA previno que el estrés agudo indujera la reducción de los niveles de acH3K14 en la fascia dentada.** A. Microfotografías ilustrativas. B. Nivel de acH3K14. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

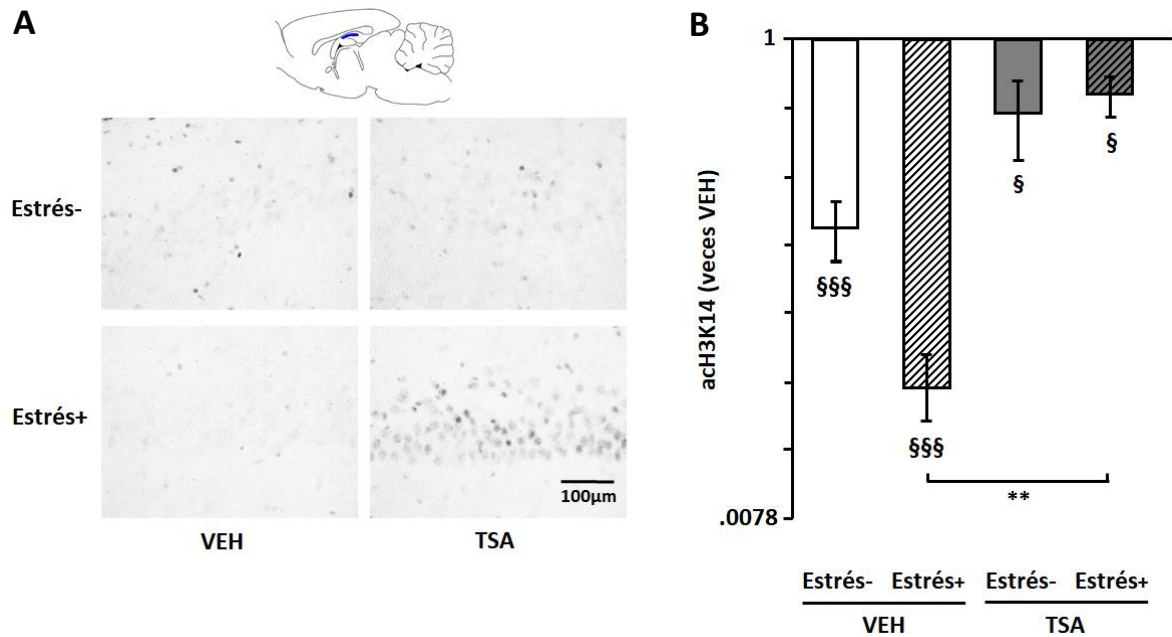
Los niveles de **acH3K14** en la fascia dentada se **correlacionaron** con los indicadores comportamentales de latencia al agujero meta ( $r_{(16)} = -0.499$ ,  $p = 0.050$ ) y la velocidad ( $r_{(16)} = 0.512$ ,  $p = 0.042$ ) en la **prueba de memoria** (Figura 45). No se observaron otras relaciones significativas entre los niveles de acetilación de histonas y los demás indicadores comportamentales en la prueba.



**Figura 45. Los niveles de acH3K14 se asociaron con el desempeño durante la prueba de memoria.** Abreviaturas: \* valores significativos; --- línea de tendencia.

Los niveles de **acH3K14** en **CA1** de los grupos experimentales difirió significativamente de la línea de base (ANOVA 1 vía; ( $F_{(4, 19)} = 8.881$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 46). Los análisis *post-hoc* mostraron que los niveles de acH3K14 en todos los grupos con entrenamiento espacial estuvieron por debajo de los niveles basales (Estrés-/VEH:  $t = 4.676$ ,  $p < 0.001$ ; Estrés+/VEH:  $t = 5.335$ ,  $p < 0.001$ ; Estrés-/TSA:  $t = 2.850$ ,  $p = 0.012$ ; Estrés+/TSA:  $t = 2.305$ ,  $p = 0.035$ ). Los niveles de acH3K14 en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 46) fueron afectados por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 15.681$ ,  $p = 0.002$ ), pero no por el estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.008$ ,  $p = 0.928$ ) o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.965$ ,  $p = 0.354$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que la TSA atenuó la reducción de los niveles de acH3K14 en animales estresados (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 3.495$ ,  $p = 0.004$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos experimentales (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 0.760$ ,  $p = 0.462$ ; Estrés-/TSA vs Estrés-/TSA:  $t = 0.148$ ,  $p = 0.541$ ; Estrés-/VEH vs Estrés-/TSA:  $t = 2.105$ ,  $p = 0.057$ ).

No se observaron **correlaciones** significativas entre los niveles de **ach3K14** en **CA1** y los indicadores comportamentales durante la **prueba de memoria**.

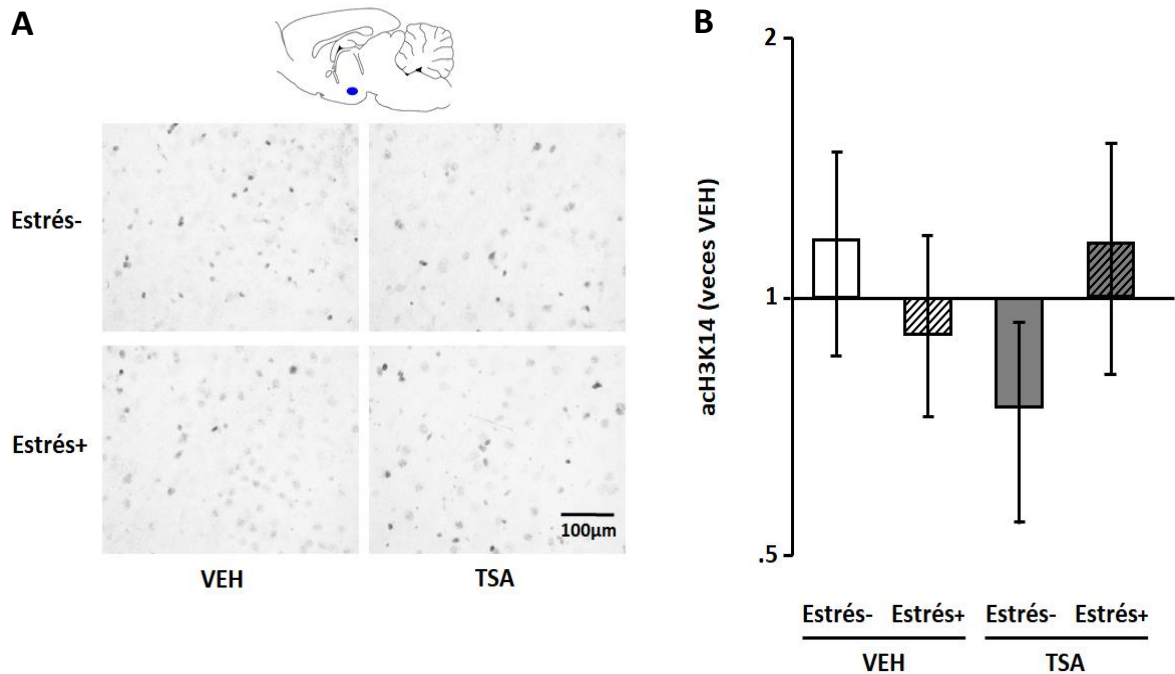


**Figura 46. La TSA aminoró la reducción en los niveles de ach3K14 en CA1 en animales estresados.** A. Microfotografías ilustrativas. B. Nivel de ach3K14. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

#### 4.2.4.3. Amígdala

Los niveles de ach3K14 en el **núcleo basolateral** de la amígdala en los grupos experimentales no fue significativamente diferente del nivel basal ( $F_{(4, 19)} = 0.383$ ,  $p = 0.817$ ; Figura 47). Los niveles de ach3K14 en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 47) no fueron alterados por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.101$ ,  $p = 0.756$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.077$ ,  $p = 0.786$ ) o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.255$ ,  $p = 0.284$ ).

No se observaron **correlaciones** significativas entre los niveles de **ach3K14** en núcleo basolateral de la **amígdala** y los indicadores comportamentales durante la **prueba de memoria**.

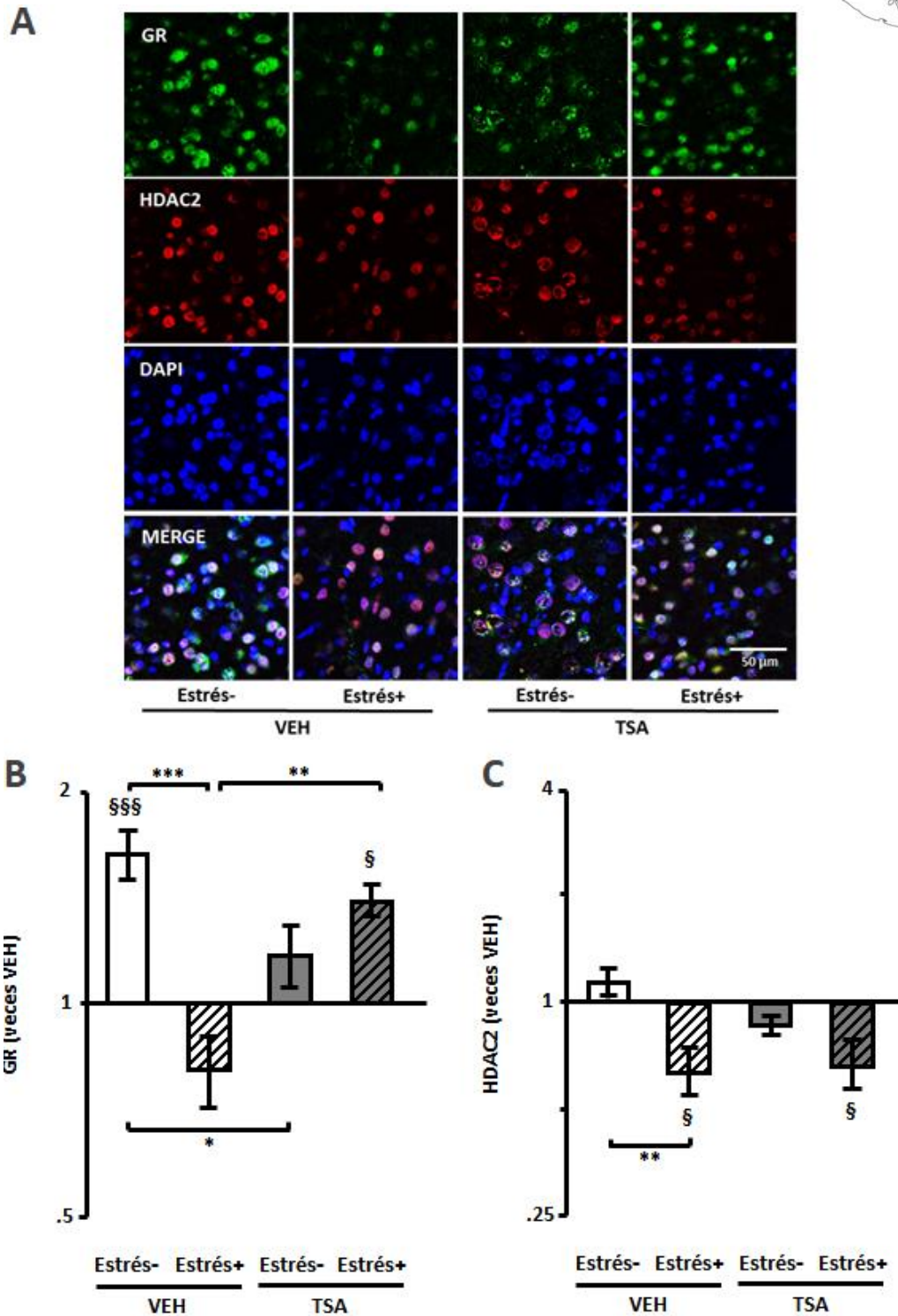
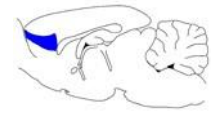


**Figura 47. Los tratamientos experimentales no afectaron los niveles de acH3K14 en el núcleo basolateral de la amígdala.** A. Microfotografías ilustrativas. B. Nivel de acH3K14. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

#### 4.2.5. Expresión y co-localización de GR y HDAC2 en tejido cerebral

##### 4.2.5.1. Corteza Prelímbica

La **expresión de GR** en la **corteza prelímbica** en los grupos experimentales fue significativamente diferente de la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 9.810$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 48). Los análisis *post-hoc* mostraron que el entrenamiento en la tarea espacial incrementó la expresión de GR (Estrés-/VEH:  $t = 4.305$ ,  $p < 0.001$ ), así como la administración de TSA a animales estresados antes del entrenamiento (Estrés+/TSA:  $t = 2.748$ ,  $p = 0.014$ ). La expresión de GR en los otros grupos no fue diferente de la línea de base (Estrés+/VEH:  $t = 1.310$ ,  $p = 0.210$ ; Estrés-/TSA:  $t = 1.158$ ,  $p = 0.265$ ). La expresión de GR en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 48B) fue alterada por el estrés ( $F_{(1, 15)} = 6.974$ ,  $p = 0.022$ ) y la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 22.341$ ,  $p < 0.001$ ) pero no por el tratamiento farmacológico actuando de forma independiente ( $F_{(1, 15)} = 0.358$ ,  $p = 0.561$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés antes del entrenamiento redujo la expresión de GR (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 5.210$ ,  $p < 0.001$ ), y que la TSA previno ese efecto



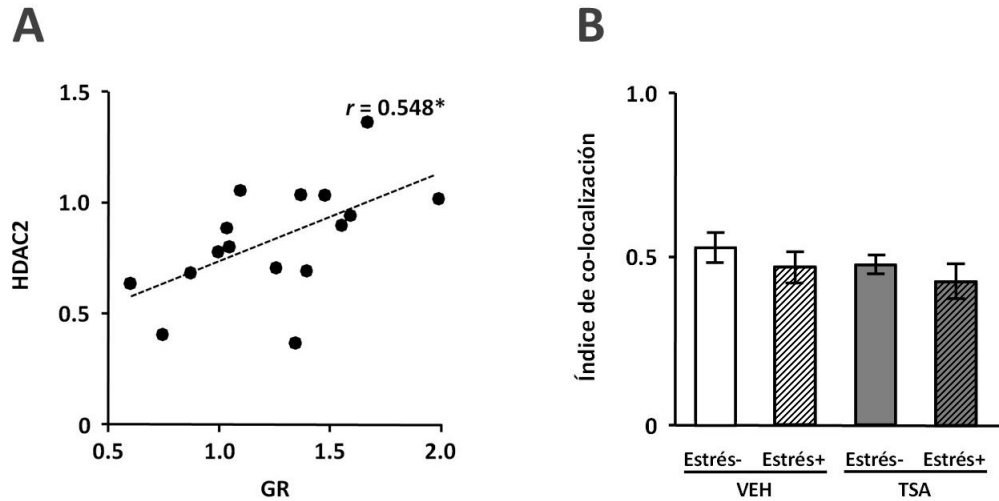
**Figura 48. La TSA evitó que el estrés indujera la reducción en la expresión de GR, pero no de HDAC2, en la corteza prelímbica.** A. Imágenes representativas. B. Nivel de expresión de GR. C. Nivel de expresión de HDAC2. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

(Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 3.765$ ,  $p = 0.003$ ). La TSA redujo la expresión de GR en animales no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 2.919$ ,  $p = 0.013$ ), pero no hubo observaron diferencias entre animales estresados y no estresados tratados con TSA (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 1.475$ ,  $p = 0.166$ ).

La expresión de **GR** en la **corteza prelímbica** se asoció positivamente con la velocidad de desplazamiento en la **prueba de memoria** ( $r_{(16)} = 0.674$ ,  $p = 0.004$ ); sin embargo, no se observaron otras relaciones significativas entre la expresión de GR y el comportamiento.

La **expresión de HDAC2** en la **corteza prelímbica** en los grupos experimentales fue diferente de la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 5.611$ ,  $p = 0.006$ ; Figura 48C). Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés antes del entrenamiento espacial redujo la expresión de HDAC2, independientemente de si recibieron vehículo (Estrés+/VEH:  $t = 2.883$ ,  $p = 0.011$ ) o TSA (Estrés+/TSA:  $t = 2.686$ ,  $p = 0.016$ ). Los otros grupos experimentales no mostraron cambios respecto al nivel basal (Estrés-/VEH:  $t = 0.972$ ,  $p = 0.346$ ; Estrés-/TSA:  $t = 0.957$ ,  $p = 0.354$ ). La expresión de HDAC2 en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 48C) fue alterada por el estrés ( $F_{(1, 15)} = 12.823$ ,  $p < 0.001$ ), pero no por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 1.234$ ,  $p = 0.288$ ) o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.858$ ,  $p = 0.198$ ) no tuvo efectos. Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés redujo la expresión de HDAC2 en animales inyectados con vehículo (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 3.496$ ,  $p = 0.004$ ) y TSA (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 0.178$ ,  $p = 0.861$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre pares de grupos experimentales (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.749$ ,  $p = 0.106$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 1.568$ ,  $p = 0.143$ ). La expresión de la **HDAC2** en la corteza prelímbica no **correlacionó** significativamente con ningún indicador comportamental en la **prueba de memoria**.

La expresión de **GR correlacionó** positivamente con la expresión de **HDAC2** en la corteza prelímbica (Figura 49A;  $r_{(16)} = 0.795$ ,  $p < 0.001$ ). Sin embargo, la **co-localización** de GR y HDAC2 (Figura 49B; ANOVA 2 vías), no fue alterada por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 1.209$ ,  $p = 0.293$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.716$ ,  $p = 0.215$ ), o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.007$ ,  $p = 0.932$ ).

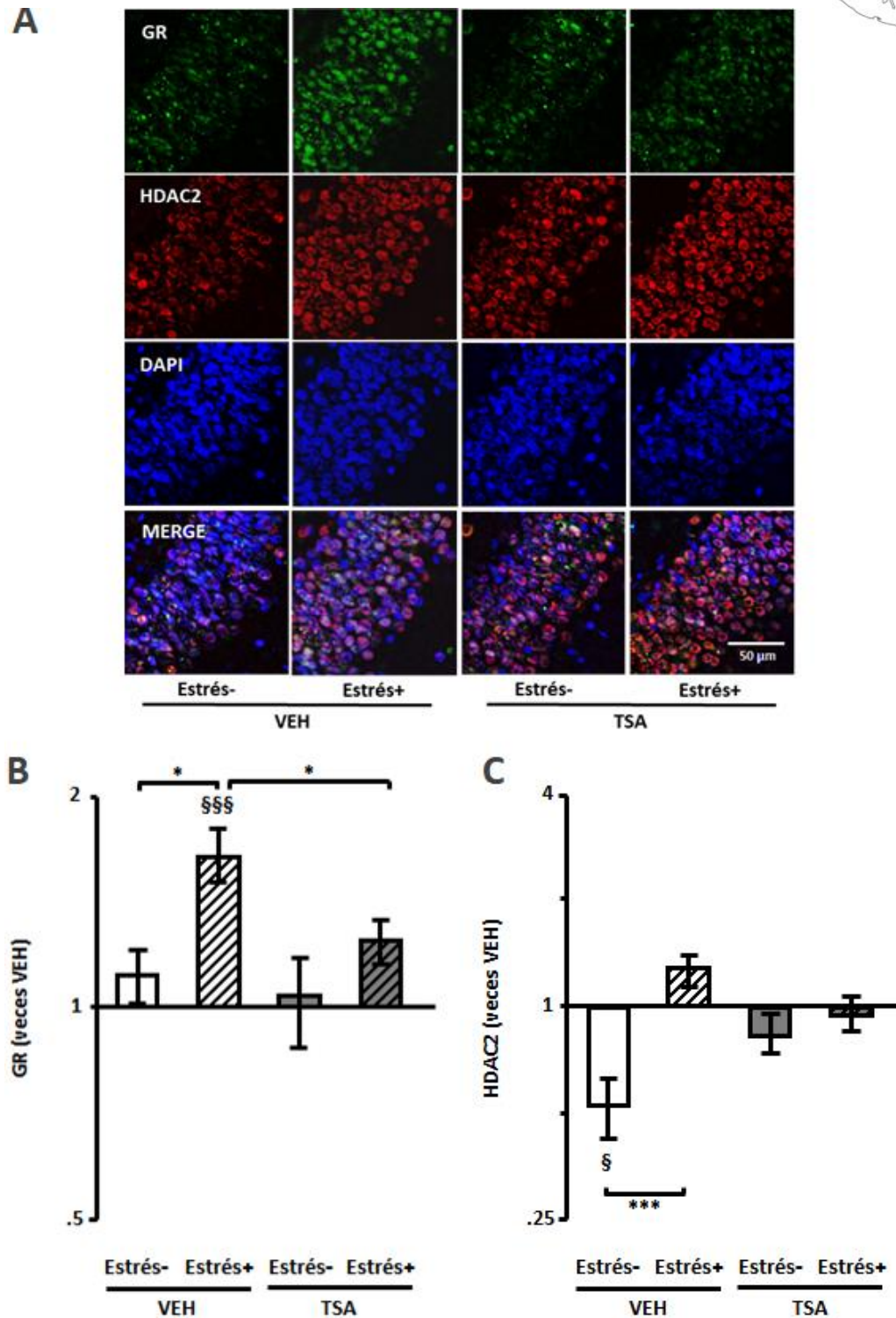
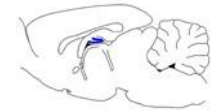


**Figura 49. La expresión de GR y HDAC2 correlacionó positivamente en la corteza prelímbica, pero los tratamientos experimentales no afectaron su co-localización.** A. Correlación entre niveles de expresión. B. Co-localización de proteínas en el núcleo. Abreviaturas: \* valores significativos; --- línea de tendencia.

#### 4.2.5.2. Hipocampo

La **expresión de GR** en la **fascia dentada** de los grupos experimentales fue significativamente diferente de la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 3.563$ ,  $p = 0.013$ ; Figura 50B). Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés antes del entrenamiento redujo la expresión de GR (Estrés+/VEH:  $t = 3.706$ ,  $p = 0.002$ ). No se observaron cambios en la expresión de GR en los demás grupos experimentales comparados con el nivel basal (Estrés-/VEH:  $t = 0.632$ ,  $p = 0.537$ ; Estrés-/TSA:  $t = 0.185$ ,  $p = 0.856$ ; Estrés+/TSA:  $t = 1.430$ ,  $p = 0.173$ ). La expresión de GR en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 50B) fue alterada por el estrés ( $F_{(1, 15)} = 8.677$ ,  $p = 0.012$ ), pero no por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 3.447$ ,  $p = 0.088$ ) o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.556$ ,  $p = 0.236$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés indujo un incremento en la expresión de GR (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 2.965$ ,  $p = 0.012$ ), y que la TSA previno tal efecto (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.195$ ,  $p = 0.049$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre pares de grupos experimentales (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.431$ ,  $p = 0.674$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 1.201$ ,  $p = 0.253$ ).

La expresión de **GR** en la **fascia dentada** no **correlacionó** con ningún indicador comportamental durante la **prueba de memoria**.



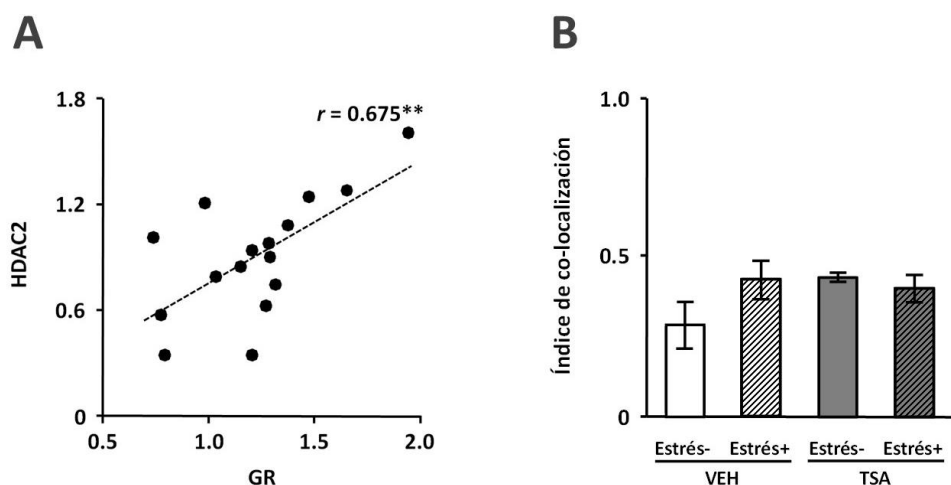
**Figura 50. La TSA evitó que el estrés incrementara la expresión de GR, pero no de HDAC2 en la fascia dentada.** A. Imágenes representativas. B. Nivel de expresión de GR. C. Nivel de expresión de HDAC2. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.



La **expresión de HDAC2** en la **fascia dentada** en los grupos experimentales fue significativamente diferente de la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 4.795$ ,  $p = 0.011$ ; Figura 50C). Los análisis *post-hoc* mostraron que el entrenamiento espacial redujo la expresión de HDAC2 (Estrés+/VEH:  $t = 2.738$ ,  $p = 0.015$ ), mientras que los otros grupos mostraron niveles comparables al basal (Estrés-/TSA:  $t = 0.856$ ,  $p = 0.406$ ; Estrés+/TSA:  $t = 0.174$ ,  $p = 0.864$ ; Estrés-/VEH:  $t = 1.528$ ,  $p = 0.147$ ). La expresión de HDAC2 en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 50C) fue alterada por el estrés ( $F_{(1, 15)} = 14.744$ ,  $p = 0.002$ ) y la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 7.736$ ,  $p = 0.017$ ), pero no el tratamiento farmacológico actuando de forma independiente ( $F_{(1, 15)} = 0.019$ ,  $p = 0.891$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés evitó la reducción en la expresión de HDAC2 observada en los animales entrenados (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 4.682$ ,  $p < 0.001$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre pares de grupos experimentales (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 1.867$ ,  $p = 0.086$ ; Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 2.066$ ,  $p = 0.061$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.748$ ,  $p = 0.469$ ).

No se encontró **correlación** significativa entre la expresión de HDAC2 en la **fascia dentada** y los indicadores comportamentales durante la **prueba de memoria**.

La expresión de **GR correlacionó** de forma positiva con la expresión de **HDAC2** en la fascia dentada (Figura 51A;  $r_{(16)} = 0.675$ ,  $p = 0.004$ ). Sin embargo, la co-localización de GR y HDAC2 (Figura 51B) no fue alterada por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 1.471$ ,  $p = 0.248$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.218$ ,  $p = 0.291$ ), o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 3.347$ ,  $p = 0.092$ ).

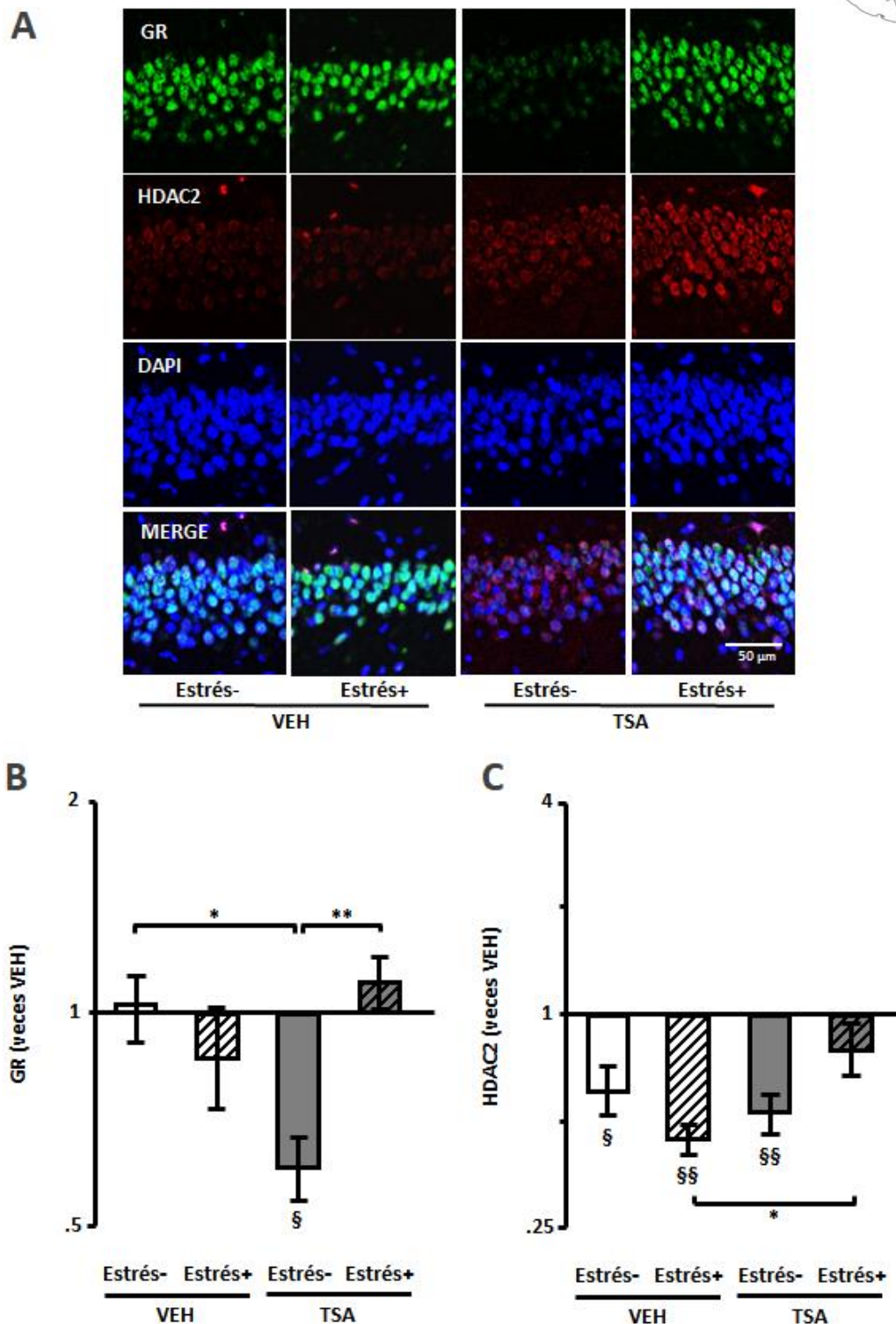


**Figura 51. La expresión de GR y HDAC2 correlacionó positivamente en la fascia dentada, pero los tratamientos experimentales no alteraron su co-localización.** A. Correlación entre niveles de expresión. B. Co-localización de proteínas en el núcleo. Abreviaturas: \* valores significativos; --- línea de tendencia.

La **expresión de GR** en **CA1** en los grupos experimentales fue significativamente diferente de la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 3.305$ ,  $p = 0.039$ ; Figura 52B). Los análisis *post-hoc* mostraron que la TSA redujo la expresión de receptores GR por debajo del nivel basal (Estrés-/TSA:  $t = 2.631$ ,  $p = 0.019$ ). Los otros grupos experimentales mostraron valores que no fueron significativamente diferentes del basal (Estrés+/VEH:  $t = 0.907$ ,  $p = 0.379$ ; Estrés+/TSA:  $t = 0.654$ ,  $p = 0.523$ ; Estrés-/VEH:  $t = 0.081$ ,  $p = 0.937$ ). La expresión de GR en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 52B) fue alterada por la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 8.834$ ,  $p = 0.012$ ), pero no por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.642$ ,  $p = 0.439$ ) o el estrés ( $F_{(1, 15)} = 2.554$ ,  $p = 0.136$ ) actuando de forma independiente. Los análisis *post-hoc* mostraron que la TSA redujo la expresión de GR en animales no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 2.668$ ,  $p = 0.020$ ), teniendo efectos distintos en animales estresados y no estresados (Estrés+/TSA vs Estrés-/TSA:  $t = 3.232$ ,  $p = 0.007$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos experimentales (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 1.535$ ,  $p = 0.151$ ; Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 0.972$ ,  $p = 0.350$ ).

La expresión de **GR** en **CA1** no **correlacionó** de forma significativa con ningún indicador comportamental durante la **prueba de memoria**.

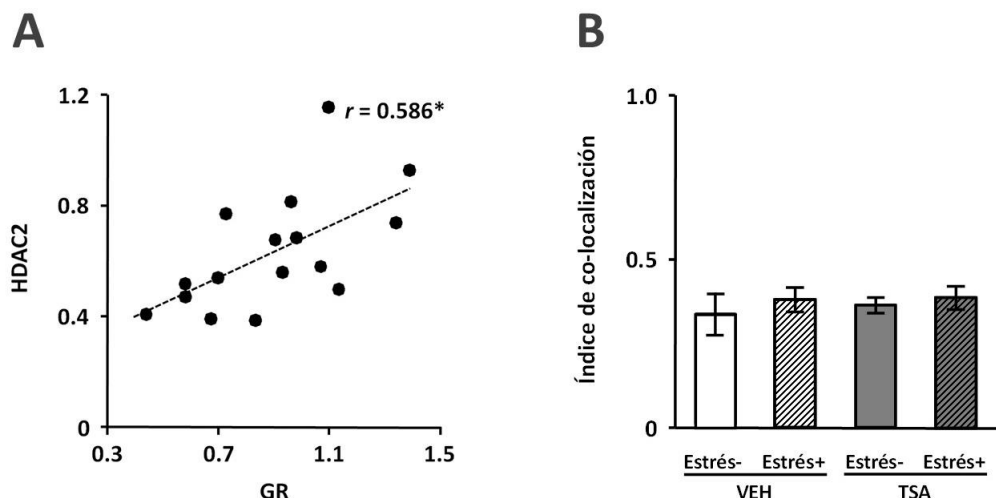
La **expresión de HDAC2** en **CA1** en los grupos experimentales fue diferente de la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 4.883$ ,  $p = 0.010$ ; Figura 52C). Los análisis *post-hoc* mostraron que el entrenamiento (Estrés+/VEH:  $t = 2.587$ ,  $p = 0.020$ ), el estrés antes del entrenamiento (Estrés+/VEH:  $t = 3.866$ ,  $p = 0.001$ ) y la TSA administrada después del entrenamiento (Estrés-/TSA:  $t = 3.277$ ,  $p = 0.005$ ) redujeron la expresión de HDAC2. Solo en los animales entrenados después del estrés y tratados con TSA no mostraron cambios en la expresión de HDAC2 con respecto a la línea de base (Estrés-/VEH:  $t = 1.282$ ,  $p = 0.219$ ). La expresión de HDAC2 en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 52C) fue alterada por la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 5.858$ ,  $p = 0.032$ ), pero no por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 1.960$ ,  $p = 0.187$ ) o el estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.281$ ,  $p = 0.606$ ) actuando de forma independiente. Los análisis *post-hoc* mostraron que la TSA previno la reducción de los niveles de HDAC2 inducida por estrés (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.701$ ,  $p = 0.019$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre pares de grupos experimentales (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 0.530$ ,  $p = 0.606$ ; Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.722$ ,  $p = 0.484$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 2.086$ ,  $p = 0.059$ ).



**Figura 52. La TSA redujo la expresión de GR en CA1, mientras previno el decremento en la expresión de HDAC2 en animales estresados. A.** Imágenes representativas. **B.** Nivel de expresión de GR. **C.** Nivel de expresión de HDAC2. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

No se encontró **correlación** entre la expresión de HDAC2 en **CA1** y los indicadores comportamentales durante la **prueba de memoria**

La expresión de **GR** **correlacionó** positivamente con la expresión de **HDAC2** en **CA1** ( $r_{(16)} = 0.586$ ,  $p < 0.017$ ; Figura 53A). Sin embargo, la co-localización de GR y HDAC2 (Figura 53B) no fue alterada por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.197$ ,  $p = 0.665$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.525$ ,  $p = 0.483$ ), o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.103$ ,  $p = 0.754$ ).

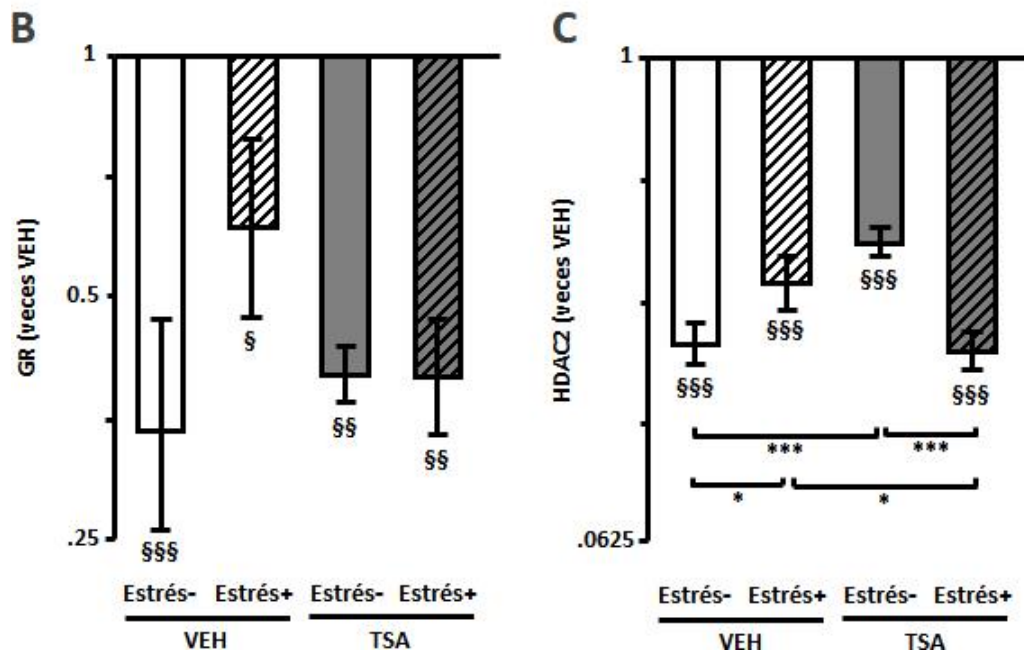
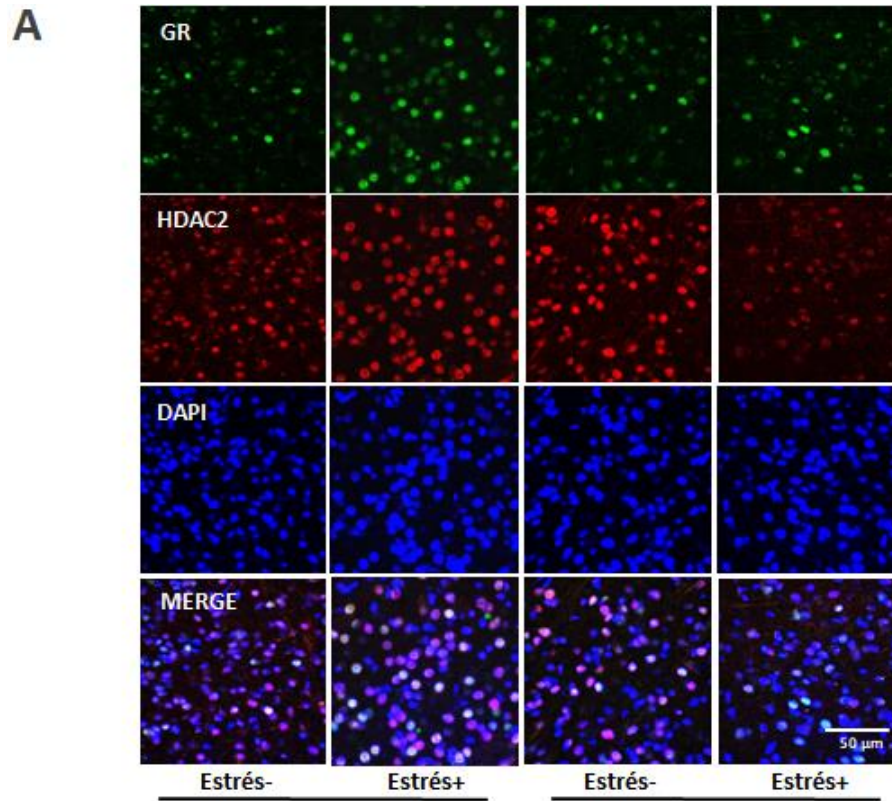
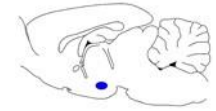


**Figura 53. La expresión de GR y de HDAC2 correlacionó significativamente en CA1, pero los tratamientos experimentales no alteraron su co-localización.** A. Correlación entre niveles de expresión. B. Co-localización de proteínas en el núcleo. Abreviaturas: \* valores significativos; --- línea de tendencia.

#### 4.2.5.3. Amígdala

La expresión de **GR** en el **núcleo basolateral de la amígdala** en los grupos experimentales fue significativamente diferente de los valores de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 6.447$ ,  $p = 0.003$ ; Figura 54B). Los análisis *post-hoc* mostraron que todos los grupos experimentales tuvieron una reducción en la expresión de GR (Estrés-/VEH:  $t = 4.229$ ,  $p < 0.001$ ; Estrés-/TSA:  $t = 4.035$ ,  $p = 0.001$ ; Estrés+/TSA:  $t = 4.055$ ,  $p = 0.001$ ; Estrés+/VEH:  $t = 2.548$ ,  $p = 0.022$ ). La expresión de GR en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 54B) no fue alterada por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.720$ ,  $p = 0.413$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.154$ ,  $p = 0.304$ ) o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.210$ ,  $p = 0.293$ ).

La expresión de **GR** en la **amígdala** basolateral correlacionó con la latencia a la meta ( $r_{(16)} = 0.529$ ,  $p = 0.035$ ) en la **prueba de memoria**; sin embargo, no se observaron relaciones significativas entre GR y otros indicadores comportamentales.

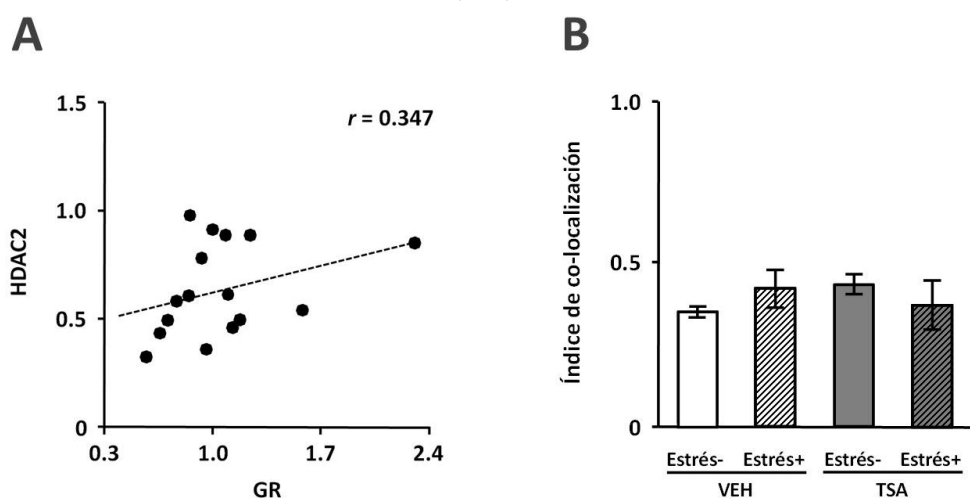


**Figura 54.** El entrenamiento espacial redujo la expresión de GR y HDAC2 en la amígdala. La TSA atenuó los efectos del estrés sobre la expresión de HDAC2. A. Imágenes representativas. B. Nivel de expresión de GR. C. Nivel de expresión de HDAC2. Resultados expresados como veces del nivel basal. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

La **expresión de HDAC2** en la **amígdala basolateral** en los grupos experimentales fue significativamente diferente de la línea de base (ANOVA 1 vía; ( $F_{(4, 19)} = 36.587, p < 0.001$ ; Figura 54C). Los análisis *post-hoc* mostraron que todos los grupos entrenados en la tarea espacial redujeron la expresión de HDAC2 (Estrés-/VEH:  $t = 10.074, p < 0.001$ ; Estrés-/TSA:  $t = 8.129, p < 0.001$ ; Estrés+/TSA:  $t = 10.240, p < 0.001$ ; Estrés+/VEH:  $t = 9.047, p < 0.001$ ). La expresión de HDAC2 en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 54C) fue alterada por la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 22.382, p < 0.001$ ), pero no por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 1.285, p = 0.279$ ), o el estrés ( $F_{(1, 15)} = 2.667, p = 0.128$ ) actuando de forma independiente. Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés antes del entrenamiento incrementó la expresión de HDAC2 (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 2.191, p = 0.049$ ), este efecto fue prevenido por la TSA (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.544, p = 0.026$ ). La TSA atenuó el decremento en la expresión de HDAC2 en animales no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 4.147, p = 0.001$ ), y los efectos de la TSA fueron diferentes en animales estresados y no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 4.500, p < 0.001$ ).

La expresión de **HDAC2** en la **amígdala basolateral** no **correlacionó** con ningún indicador comportamental durante la **prueba de memoria**.

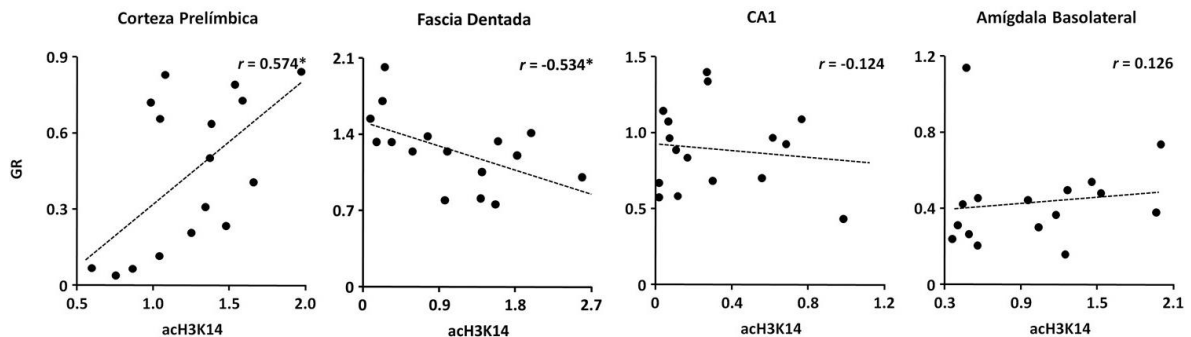
La expresión de **GR** no **correlacionó** con **HDAC2** en la amígdala ( $r_{(16)} = 0.347, p = 0.188$ ; Figura 55A) y su **co-localización** (Figura 55B) no fue alterada por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.174, p = 0.684$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.021, p = 0.887$ ), o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.687, p = 0.218$ ).



**Figura 55. La expresión de GR y HDAC2 no se asoció en la amígdala basolateral. Los tratamientos experimentales no alteraron la co-localización de GR y HDAC2.** A. Correlación entre niveles de expresión. B. Co-localización de proteínas en el núcleo. Abreviaturas: \* valores significativos; --- línea de tendencia.

#### 4.2.5.4. Asociación entre acH3K14, GR y HDAC2

Los niveles de **acH3K14** **correlacionaron** significativamente con la expresión de **GR** (Figura 56) en la corteza prelámbica ( $r_{(16)} = 0.574$ ,  $p = 0.020$ ) y la fascia dentada ( $r_{(16)} = -0.534$ ,  $p = 0.033$ ), pero no en CA1 ( $r_{(16)} = -0.124$ ,  $p = 0.648$ ) o la amígdala basolateral ( $r_{(16)} = 0.126$ ,  $p = 0.643$ ). No se encontró correlación significativa entre los niveles de **acH3K14** y **HDAC2** en la corteza prelámbica ( $r_{(16)} = 0.411$ ,  $p = 0.114$ ), el hipocampo (fascia dentada:  $r_{(16)} = -0.134$ ,  $p = 0.622$ ; CA1:  $r_{(16)} = -0.281$ ,  $p = 0.293$ ) o la amígdala ( $r_{(16)} = -0.402$ ,  $p = 0.123$ ).



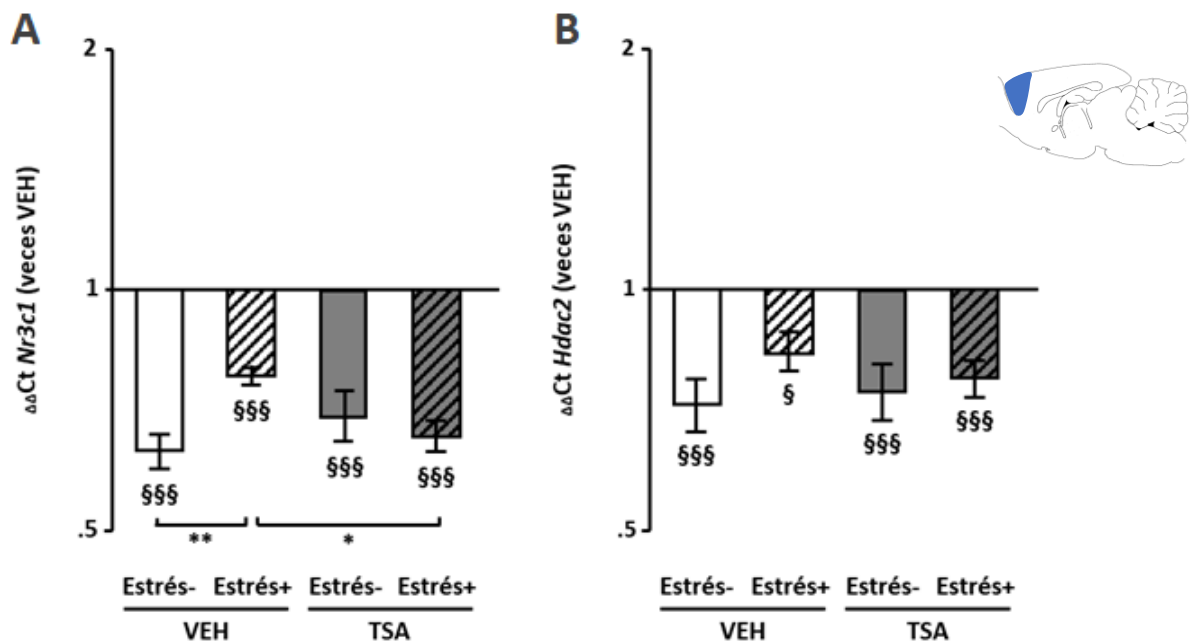
**Figura 56.** La expresión de GR se asoció de forma significativa con la expresión de acH3K14 en la corteza prelámbica y la fascia dentada. Abreviaturas: \* valores significativos; --- línea de tendencia.

#### 4.2.6. Expresión génica en tejido cerebral

##### 4.2.6.1. Corteza prefrontal

La expresión de **Nr3c1** en la corteza prefrontal fue diferente en los grupos experimentales comparados con la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 13.785$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 57A). Los análisis *post-hoc* mostraron una reducción en la transcripción en todos los grupos (Estrés-/VEH:  $t = 6.510$ ,  $p < 0.001$ ; Estrés+/VEH:  $t = 3.923$ ,  $p = 0.001$ ; Estrés-/TSA:  $t = 5.254$ ,  $p < 0.001$ ; Estrés+/TSA:  $t = 6.076$ ,  $p < 0.001$ ). La transcripción de **Nr3c1** en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 57A) fue alterada por la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 8.795$ ,  $p = 0.012$ ), pero no por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.609$ ,  $p = 0.450$ ) o el estrés ( $F_{(1, 15)} = 2.360$ ,  $p = 0.150$ ) actuando de forma independiente. Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés atenúo el decremento en la transcripción de **Nr3c1** inducido por el entrenamiento (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 3.183$ ,  $p = 0.008$ ), efecto prevenido por la TSA (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.649$ ,  $p = 0.021$ ). No se observaron otras diferencias significativas entre grupos (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.545$ ,  $p = 0.148$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 1.011$ ,  $p = 0.332$ ).

La expresión del gen **Hdac2** en la corteza prefrontal en los grupos entrenados en la tarea espacial fue significativamente diferente de la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 6.189$ ,  $p = 0.004$ ; Figura 57B). Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales de todos los grupos experimentales redujeron la transcripción del gen (Estrés-/VEH:  $t = 4.453$ ,  $p < 0.001$ ; Estrés+/VEH:  $t = 2.599$ ,  $p = 0.020$ ; Estrés-/TSA:  $t = 3.975$ ,  $p = 0.001$ ; Estrés+/TSA:  $t = 3.457$ ,  $p = 0.003$ ). Sin embargo, la transcripción de **Hdac2** en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 57B) no fueron efectos significativamente alterados por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.059$ ,  $p = 0.811$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 2.316$ ,  $p = 0.154$ ) o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.736$ ,  $p = 0.408$ ).



**Figura 57. El entrenamiento espacial redujo a largo plazo la transcripción de *Nr3c1* y *Hdac2* en la corteza prefrontal. La TSA revirtió el efecto del estrés en la transcripción de *Nr3c1*.** A. Expresión relativa de *Nr3c1*. B. Expresión relativa de *Hdac2*. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

La transcripción de ***Nr3c1*** y ***Hdac2*** **correlacionó** de forma significativa en la **corteza prelímbica** ( $r_{(16)} = 0.697$ ,  $p = 0.002$ ).

Para analizar el efecto de los tratamientos experimentales sobre marcadores de plasticidad sináptica, se evaluó la transcripción de genes que codifican para las subunidades NR1 (*Grin1*), NR2A (*Grin2a*) y NR2B (*Grin2b*) del receptor **NMDA**.

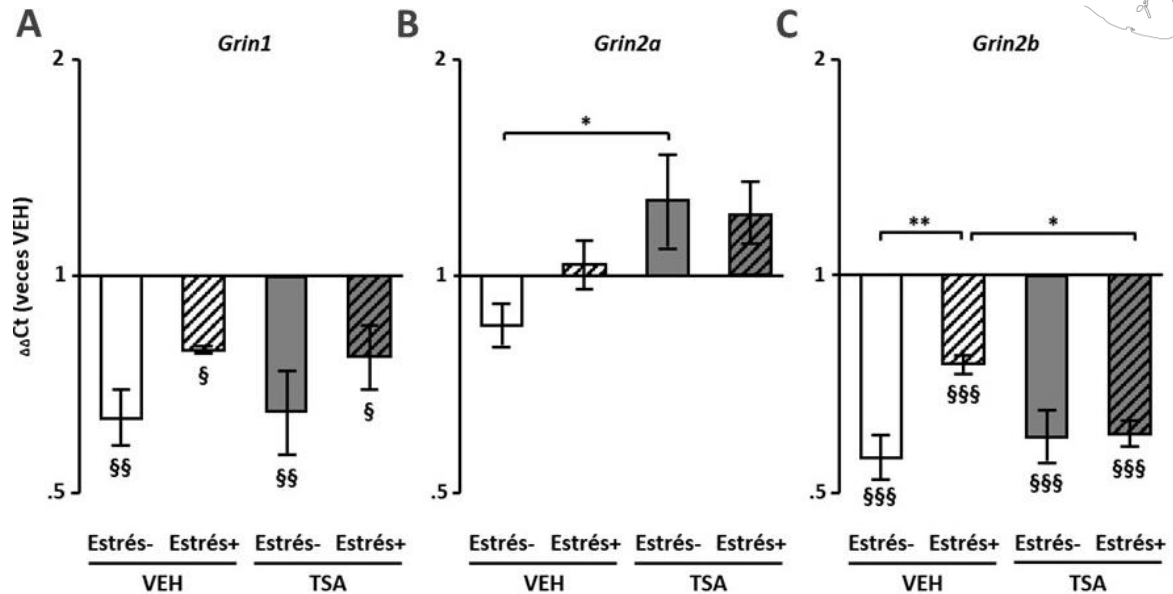
La expresión de ***Grin1*** en la corteza prefrontal difirió en los grupos de animales entrenados con respecto a la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 4.968$ ,  $p = 0.009$ ;



Figura 58A). Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales de todos los grupos redujeron la transcripción del gen (Estrés-/VEH:  $t = 3.933$ ,  $p = 0.001$ ; Estrés+/VEH:  $t = 2.417$ ,  $p = 0.028$ ; Estrés-/TSA:  $t = 3.775$ ,  $p = 0.001$ ; Estrés+/TSA:  $t = 2.459$ ,  $p = 0.026$ ). Sin embargo, la expresión de *Grin1* en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 58A) no fue alterada por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 8.795$ ,  $p = 0.012$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.609$ ,  $p = 0.450$ ), o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 2.360$ ,  $p = 0.150$ ).

La expresión de ***Grin2a*** en la corteza no fue significativamente diferente de la línea de base en los grupos experimentales con entrenamiento en la tarea espacial (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 2.079$ ,  $p = 0.135$ ; Figura 58B). Sin embargo, la transcripción de *Grin2a* en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 58B) fue alterada por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 5.642$ ,  $p = 0.035$ ), pero no por el estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.219$ ,  $p = 0.648$ ), o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.859$ ,  $p = 0.372$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que la TSA incrementó la expresión de *Grin2a* (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 2.335$ ,  $p = 0.038$ ). No se encontraron otras diferencias significativas entre pares de grupos (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 0.986$ ,  $p = 0.344$ ; Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 1.024$ ,  $p = 0.326$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.325$ ,  $p = 0.751$ ).

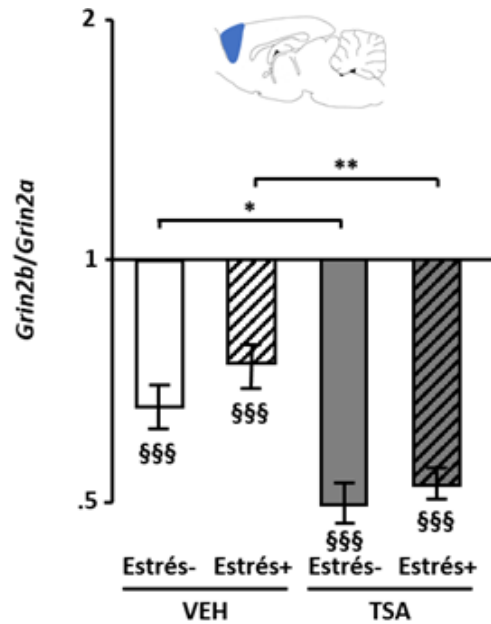
La expresión del gen ***Grin2b*** en la corteza prefrontal en los grupos experimentales entrenados en la tarea espacial mostró diferencias significativas con la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 20.733$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 58C). Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales de todos los grupos redujeron la transcripción del gen (Estrés-/VEH:  $t = 7.949$ ,  $p < 0.001$ ; Estrés+/VEH:  $t = 4.591$ ,  $p < 0.001$ ; Estrés-/TSA:  $t = 7.117$ ,  $p < 0.001$ ; Estrés+/TSA:  $t = 6.898$ ,  $p < 0.001$ ). La expresión de *Grin2b* en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 58C) fue alterada por el estrés ( $F_{(1, 15)} = 6.884$ ,  $p = 0.022$ ) y la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 5.298$ ,  $p = 0.040$ ), pero no por el tratamiento farmacológico actuando de forma independiente ( $F_{(1, 15)} = 1.171$ ,  $p = 0.300$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés atenuó la reducción en la expresión de *Grin2b* inducida por el entrenamiento espacial (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 3.483$ ,  $p = 0.005$ ), efecto prevenido por la TSA (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.393$ ,  $p = 0.034$ ). No se encontraron otras diferencias significativas entre pares de grupos (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 0.862$ ,  $p = 0.405$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.228$ ,  $p = 0.824$ ).



**Figura 58. El entrenamiento espacial redujo la transcripción de *Grin1* y *Grin2b* en la corteza prefrontal. La TSA previno el efecto del estrés sobre la transcripción de *Grin2b*.** A. Expresión relativa de *Grin1*. B. Expresión relativa de *Grin2a*. C. Expresión relativa de *Grin2b*. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

Se encontró una **correlación** significativa entre la expresión de *Grin1* y *Grin2a* ( $r_{(16)} = 0.600$ ,  $p = 0.014$ ) y de *Grin1* y *Grin2b* ( $r_{(16)} = 0.707$ ,  $p = 0.002$ ), pero no de *Grin2a* y *Grin2b* ( $r_{(16)} = 0.480$ ,  $p = 0.059$ ), en la corteza prefrontal.

La **expresión relativa de *Grin2b* con relación a *Grin2a*** ( $Grin2b/Grin2a$ ) mostró diferencias significativas entre los grupos que recibieron entrenamiento en la tarea espacial y la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 24.438$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 59). Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales de todos los grupos experimentales redujeron significativamente la transcripción de *Grin2b* en proporción con la de *Grin2a* (Estrés-/VEH:  $t = 5.853$ ,  $p < 0.001$ ; Estrés+/VEH:  $t = 4.543$ ,  $p < 0.001$ ; Estrés-/TSA:  $t = 8.662$ ,  $p < 0.001$ ; Estrés+/TSA:  $t = 8.256$ ,  $p < 0.001$ ). La razón  $Grin2b/Grin2a$  en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 59) fue alterada por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 24.832$ ,  $p < 0.001$ ), pero no por el estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.721$ ,  $p = 0.214$ ) o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.477$ ,  $p = 0.503$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que la TSA en animales estresados (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 4.012$ ,  $p = 0.002$ ) y no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 3.035$ ,  $p = 0.010$ ) acentuó la reducción relativa de *Grin2b*. No se observaron otras diferencias entre grupos (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 1.416$ ,  $p = 0.182$ ; Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 0.440$ ,  $p = 0.668$ ).



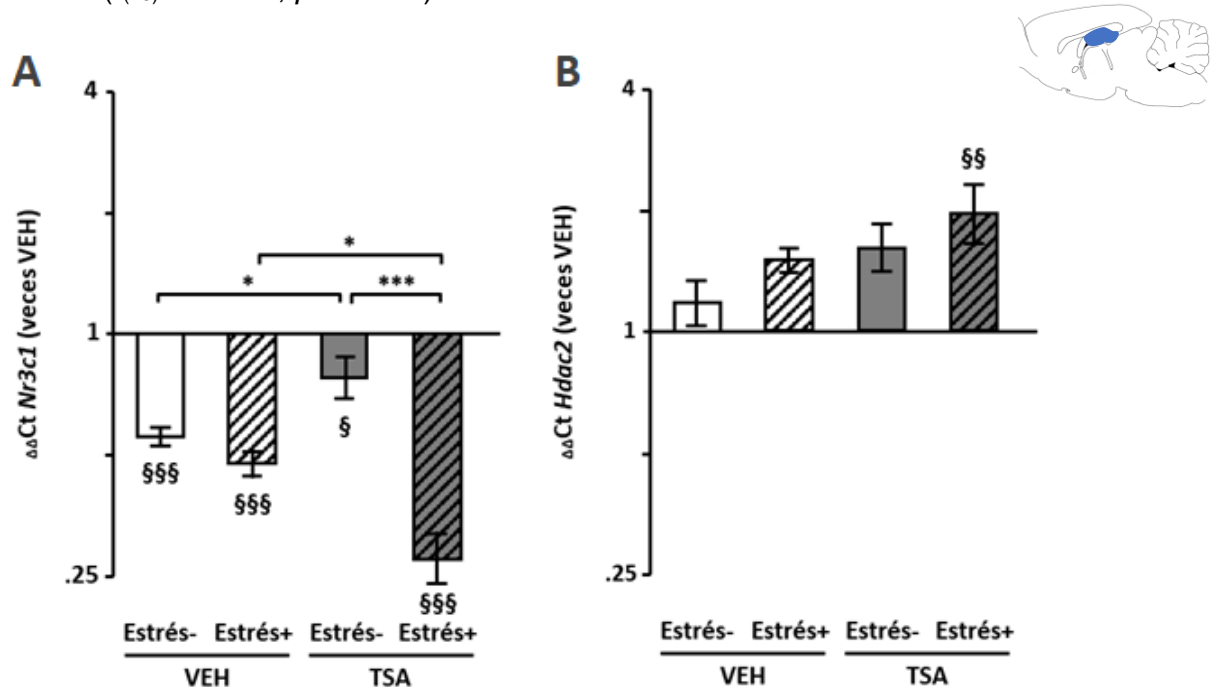
**Figura 59.** El entrenamiento espacial redujo la expresión de *Grin2b* con relación a *Grin2a* en la corteza prefrontal. La TSA acentuó tal reducción. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

#### 4.2.6.2. Hipocampo

La expresión de *Nr3c1* en el hipocampo en los grupos experimentales entrenados en la tarea espacial mostró diferencias significativas con la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 21.517$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 60A). Los análisis *post-hoc* mostraron que todos los grupos redujeron la transcripción del gen (Estrés-/VEH:  $t = 5.228$ ,  $p < 0.001$ ; Estrés+/VEH:  $t = 6.163$ ,  $p < 0.001$ ; Estrés-/TSA:  $t = 2.563$ ,  $p = 0.021$ ; Estrés+/TSA:  $t = 8.467$ ,  $p < 0.001$ ). La expresión de *Nr3c1* (ANOVA 2 vías; Figura 60A) fue alterada por el estrés ( $F_{(1, 15)} = 25.329$ ,  $p < 0.001$ ) y la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 13.368$ ,  $p = 0.003$ , pero no por el tratamiento farmacológico actuando de forma independiente ( $F_{(1, 15)} = 0.070$ ,  $p = 0.795$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que la TSA atenuó la reducción de la transcripción del gen en animales no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 2.773$ ,  $p = 0.017$ ), pero la acentuó en animales estresados (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 2.398$ ,  $p = 0.034$ ), siendo su efecto dependiente de la presencia o ausencia de estrés (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 6.144$ ,  $p < 0.001$ ); sin embargo, el estrés solo no tuvo efectos significativos (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 0.973$ ,  $p = 0.350$ ).

La expresión de *Hdac2* en el hipocampo en los grupos experimentales fue significativamente diferente de la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 3.475$ ,  $p = 0.034$ ; Figura 60B). Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales estresados antes del entrenamiento que luego recibieron TSA tuvieron un incremento en la transcripción del gen (Estrés+/TSA:  $t = 3.385$ ,  $p = 0.004$ ), mientras que los demás grupos no mostraron cambios (Estrés-/VEH:  $t = 0.587$ ,  $p = 0.566$ ; Estrés+/VEH:  $t = 1.575$ ,  $p = 0.136$ ; Estrés-/TSA:  $t = 2.057$ ,  $p = 0.057$ ). La transcripción de *Hdac2* (ANOVA 2 vías; Figura 60B) no fue alterada por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 4.612$ ,  $p = 0.053$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 2.298$ ,  $p = 0.155$ ) o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.049$ ,  $p = 0.827$ ).

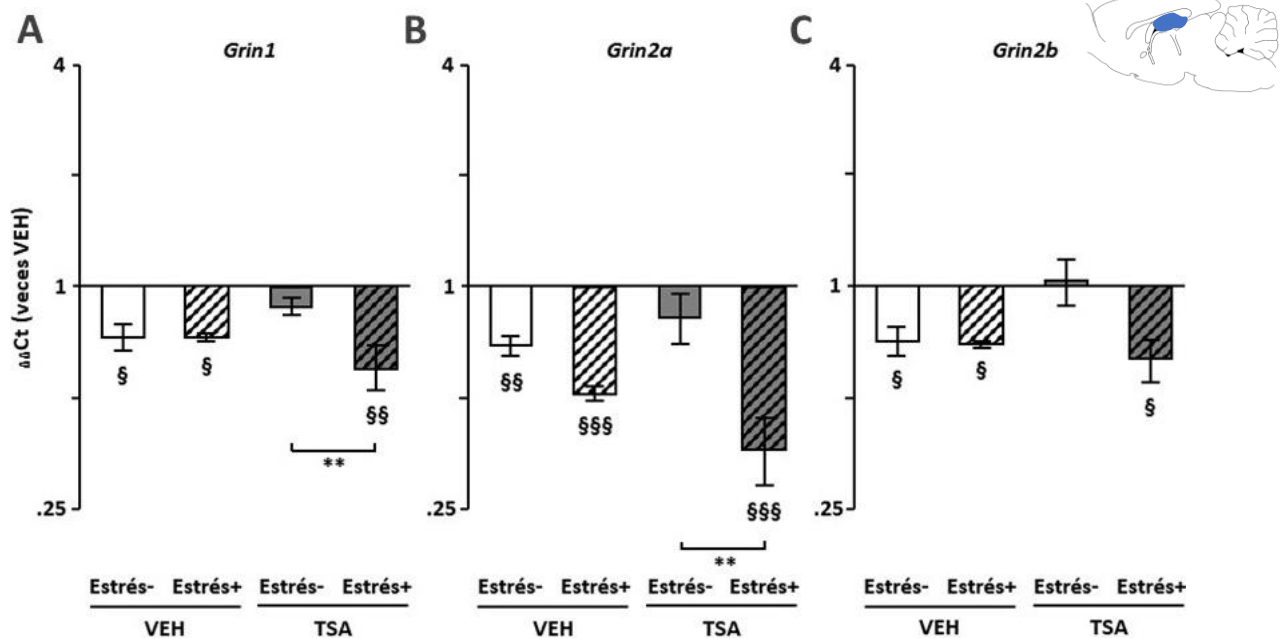
La transcripción de los *Nr3c1* y *Hdac2* en el hipocampo no correlacionó de forma significativa ( $r_{(16)} = -0.146$ ,  $p = 0.590$ ).



**Figura 60.** El entrenamiento espacial redujo la transcripción de *Nr3c1* en el hipocampo. La TSA atenuó la reducción de *Nr3c1* en animales no estresados, pero la acentuó en estresados. La interacción entre estrés y TSA incrementó la transcripción de *Hdac2*. A. Expresión relativa de *Nr3c1*. B. Expresión relativa de *Hdac2*. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

Al igual que en la corteza, se cuantificó la transcripción de los genes *Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b* en el hipocampo.

La expresión de **Grin1** en los grupos de animales entrenados fue significativamente diferente de la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 4.901$ ,  $p = 0.010$ ; Figura 61A). Los análisis *post-hoc* mostraron que la transcripción del gen se redujo en todos los grupos (Estrés-/VEH:  $t = 2.754$ ,  $p = 0.014$ ; Estrés+/VEH:  $t = 2.849$ ,  $p = 0.012$ ; Estrés+/TSA:  $t = 3.977$ ,  $p = 0.001$ ), con excepción del grupo de animales tratados solo con TSA (Estrés-/TSA:  $t = 1.156$ ,  $p = 0.266$ ). La expresión de *Grin1* (ANOVA 2 vías; Figura 61A) fue alterada por el estrés ( $F_{(1, 15)} = 6.509$ ,  $p = 0.025$ ) y la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 5.689$ ,  $p = 0.034$ ), pero no por el tratamiento farmacológico actuando de forma independiente ( $F_{(1, 15)} = 0.170$ ,  $p = 0.688$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que la TSA actuó de forma distinta en animales estresados y no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 3.491$ ,  $p = 0.004$ ), pero no se observaron otras diferencias significativas entre grupos experimentales (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 0.118$ ,  $p = 0.908$ ; Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 1.395$ ,  $p = 0.188$ ; Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.978$ ,  $p = 0.071$ ).



**Figura 61. El entrenamiento redujo la transcripción de *Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b* en el hipocampo. La TSA tuvo efectos distintos en animales estresados y no estresados.** A. Expresión relativa de *Grin1*. B. Expresión relativa de *Grin2a*. C. Expresión relativa de *Grin2b*. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

La expresión de **Grin2a** en el hipocampo en los grupos experimentales entrenados en la tarea espacial fue significativamente diferente de la línea de base (ANOVA 1 vía;

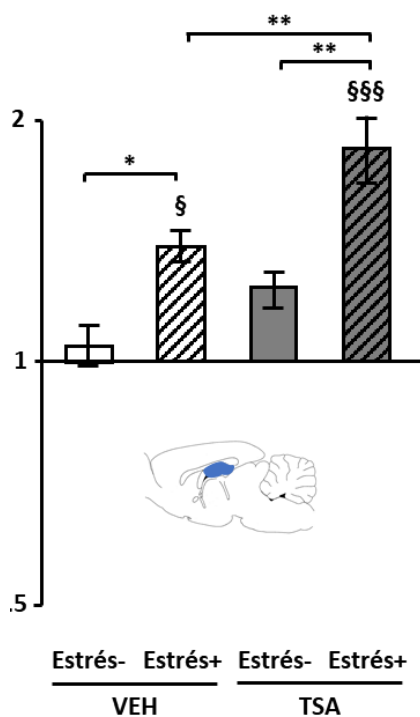
$F_{(4, 19)} = 13.179$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 61B). Los análisis *post-hoc* mostraron que en todos los grupos se redujo la transcripción del gen (Estrés-/VEH:  $t = 3.261$ ,  $p = 0.005$ ; Estrés+/VEH:  $t = 5.012$ ,  $p < 0.001$ ; Estrés+/TSA:  $t = 6.463$ ,  $p < 0.001$ ), con excepción del grupo de animales tratados solo con TSA (Estrés-/TSA:  $t = 1.710$ ,  $p = 0.108$ ). La expresión de *Grin2a* en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 61B) fue alterada por el estrés ( $F_{(1, 15)} = 18.181$ ,  $p < 0.001$ ), pero no por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.004$ ,  $p = 0.948$ ), o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 3.874$ ,  $p = 0.073$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que la TSA tuvo efectos diferentes en animales estresados y no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 4.407$ ,  $p < 0.001$ ); no se encontraron otras diferencias significativas entre grupos experimentales (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 1.623$ ,  $p = 0.130$ ; Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.439$ ,  $p = 0.176$ ; Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 1.345$ ,  $p = 0.204$ ).

La expresión ***Grin2b*** en el hipocampo en los grupos entrenados en la tarea espacial fue diferente de los valores basales (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 4.044$ ,  $p = 0.020$ ; Figura 61C). Los análisis *post-hoc* mostraron que la transcripción del gen se redujo en todos los grupos experimentales (Estrés-/VEH:  $t = 2.326$ ,  $p = 0.034$ ; Estrés+/VEH:  $t = 2.410$ ,  $p = 0.029$ ; Estrés+/TSA:  $t = 2.902$ ,  $p = 0.010$ ), con excepción del tratado solo con TSA (Estrés-/TSA:  $t = 0.037$ ,  $p = 0.971$ ). La transcripción de *Grin2b* en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 61C) no fue alterada significativamente por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 1.777$ ,  $p = 0.207$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 4.638$ ,  $p = 0.052$ ), o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 4.137$ ,  $p = 0.065$ ).

La expresión de las subunidades *Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b* en el **hipocampo** mostró **correlaciones** significativas: *Grin1* y *Grin2a* ( $r_{(16)} = 0.864$ ,  $p < 0.001$ ), *Grin1* y *Grin2b* ( $r_{(16)} = 0.881$ ,  $p < 0.001$ ) y *Grin2a-Grin2b* ( $r_{(16)} = 0.854$ ,  $p < 0.001$ ).

La **expresión de *Grin2b* con relación a *Grin2a*** (*Grin2b/Grin2a*) en los grupos experimentales fue significativamente diferente de la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 12.348$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 62). Los análisis *post-hoc* mostraron que los animales estresados antes del entrenamiento incrementaron la transcripción relativa de *Grin2b* tanto si fueron inyectados con vehículo (Estrés+/VEH:  $t = 2.805$ ,  $p = 0.013$ ) o TSA (Estrés+/TSA:  $t = 6.129$ ,  $p < 0.001$ ); los otros grupos experimentales no mostraron cambios con respecto a los valores de base (Estrés-/VEH:  $t = 0.271$ ,  $p = 0.790$ ; Estrés-/TSA:  $t = 1.618$ ,  $p = 0.126$ ). La expresión relativa de *Grin2b* en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 62) fue alterada por el factor tratamiento

farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 9.521, p = 0.009$ ) y el estrés ( $F_{(1, 15)} = 21.656, p < 0.001$ ), pero no por la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.705, p = 0.216$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que el estrés incrementó la expresión de *Grin2b* (Estrés+/VEH vs Estrés-/VEH:  $t = 2.367, p = 0.036$ ), efecto que fue acentuado por la TSA (Estrés+/TSA vs Estrés+/VEH:  $t = 4.214, p = 0.001$ ). La TSA en animales no estresados no tuvo efecto (Estrés-/TSA vs Estrés-/VEH:  $t = 1.258, p = 0.232$ ), por lo que los efectos de la TSA fueron diferentes en animales estresados y no estresados (Estrés-/TSA vs Estrés+/TSA:  $t = 3.105, p = 0.009$ ).



**Figura 62. El estrés incrementó la expresión de *Grin2b* con relación a *Grin2a* en el hipocampo y la TSA acentuó tal efecto.** Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

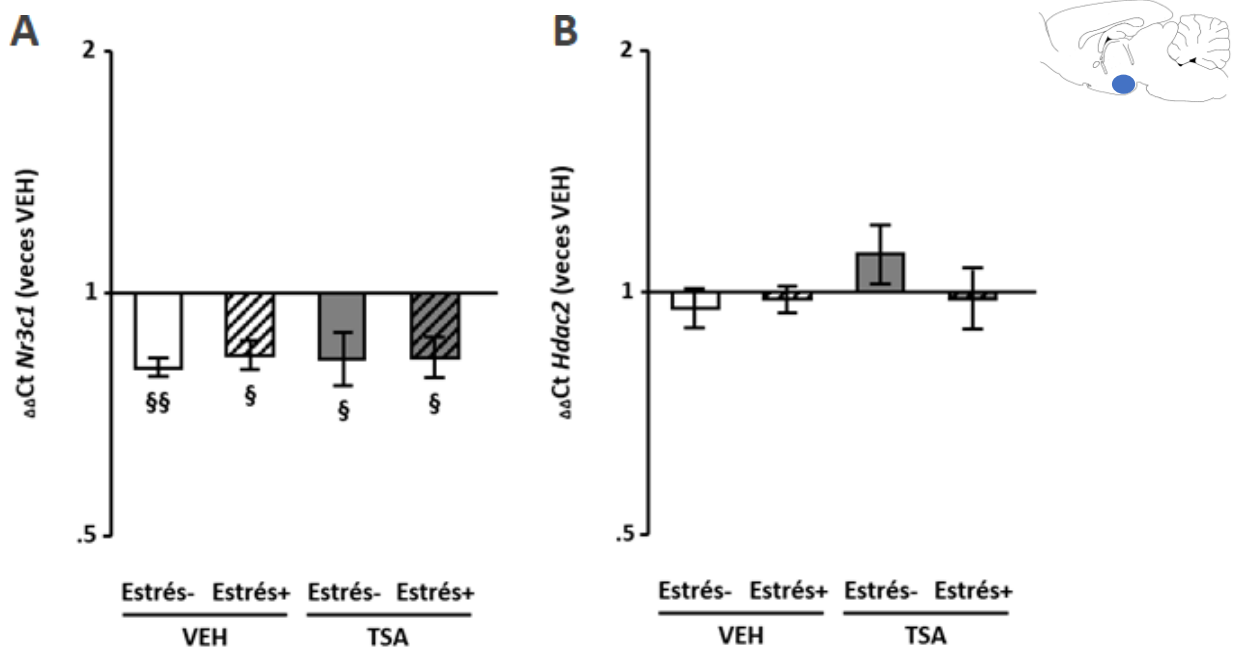
#### 4.2.6.3. Formación amigdalina

La expresión del gen *Nr3c1* en la amígdala en los grupos experimentales entrenados en la tarea espacial fue significativamente diferente de la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 3.506, p = 0.030$ ; Figura 63A). Los análisis *post-hoc* mostraron que la transcripción de *Nr3c1* se redujo en todos los grupos experimentales (Estrés-/VEH:  $t = 3.232, p = 0.005$ ; Estrés+/VEH:  $t = 2.850, p = 0.012$ ; Estrés-/TSA:  $t = 2.867, p = 0.011$ ; Estrés+/TSA:  $t = 2.790, p = 0.013$ ). Sin embargo, la expresión de *Nr3c1* (ANOVA 2 vías; Figura 63A) no fue alterada por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} =$

0.084,  $p = 0.776$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.098$ ,  $p = 0.759$ ) o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.043$ ,  $p = 0.838$ ).

La expresión de **Hdac2** en la amígdala en los grupos experimentales entrenados en la tarea espacial no mostró diferencias significativas con respecto a los valores basales (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 0.860$ ,  $p = 0.510$ ; Figura 63B). La transcripción de **Hdac2** en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 63B) no fue alterada significativamente por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 1.190$ ,  $p = 0.297$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.433$ ,  $p = 0.523$ ) o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.152$ ,  $p = 0.304$ ).

La expresión de los **Nr3c1** y **Hdac2** en la **amígdala** **correlacionó** de forma positiva ( $r_{(16)} = 0.600$ ,  $p = 0.014$ ).



**Figura 63. El entrenamiento redujo la transcripción de *Nr3c1* en el hipocampo.** A. Expresión relativa de *Nr3c1*. B. Expresión relativa de *Hdac2*. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

Tal como se hizo en la corteza y el hipocampo, se evaluó la transcripción de *Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b* en la amígdala en respuesta a los tratamientos experimentales.

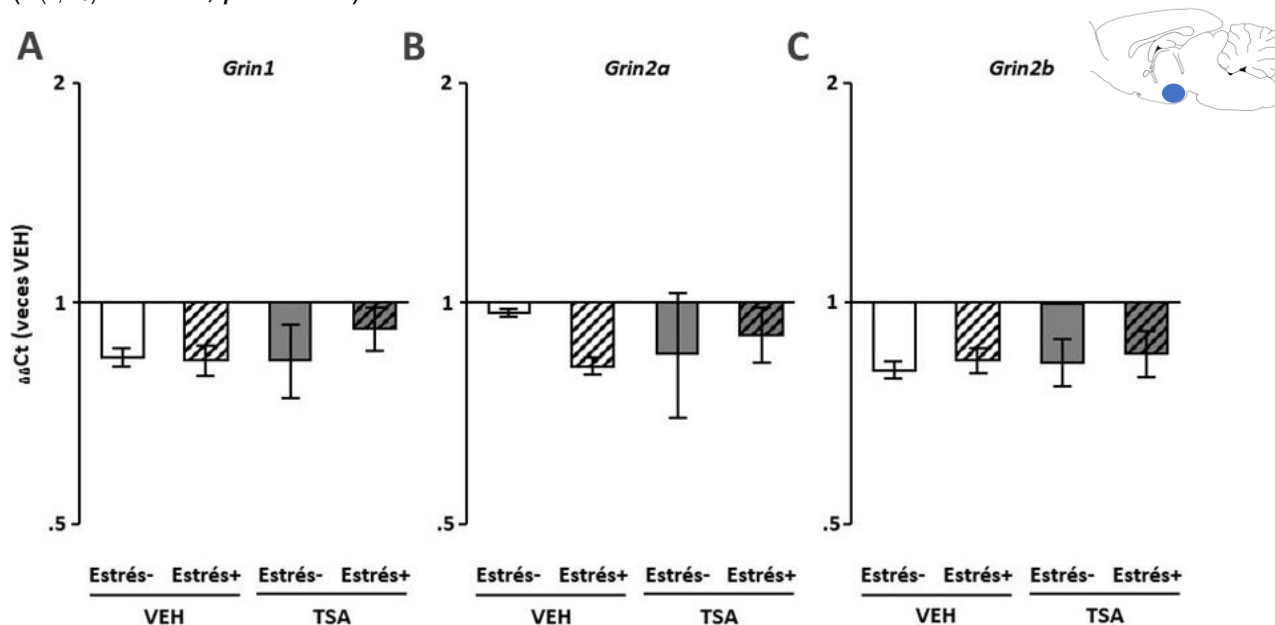
La expresión de **Grin1** en la amígdala en los grupos experimentales entrenados en la tarea espacial no fue diferente de la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 1.524$ ,  $p = 0.245$ ; Figura 64A). La transcripción de *Grin1* en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 64B) no fue alterada por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.444$ ,  $p =$



0.518), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.363$ ,  $p = 0.558$ ) o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.671$ ,  $p = 0.429$ ).

La expresión de **Grin2a** en el hipocampo en los grupos de animales entrenados en la tarea espacial no fue diferente de la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 0.807$ ,  $p = 0.539$ ; Figura 64B). La transcripción de *Grin2a* en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 64B) no fue alterada por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.017$ ,  $p = 0.897$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.357$ ,  $p = 0.561$ ) o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.059$ ,  $p = 0.324$ ).

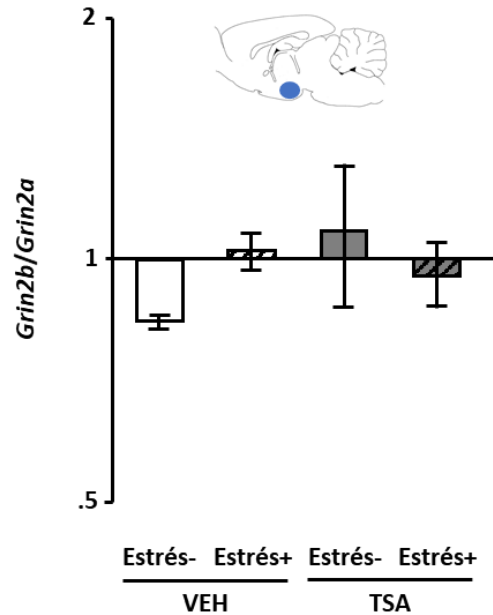
La transcripción de **Grin2b** en la amígdala en los grupos experimentales entrenados en la tarea espacial no fue significativamente diferente de la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 2.898$ ,  $p = 0.058$ ; Figura 64C). La transcripción de *Grin2b* (ANOVA 2 vías; Figura 64C) no fue alterada por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.193$ ,  $p = 0.668$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.212$ ,  $p = 0.653$ ); o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.000$ ,  $p = 0.988$ ).



**Figura 64. El entrenamiento espacial redujo la transcripción de *Grin2b* en la amígdala.** A. Expresión relativa de *Grin1*. B. Expresión relativa de *Grin2a*. C. Expresión relativa de *Grin2b*. Abreviaturas: \* diferencias significativas entre grupos; § diferencias significativas con respecto a la línea de base.

La transcripción de *Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b* **correlacionó** de forma significativa en la **amígdala**: *Grin1* y *Grin2a* ( $r_{(16)} = 0.554$ ,  $p = 0.025$ ), *Grin1* y *Grin2b* ( $r_{(16)} = 0.653$ ,  $p = 0.006$ ) y *Grin2a* y *Grin2b* ( $r_{(16)} = 0.601$ ,  $p = 0.013$ ).

La transcripción de **Grin2b** con relación a **Grin2a** (*Grin2b/Grin2a*) en los grupos experimentales con entrenamiento en la tarea espacial no fue significativamente diferente de la línea de base (ANOVA 1 vía;  $F_{(4, 19)} = 0.765$ ,  $p = 0.564$ ; Figura 65). La transcripción relativa de *Grin2b* en los grupos experimentales (ANOVA 2 vías; Figura 65) no fue alterada por el tratamiento farmacológico ( $F_{(1, 15)} = 0.654$ ,  $p = 0.434$ ), el estrés ( $F_{(1, 15)} = 0.058$ ,  $p = 0.813$ ) o la interacción fármaco-estrés ( $F_{(1, 15)} = 1.702$ ,  $p = 0.217$ ).



**Figura 65.** Los tratamientos experimentales no alteraron la expresión relativa de *Grin2b* con relación a *Grin2a* en la amígdala.

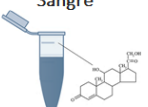



### 4.3. Resumen de Resultados

Efectos del estrés y la TSA en **animales sin entrenamiento en la tarea espacial** (Tabla 5):

1. El estrés agudo incrementó a largo plazo los niveles de acH3K14 en la corteza prelímbica, el hipocampo (fascia dentada y CA1) y la amígdala basolateral. La TSA previno estos efectos.
2. El estrés redujo la expresión de GR en la corteza prelímbica, mientras la incrementó en la fascia dentada. El estrés, además, redujo la transcripción de *Nr3c1* en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala. La TSA previno estos efectos.
3. El estrés redujo la expresión de HDAC2 en la corteza prelímbica, la amígdala y CA1, pero la incrementó en la fascia dentada. El estrés, además, redujo la transcripción de *Hdac2* en la corteza prefrontal y la amígdala. La TSA previno estos efectos.
4. La expresión de GR y HDAC2 se asoció de forma directa en la corteza y el hipocampo (fascia dentada y CA1), pero no en la amígdala, mientras que la expresión de *Nr3c1* y *Hdac2* se asoció de forma directa en estas tres regiones del cerebro.
5. Los niveles de GR y acH3K14 se asociaron de forma inversa en la corteza prelímbica, pero de forma directa en la fascia dentada.
6. Los niveles de HDAC2 y acH3K14 se asociaron de manera inversa en la corteza prelímbica, pero de forma directa en el hipocampo (fascia dentada y CA1).
7. Los niveles expresión de HDAC2 o GR no se asociaron significativamente con los niveles de acH3K14 en la amígdala basolateral.
8. El estrés no alteró la co-localización de GR y HDAC2 en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas.

9. El estrés redujo la expresión de *Grin1* y *Grin2b* en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala, y de *Grin2a* en la amígdala. La TSA no revirtió estos efectos.
10. El estrés no afectó la proporción *Grin2b/Grin2a* en ninguna de las estructuras cerebrales estudiadas.

**Tabla 5. Resultados en animales sin entrenamiento espacial.**

Variable			VEH	Estrés	TSA	Estrés/TSA
	Plasma	Corticosterona	—	—	—	↑↑
		Prelímbica	acH3K14	—	↑↑↑*	—
GR			—	↓↓↓*	—	— <sup>(P)</sup>
HDAC2			—	↓*	—	— <sup>(P)</sup>
Prefrontal		<i>Nr3C1</i>	—	↓↓↓*	—	— <sup>(P)</sup>
		<i>Hdac2</i>	—	↓↓↓*	—	— <sup>(P)</sup>
		<i>Grin1</i>	—	↓*	—	—
		<i>Grin2a</i>	—	—	—	—
		<i>Grin2b</i>	—	↓↓↓*	—	↓↓↓
	Fascia Dentada	acH3K14	—	↑↑↑*	—	— <sup>(P)</sup>
		GR	—	↑↑↑*	—	— <sup>(P)</sup>
		HDAC2	—	↑↑↑*	—	— <sup>(P)</sup>
	CA1	acH3K14	—	↑↑↑*	—	↓↓↓ <sup>(P)</sup>
		GR	—	—	↓↓↓	↓↓↓
	Entero	HDAC2	—	↑*	—	↓↓↓ <sup>(P)</sup>
		<i>Nr3C1</i>	—	↓*	—	↓↓↓ <sup>(A)</sup>
		<i>Hdac2</i>	—	—	↑	—
		<i>Grin1</i>	—	↓*	—	↓
		<i>Grin2a</i>	—	—	—	↓↓↓
		<i>Grin2b</i>	—	↓*	—	↓↓↓
	Basolateral	acH3K14	—	↑↑↑*	—	— <sup>(P)</sup>
		GR	—	—	—	—
		HDAC2	—	↓↓↓*	↓↓↓	↓
	Entera	<i>Nr3C1</i>	—	↓↓↓↓*	—	— <sup>(P)</sup>
		<i>Hdac2</i>	—	↓*	—	— <sup>(P)</sup>
		<i>Grin1</i>	—	↓*	—	—
		<i>Grin2a</i>	—	↓*	—	—
		<i>Grin2b</i>	—	↓↓↓*	—	↓





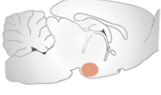
Abreviaturas: \*Efecto significativo del estrés; <sup>(P)</sup> previene o <sup>(A)</sup> acentúa significativamente el efecto del estrés. Las flechas indican la dirección y magnitud de cambios significativos con relación a la línea de base. La línea de base corresponde a los valores observados en el grupo de animales a los que solo se les administró DMSO 18% i.p. como vehículo.

11. La expresión de *Grin1* se asoció de forma directa con la expresión de las subunidades *Grin2a* y *Grin2b* en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala. La expresión de *Grin2a* y *Grin2b* se asoció en la corteza prefrontal y la amígdala, pero no en el hipocampo.
12. La TSA por sí sola redujo la expresión de GR en CA1, la expresión de HDAC2 y su co-localización con GR en la amígdala, mientras incrementó la expresión de *Hdac2* en el hipocampo.
13. La inducción de estrés agudo en conjunción con la administración de TSA incrementó los niveles de corticosterona en plasma, mientras redujo la expresión de *Grin2a* en el hipocampo y la proporción *Grin2b/Grin2a* en la corteza prefrontal.

Efectos del estrés y la TSA en **animales entrenados en la tarea espacial** (Tabla 6):

1. El entrenamiento en la tarea espacial indujo a largo plazo múltiples cambios en los indicadores analizados, incluyendo: a) reducción de los niveles de acH3K14 en CA1, b) incremento en los niveles de corticosterona en plasma después de la prueba de memoria, c) incremento en la expresión de GR en la corteza prefrontal, pero reducción en la amígdala, d) reducción en la expresión de HDAC2 en el hipocampo (FD y CA1) y la amígdala, e) reducción en la expresión de *Nr3c1* en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala, f) reducción en la expresión de *Hdac2* en la corteza prefrontal, g) reducción en la expresión de *Grin1* en la corteza prefrontal y el hipocampo, h) reducción de la expresión de *Grin2a* en el hipocampo, i) reducción de la expresión de *Grin2b* en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala, j) Reducción en la proporción *Grin2b/Grin2a* en la corteza prefrontal.
2. El estrés agudo incrementó la latencia a meta y el número de errores, mientras redujo la velocidad de desplazamiento y la preferencia relativa por el agujero y zona meta en la prueba de memoria. La TSA revirtió estos efectos.
3. El estrés acentuó el incremento en los niveles de corticosterona en plasma inducido por la prueba de memoria. La TSA previno este efecto.

**Tabla 6. Resultados en animales entrenados en la tarea espacial.**

Variable			Entrenamiento			
			VEH	Estrés	TSA	Estrés/TSA
	Prueba de Memoria	Latencia a meta	↑↑	↑↑↑↑*	—	— <sup>(P)</sup>
		Errores Ponderados	↑↑	↑↑↑	—	— <sup>(R)</sup>
		Velocidad media	—	↓↓↓↓*	—	— <sup>(P)</sup>
		Agujero Meta (%)	↑	—*	↑↑	↑↑ <sup>(P)</sup>
		Zona Meta (%)	↑↑	↑*	↑↑↑	↑↑↑↑ <sup>(P)</sup>
		Exploración Total	—	—	↑	—
	Plasma	Corticosterona	↑	↑↑↑↑*	↑↑	↑ <sup>(P)</sup>
		Prelímbica	acH3K14	—	↓↓↓*	—
Prefrontal		GR	↑↑↑↑	—*	—	↑ <sup>(P)</sup>
		HDAC2	—	↓*	—	↓
		<i>Nr3C1</i>	↓↓↓	↓*	↓↓↓	↓↓↓ <sup>(P)</sup>
		<i>Hdac2</i>	↓↓	↓	↓↓	↓↓
		<i>Grin1</i>	↓↓	↓*	↓↓	↓
		<i>Grin2a</i>	—	—	↑	—
<i>Grin2b</i>	↓↓↓	↓*	↓↓↓	↓↓↓ <sup>(R)</sup>		
	Fascia Dentada	acH3K14	—	↓*	—	↑ <sup>(P)</sup>
		GR	—	↑↑↑↑*	—	— <sup>(P)</sup>
		HDAC2	↓	—*	—	—
	CA1	acH3K14	↓↓↓	↓↓↓	↓	↓ <sup>(R)</sup>
		GR	—	—	↓	—
	Entero	HDAC2	↓	↓↓	↓↓	— <sup>(R)</sup>
		<i>Nr3C1</i>	↓↓↓	↓↓↓	↓	↓↓↓↓ <sup>(A)</sup>
		<i>Hdac2</i>	—	—	—	↑↑
		<i>Grin1</i>	↓	↓	—	↓
		<i>Grin2a</i>	↓	↓↓	—	↓↓
<i>Grin2b</i>	↓	↓	—	↓		
	Basolateral	acH3K14	—	—	—	—
		GR	↓↓↓	↓	↓↓	↓↓
		HDAC2	↓↓↓	↓↓*	↓	↓↓↓ <sup>(P)</sup>
	Entera	<i>Nr3C1</i>	↓	↓	↓	↓
		<i>Hdac2</i>	—	—	—	—
		<i>Grin1</i>	—	—	—	—
		<i>Grin2a</i>	—	—	—	—
		<i>Grin2b</i>	↓	↓	↓	↓

Abreviaturas: \*Efecto significativo del estrés; <sup>(P)</sup> previene, <sup>(R)</sup> reduce, o <sup>(A)</sup> acentúa significativamente el efecto del estrés. Las flechas indican la dirección y magnitud de cambios significativos con relación a la línea de base. La línea de base para las variables de comportamiento corresponde a los valores observados en el último ensayo de entrenamiento o la probabilidad al azar. La línea de base en los análisis bioquímicos corresponde a los valores observados en el grupo de animales a los que solo se les administró DMSO 18% i.p. como vehículo.

4. Las concentraciones de corticosterona en plasma se asociaron de forma directa con los indicadores comportamentales de latencia a meta, errores ponderados y distancia recorrida, pero de forma inversa con la velocidad de desplazamiento durante la prueba de memoria.
5. El estrés redujo los niveles de acetilación de acH3K14 en la corteza prelímbica y el hipocampo (fascia dentada y CA1). La TSA revirtió estos efectos del estrés.
6. Los tratamientos experimentales (fármaco, estrés, interacción fármaco-estrés) en animales entrenados en la tarea espacial no alteraron los niveles de acH3K14 en la amígdala.
7. El nivel de acH3K14 en la corteza prelímbica se asoció de forma directa con los indicadores de preferencia relativa por el agujero y zona meta y la velocidad de desplazamiento en la prueba de memoria; mientras se relacionó de forma inversa con la latencia a meta. El nivel de acH3K14 en la fascia dentada se asoció de forma directa con la velocidad de desplazamiento y de forma inversa con la latencia a meta. Los niveles de acH3K14 en CA1 o la amígdala basolateral no tuvieron relación con ningún indicador comportamental.
8. El estrés agudo redujo la expresión de GR en la corteza, pero incrementó la transcripción de *Nr3c1*. El estrés incrementó la expresión de GR en la fascia dentada. La TSA previno estos efectos.
9. El estrés agudo redujo la expresión de HDAC2 en la corteza prelímbica y CA1, mientras la incrementó en la fascia dentada y la amígdala. La TSA revirtió los efectos del estrés en CA1 y la amígdala, pero no en la corteza prelímbica o la fascia dentada.
10. La expresión de GR y HDAC2 se asoció de forma directa en la corteza prelímbica y el hipocampo (FD y CA1), pero no en la amígdala. Sin embargo, la expresión de *Nr3c1* y *Hdac2* se asoció de manera directa en la corteza prefrontal y la amígdala.
11. La expresión de GR en la corteza prelímbica se asoció con la velocidad de desplazamiento en la prueba de memoria, mientras que su expresión en la

amígdala se relacionó con la latencia a meta. La expresión de GR en el hipocampo (FD y CA1) no se relacionó con ningún indicador comportamental.

12. La expresión de HDAC2 en la corteza, el hipocampo (FD y CA1), o la amígdala no se relacionó con ningún indicador comportamental.
13. Los tratamientos experimentales no afectaron la co-localización de HDAC2 y GR en los núcleos de las células de la corteza prelímbica, el hipocampo (FD y CA1) o la amígdala.
14. No se encontró asociación entre los niveles de acH3K14 con la expresión de HDAC2 en la corteza prelímbica, el hipocampo (fascia dentada y CA1) o la amígdala basolateral.
15. Sin embargo, los niveles de acH3K14 se asociaron de manera directa con la expresión de GR en la corteza prelímbica, y de manera inversa en la fascia dentada del hipocampo.
16. La TSA previno el incremento de la expresión *Grin2b* inducido por el estrés en la corteza prefrontal.
17. La TSA previno la tendencia del estrés a incrementar la proporción *Grin2b/Grin2a* inducida por el estrés en la corteza prefrontal, pero acentuó este incremento en el hipocampo.
18. La expresión de las subunidades *Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b* del receptor NMDA se asoció de manera directa en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala.
19. Los tratamientos experimentales no alteraron la expresión de las *Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*, o la proporción *Grin2b/Grin2a* en la amígdala.
20. La TSA en animales entrenados en la tarea espacial provocó: a) incremento en la exploración de los agujeros en el laberinto, la exploración del agujero meta y la zona meta, b) reducción de la expresión de GR en CA1, pero incremento en la expresión de *Nr3c1* en el hipocampo, c) incremento en la expresión de HDAC2 en la amígdala, d) incremento en la expresión de *Grin2a* en la corteza prefrontal y de



*grin2b* en el hipocampo, y e) reducción en la relación *Grin2b/Grin2a* en la corteza prefrontal.

21. La administración de TSA en conjunción con el estrés provocó en el hipocampo:  
a) incremento en la expresión de *Hdac2*, b) reducción en la expresión del *Nr3c1*, *Grin1* y *Grin2a*, y c) incremento en la proporción *Grin2b/Grin2a*.

Comparando los resultados obtenidos en los experimentos desarrollados con **animales entrenados y no entrenados en la tarea espacial** (Tabla 7 y Anexo E: análisis de los efectos del fármaco, el estrés y el entrenamiento como factores independientes usando una prueba ANOVA de 3 vías con los ocho grupos experimentales) encontramos que:

1. El entrenamiento espacial, analizado como factor: a) incrementó los niveles de corticosterona en plasma en respuesta a la prueba de memoria, b) redujo los niveles de acH3K14 en la corteza prelímbica, el hipocampo y la amígdala, c) incrementó la expresión de GR en la corteza prelímbica, pero la redujo en la amígdala basolateral, d) redujo la expresión de *Nr3c1* en la corteza prefrontal y el hipocampo, e) redujo la expresión de HDAC2 en el hipocampo y la amígdala basolateral, f) redujo la expresión de *Hdac2* en la corteza prefrontal, mientras la incrementó en el hipocampo, g) redujo la expresión de *Grin1* y *Grin2b* en la corteza prefrontal y de *Grin1* y *Grin2a* en el hipocampo.
2. El estrés agudo alteró de manera persistente los niveles de acH3K14 en la corteza prelímbica y el hipocampo (fascia dentada y CA1) de animales entrenados (hipoacetilación) y no entrenados (hiperacetilación) en la tarea espacial; analizado como factor en los grupos de los experimentos con y sin entrenamiento espacial, el estrés agudo incrementó los niveles de acH3K14 en la amígdala. De forma notable, la TSA previno los cambios en el nivel de acH3K14 inducidos por el estrés tanto en animales entrenados como no entrenados.
3. El estrés agudo redujo a largo plazo la expresión de GR en la corteza prelímbica, mientras la aumentó en la fascia dentada de animales tanto entrenados, como no entrenados en la tarea espacial. Analizado como factor, en los 8 grupos

experimentales incluidos en el estudio, el estrés agudo incremento la expresión de GR en la amígdala basolateral. La TSA previno los cambios en la expresión de GR inducidos por estrés.

- El estrés agudo incrementó la transcripción de *Nr3c1* en la corteza prefrontal de animales entrenados, pero la redujo en animales no entrenados (decremento). En el hipocampo, el estrés redujo la expresión de *Nr3c1* tanto en animales entrenados como no entrenados, mientras que en la amígdala redujo su expresión en animales no entrenados. Analizado como factor, teniendo en cuenta los grupos de los experimentos con y sin entrenamiento espacial, el estrés agudo redujo la expresión de *Nr3c1* en el hipocampo y en la formación amigdalina. La TSA previno los cambios inducidos por el estrés en la expresión de *Nr3c1* en la corteza y la amígdala, pero de forma inesperada, los acentuó en el hipocampo.

**Tabla 7. Efectividad de la TSA para prevenir los efectos del estrés agudo.**

	Estructura Cerebral					
	Corteza Prefrontal		Hipocampo		Amígdala	
	Entrenamiento -	Entrenamiento +	Entrenamiento -	Entrenamiento +	Entrenamiento -	Entrenamiento +
<b>acH3K14</b>	Previno Incremento	Previno Decremento	Previno Incremento en FD y CA1	Previno Reducción en FD y CA1	Previno Incremento	El Estrés No Tuvo Efecto
<b>GR</b>	Previno Decremento	Previno Decremento	Previno Incremento en FD	Previno Incremento en FD	El Estrés No Tuvo Efecto	El Estrés No Tuvo Efecto
<b>Nr3c1</b>	Previno Decremento	Previno Incremento	Acentuó Decremento	Acentuó Decremento	Previno Decremento	El Estrés No Tuvo Efecto
<b>HDAC2</b>	Previno Decremento	No Previno Decremento	Previno Incremento en FD y CA1	Previno Decremento en CA1 pero no decremento en FD	Previno Decremento	Previno Incremento
<b>Hdac2</b>	Previno Decremento	No Previno Incremento	El estrés No Tuvo Efecto	El Estrés No Tuvo Efecto	Previno Decremento	El Estrés No Tuvo Efecto
<b>Grin1</b>	No Previno Decremento	No previno Incremento	No Previno Decremento	El Estrés No Tuvo Efecto	No Previno Decremento	El Estrés No Tuvo Efecto
<b>Grin2a</b>	El Estrés No Tuvo Efecto	El Estrés No Tuvo Efecto	El Estrés No Tuvo Efecto	No Previno Decremento	No Previno Decremento	El Estrés No Tuvo Efecto
<b>Grin2b</b>	No Previno Decremento	Previno Incremento	No Previno Decremento	El Estrés No Tuvo Efecto	No Previno Decremento	El Estrés No Tuvo Efecto

Abreviaturas: FD: fascia dentada; CA1: región CA1 del hipocampo. Los efectos del estrés prevenidos o invertidos por la TSA se señalan en verde, mientras que aquellos que no fueron prevenidos se señalan en rojo. Los efectos del estrés acentuados por la TSA se señalan en azul. Se señala en gris la carencia de efecto del estrés.

5. El estrés agudo redujo la expresión de HDAC2 en la corteza prelímbica, pero la incrementó en el hipocampo (fascia dentada y CA1) de animales tanto entrenados como no entrenados en la tarea espacial; este efecto fue confirmado al analizar el estrés como factor con los 8 grupos experimentales. En la amígdala, el estrés redujo la expresión de HDAC2 en animales sin entrenamiento, pero la incrementó en animales entrenados. La TSA previno los efectos inducidos por estrés, con excepción del incremento en la expresión de HDAC2 en la corteza prelímbica de animales entrenados.
6. De manera consistente, la TSA previno la reducción en la expresión de *Hdac2* en la corteza prefrontal y la amígdala inducida por estrés en animales sin entrenamiento. Sin embargo, la TSA no previno el incremento en la transcripción del gen en la corteza prefrontal de animales entrenados en la tarea espacial.
7. El estrés redujo la expresión de *Grin1* en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala en animales sin entrenamiento espacial, mientras que la incrementó en la corteza prefrontal de animales entrenados. Analizado como factor, con los 8 grupos experimentales, el estrés agudo redujo la expresión de *Grin1* en la corteza, el hipocampo y la amígdala. La TSA no previno ninguno de estos efectos.
8. El estrés agudo redujo la transcripción de *Grin2a* en el hipocampo de animales entrenados en la tarea espacial y en la amígdala de animales sin entrenamiento. Analizado como factor, el estrés redujo la expresión de *Grin2a* en el hipocampo y la amígdala. La TSA no previno ninguno de estos efectos.
9. El estrés agudo redujo la transcripción de *Grin2b* en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala de animales sin entrenamiento espacial, mientras la incrementó en la corteza prefrontal de animales entrenados. Analizado como factor, el estrés redujo la expresión de *Grin2b* en el hipocampo y la amígdala. La TSA solo previno el incremento en la expresión de *Grin2b* inducida por estrés en la corteza prefrontal de animales entrenados.
10. Analizado como factor, con los ocho grupos experimentales incluidos en el estudio, el tratamiento con TSA redujo la acetilación de histonas en la corteza

prelímbrica y la amígdala; además, la TSA redujo la expresión de GR en el hipocampo y la expresión de HDAC2 en el hipocampo y la amígdala basolateral, mientras incrementó la expresión de *Hdac2* en el hipocampo y la expresión de *Grin2a* en la corteza prefrontal.

11. Al analizar el conjunto de los resultados se encontró que el entrenamiento espacial, el estrés y la inhibición de las HDACs con TSA tuvieron efectos complejos, muchos de ellos dependientes de sus interacciones (ANEXO E).

En conjunto, la TSA fue efectiva para prevenir muchos de los efectos del estrés agudo, incluyendo cambios en los niveles de acetilación de la H3, expresión de GR y HDAC2 en la corteza y el hipocampo de animales entrenados y no entrenados en una tarea espacial. Sin embargo, la TSA no evitó los cambios inducidos por el estrés agudo sobre la expresión de genes codificantes para subunidades del receptor NMDA, con excepción del incremento en *Grin2b* en animales entrenados. Los efectos del estrés en la amígdala fueron evidentes en los animales no entrenados en la tarea espacial, donde la TSA fue efectiva para prevenir la hiperacetilación de la H3 y la reducción en la expresión de *Nr3c1* y HDAC2/*Hdac2*, pero no para prevenir la reducción en la transcripción de subunidades del receptor NMDA.

Estos resultados muestran que la inhibición de las HDACs de tipo I y II es efectiva para prevenir los efectos deletéreos del estrés agudo sobre la memoria espacial y los cambios en múltiples marcadores moleculares en distintas regiones del cerebro, a la vez que subrayan la complejidad de los efectos del estrés en interacción con otras variables y dependiendo del contexto celular.

## **5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

## 5.1. Discusión

### 5.1.1. La inhibición de las HDACs previene que el estrés agudo deteriore la consolidación de la memoria espacial

De forma consistente con lo reportado en la literatura (Kim *et al.*, 2001, 2005; Diamond *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2008), encontramos que el estrés agudo inducido antes del entrenamiento en una tarea espacial deteriora la consolidación de la memoria espacial, efecto evidenciado por el incremento en la latencia para encontrar el agujero meta, en los errores cometidos antes de encontrar la meta, y en la falta de preferencia por el agujero meta. En estudios previos se demostró que el estrés agudo impide que el entrenamiento espacial induzca incrementos en la densidad de espinas dendríticas, la fosforilación de CAMK-II y CREB y el incremento en la expresión de CAMKII, c-Fos, BDNF, NCAM y Arc en el hipocampo o la corteza prefrontal de roedores (Kim *et al.*, 2001, 2005; Sandi *et al.*, 2005; Diamond *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2008; Vanelzakker *et al.*, 2011; Almaguer-Melian *et al.*, 2012; Zoladz *et al.*, 2012; Sardari, Rezayof and Khodagholi, 2015); sin embargo, ningún estudio previo había descrito mecanismos epigenéticos subyacentes a los efectos deletéreos del estrés agudo sobre la memoria. En la presente investigación, encontramos que la administración sistémica de un inhibidor de las HDACs de tipo I y II evita que el estrés agudo afecte la consolidación de la memoria, lo que indica un papel central de la acetilación de histonas como mecanismo epigenético que media los efectos deletéreos del estrés agudo sobre la memoria.

El hecho de que la inhibición de las HDACs prevenga el efecto deletéreo del estrés agudo sobre la memoria espacial está en concordancia con recientes estudios en roedores que muestran que la administración sistémica de TSA atenúa los efectos deletéreos inducidos por la privación de sueño (Duan *et al.*, 2016) o la dieta alta en grasa (Sharma, Taliyan and Ramagiri, 2015) sobre la consolidación de la memoria espacial. La inhibición de las HDACs también revierte el deterioro de la consolidación de la memoria inducido por el bloqueo de receptores de péptido liberador de gastrina (Petry *et al.*, 2016), infecciones (Barichello *et al.*, 2015; Steckert *et al.*, 2015), anestesia (Zhong *et al.*, 2014) o envejecimiento (Peleg *et al.*, 2010; Reolon *et al.*, 2011). De manera interesante, en modelos de enfermedades neurodegenerativas se ha encontrado que la inhibición farmacológica de las HDACs o, el silenciamiento de

HDAC2, evita la hipoacetilación de las histonas y el decremento en la expresión génica (Fontán-Lozano *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2010; Gräff, Rei, *et al.*, 2012; Gräff and Tsai, 2013b; Rumbaugh *et al.*, 2015), además de rescatar o aminorar el déficit cognitivo (Resumen en tabla 4). Dado que el estrés crónico es un factor de riesgo tanto para el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento, como para enfermedades neurodegenerativas (Jeong *et al.*, 2006; Carroll *et al.*, 2011; Popp *et al.*, 2015), los efectos protectores de la TSA acá reportados sugieren un potencial uso de este fármaco (o fármacos similares) para prevenir los efectos deletéreos acumulativos de los eventos estresantes. De otra parte, la administración de inhibidores de las HDACs también previene otros efectos del estrés, tales como el incremento en el despliegue de conductas defensivas, o comportamientos del espectro depresivo, así como trastornos gastrointestinales o cardíacos (Weaver *et al.*, 2004; Covington *et al.*, 2009, 2012, 2015; McKinsey, 2012; Miyagawa, Tsuji and Takeda, 2012; Tran *et al.*, 2013, 2014; Moloney *et al.*, 2015).

### **5.1.2. La inhibición de las HDACs no mejora la consolidación de la memoria espacial en animales no estresados, pero favorece la conducta exploratoria**

Se ha reportado que la inhibición de las HDACs mejora la consolidación de la memoria en tareas que, si bien son adquiridas a corto plazo, no se recuperan a la largo plazo (entrenamiento sub-umbral) (Stefanko *et al.*, 2009; Intlekofer *et al.*, 2013; Malvaez *et al.*, 2013). Sin embargo, en el presente estudio la administración de TSA no mejoró la consolidación de la memoria espacial en animales no estresados. Es probable que la falta de efecto de la TSA se deba a un efecto de techo, en tanto los animales entrenados sin estrés recuperaron exitosamente la memoria 24 horas después del entrenamiento, limitando la posibilidad de que la TSA mejorara aún más la memoria. Sin embargo, en animales entrenados (estresados y no estresados), la TSA mejoró el desempeño durante la prueba de memoria, lo que está de acuerdo con los reportes antes mencionados, que subrayan la facilitación de la consolidación de la memoria por la inhibición de las HDACs.

De forma interesante, se encontró que los animales a los que se les administró la TSA después del entrenamiento espacial exploraron con mayor persistencia los agujeros del laberinto durante la prueba de memoria, aún a pesar de no encontrar la caja meta repetidamente y no poder escapar de la situación aversiva. Tal incremento

en la persistencia para explorar el laberinto sugiere que la TSA podría incrementar la motivación de los animales para escapar de una situación aversiva (prueba de memoria). En este sentido, múltiples estudios han reportado que la inhibición de las HDACs incrementa la motivación, la búsqueda de refuerzo y reduce síntomas en modelos de depresión si se administra en el hipocampo, la corteza prefrontal, la amígdala, o el núcleo accumbens (Schroeder *et al.*, 2007; Covington *et al.*, 2009, 2011, 2015; McQuown and Wood, 2010), y que tal efecto se asocia al incremento persistente en la acetilación de histonas en el núcleo accumbens (Covington *et al.*, 2009; Heller *et al.*, 2014). En este mismo sentido, en el laboratorio de Neurofisiología Comportamental se ha observado que animales tratados con TSA después del entrenamiento espacial (independientemente de ser o no sometidos a estrés antes del entrenamiento) presentan incrementos en los niveles de acetilación de histonas en el núcleo accumbens 24 horas post-tratamiento (Vargas-López, Lamprea and Múnera, 2016).

### **5.1.3. La inhibición de las HDACs previene los cambios en la acetilación de la histona H3 inducida por estrés en animales entrenados y no entrenados**

La inducción de estrés agudo antes del entrenamiento espacial provocó a largo plazo una importante reducción de la acetilación de la histona H3 en la corteza y el hipocampo, la cual, sin embargo, fue evitada por la administración de TSA. De forma interesante, se observó que cuanto mayor fue la reducción en los niveles de acetilación de la H3 en la corteza y el hipocampo, peor fue el desempeño de los sujetos en la prueba de memoria espacial (incremento en la latencia, reducción de la velocidad, menor preferencia por el agujero y la zona meta). Por el contrario, en animales sin entrenamiento, el estrés agudo indujo un aumento de la acetilación de la histona H3 en la corteza, el hipocampo y la amígdala, el cual, sin embargo, también fue prevenido por la inhibición de las HDACs.

Hasta ahora, los mecanismos epigenéticos relacionados con la consolidación de la memoria espacial y el estrés agudo se habían descrito de forma independiente. Se conocía que el incremento en la acetilación de las histonas se relaciona con mejoras en la memoria espacial (Korzus, Rosenfeld and Mayford, 2004; Maurice *et al.*, 2008; Stefanko *et al.*, 2009; Bousiges *et al.*, 2010; Dagnas and Mons, 2013; Intlekofer *et al.*, 2013; Carter *et al.*, 2015; Dagnas *et al.*, 2015) y que la facilitación de la consolidación



de la memoria por inhibidores de las HDACs se relaciona con la hiperacetilación de las histonas en estructuras como la corteza y el hipocampo (Murphy *et al.*, 2001; Vecsey *et al.*, 2007; Bredy and Barad, 2008; Fontán-Lozano *et al.*, 2008; Guan *et al.*, 2009; Hawk, Florian and Abel, 2011). Por el contrario, el incremento en la expresión y/o actividad de las HDACs induce la desacetilación de las histonas en el hipocampo y deteriora la formación de la memoria (Maurice *et al.*, 2008; Guan *et al.*, 2009; Gräff, Rei, *et al.*, 2012).

Por su parte, los efectos del estrés sobre los niveles de acetilación de histonas son variados, dependiendo de factores como su intensidad, duración y frecuencia, entre otros (Hunter, 2012; Stankiewicz, Swiergiel and Lisowski, 2013; Reul, 2014). Así, mientras que el estrés agudo breve (15 minutos de nado forzado) promueve la rápida acetilación de las histonas en el hipocampo (Bilang-Bleuel *et al.*, 2005; Roozendaal *et al.*, 2010; Carter, Mifsud and Reul, 2015), el estrés intenso o la elevación pronunciada en los niveles de glucocorticoides incrementan la actividad de las HDACs en el hipocampo, el hipotálamo o las células alveolares (Ito, Barnes and Adcock, 2000; Barnes, Adcock and Ito, 2005; Fuchikami *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2011; Sailaja *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2014) y reducen la acetilación de la histona H4 (K12) y la fosfoacetilación de H3 (pS10/acK9) en el hipocampo (Ferland and Schrader, 2011). De forma semejante, el estrés crónico prenatal (Benoit, Rakic and Frick, 2015), post-natal (Weaver *et al.*, 2004; Weaver, Meaney and Szyf, 2006; Weaver, 2007) o en la edad adulta (Rei *et al.*, 2015) induce una hipoacetilación de las histonas en el hipocampo dorsal, efecto que puede ser persistente (Hollis *et al.*, 2010; Covington *et al.*, 2012) y se asocia a la aparición de conductas tipo-ansiedad y tipo-depresión.

En este contexto, los hallazgos acá presentados sugieren que el estrés agudo, al igual que el estrés intenso o crónico, altera el balance de la acetilación de histonas en regiones del cerebro que sustentan la formación de la memoria a largo plazo, interfiriendo probablemente con la inducción de patrones de expresión génica requeridos para permitir la consolidación de la memoria espacial y para responder a subsiguientes demandas ambientales. Además, la hiperacetilación de las histonas inducida en la amígdala por el estrés agudo podría relacionarse con el incremento de conductas defensivas evaluadas en el laberinto en cruz elevado, así como el incremento de los niveles de corticosterona en plasma después de la exposición al laberinto (ANEXO A). En este sentido, se ha encontrado que la consolidación de

memorias aversivas requiere de la hiperacetilación de las histonas en el núcleo basolateral de la amígdala (Monsey *et al.*, 2011; Whittle and Singewald, 2014).

El hecho de que el estrés agudo tenga efectos opuestos sobre la acetilación de histonas en animales entrenados y no entrenados señala la importancia de la interacción de los mecanismos moleculares activados por el estrés y por el entrenamiento espacial, así como la dinámica temporal de los mismos. Sin embargo, el hecho de que la inhibición de las HDACs resulte efectiva para prevenir los cambios en los niveles de acetilación inducidos por estrés, en animales entrenados y no entrenados, señala que el balance de la acetilación de histonas resulta ser un evento central en la regulación de los efectos del estrés. Explicar los efectos opuestos del estrés agudo sobre los niveles de acetilación de las histonas en animales entrenados y no entrenados requerirá experimentos adicionales que analicen las dinámicas temporales de los cambios en la acetilación de histonas inducidos por los tratamientos de forma separada y en interacción, así como el análisis de la actividad y expresión de proteínas con actividad HAT y HDAC y el impacto de la inhibición de las HDACs por TSA en tal dinámica.

#### **5.1.4. El efecto del estrés agudo sobre la memoria espacial depende del momento de su inducción**

El efecto deletéreo del estrés agudo inducido antes del entrenamiento en la tarea espacial, contrasta con el efecto de mejora que produce cuando se induce inmediatamente después del entrenamiento (Ureña, 2016), y con los efectos benéficos de la administración intraperitoneal de dosis moderadas de corticosterona (0.125 mg/kg) post-entrenamiento (Cerón and Lamprea, 2016). Múltiples estudios en modelos animales, y también con personas, han indicado que los efectos del estrés agudo sobre la memoria dependen de manera crítica de su relación temporal (McEwen, 2007; Sandi and Pinelo-Nava, 2007; Cadle and Zoladz, 2015; Shields *et al.*, 2017). Se ha observado que los efectos deletéreos del estrés aparecen cuando éste se induce con suficiente anticipación al entrenamiento, mientras que cuando se induce después del entrenamiento, se da un efecto de mejora (McEwen, 2007; Sandi and Pinelo-Nava, 2007; Cadle and Zoladz, 2015). Algunos modelos se han propuesto para explicar estas diferencias asociadas a la relación temporal entre estrés y entrenamiento (ver figura 5). En términos generales, se plantea que la liberación de

inicial de adrenalina y glutamato inducida por el estrés agudo promueve la excitabilidad de las neuronas en hipocampo y favorece la consolidación de la memoria; por el contrario, cuando la inducción del estrés ocurre con anticipación al entrenamiento, la excitabilidad inicial ha pasado y promovido una fase refractaria debida a la desensibilización de receptores de glutamato tipo NMDA y a los efectos genómicos de la corticosterona en neuronas del hipocampo, lo que previene la consolidación de la memoria. Estos modelos, sin embargo, no han incluido posibles mecanismos epigenéticos, tales como cambios dinámicos en la acetilación de histonas en el hipocampo, que también parecen estar mediando estos efectos (Covington *et al.*, 2009, 2012, 2015; Gräff, Woldemichael, *et al.*, 2012). Al analizar nuestros resultados en este contexto hipotetizamos que, dado que el estrés agudo por 1 hora de restricción de movimientos induce a corto plazo una hipoacetilación de la histona H3 (Ureña, 2016), es probable que este efecto contrarreste la hiperacetilación que induce el entrenamiento espacial a corto plazo y, por tanto, se deteriore la consolidación de la memoria. Ahora, la hipoacetilación de las histonas inducida por estrés también podría tener un papel benéfico en la consolidación de la memoria espacial. En este sentido, una vez que el entrenamiento ha inducido el patrón de expresión génica que permite la consolidación de la memoria a largo plazo, la hipoacetilación evitaría la interferencia de nueva información, favoreciendo por tanto la mejor consolidación de la información a largo plazo. En este sentido, en el Grupo de Neurofisiología Comportamental ha encontrado que el entrenamiento espacial en el laberinto de Barnes induce inicialmente la hiperacetilación de la H3 en el hipocampo y la corteza (1 hora post-entrenamiento), pero poco después (2 horas) produce una hipoacetilación en estas mismas regiones (Ureña, 2016). Además, se ha reportado recientemente que la inducción de la expresión génica pone en marcha mecanismos compensatorios que reprimen activamente dicha expresión poco después de su inducción (Cho *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016; Yu and Kaang, 2016). En este sentido, el intercambio de la H2A por su variante H2A.Z reprime la expresión después de la transcripción (Yang *et al.*, 2016). De manera consistente, también se ha encontrado que, el incremento en los niveles de acetilación de histonas induce el incremento en la expresión de proteínas de complejos co-represores como REST o Sin3A que se asocian a proteínas con actividad desacetilasa como HDAC2 y HDAC3 (Lopez-Atalaya *et al.*, 2013).

### **5.1.5. El entrenamiento espacial, el estrés agudo y la inhibición de las HDACs alteran de forma dinámica el balance de acetilación de las histonas**

En el presente estudio analizamos los efectos a largo plazo del entrenamiento espacial, estrés e inhibición de las HDACs sobre los niveles de acetilación de histonas en la corteza, el hipocampo y la amígdala (ANEXO E).

Al analizar en conjunto los resultados de todos los grupos experimentales (con y sin entrenamiento), encontramos que el entrenamiento espacial disminuye la acetilación de las histonas en la corteza, el hipocampo y la amígdala. Esta reducción, que en principio resulta contraria a lo esperado, pues la consolidación de la memoria espacial se asocia a incrementos en la acetilación de histonas, tiene sentido al entender la dinámica que permite el mantenimiento de la acetilación de histonas en niveles óptimos. En este sentido, estudios recientes en el Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia mostraron que el entrenamiento espacial en el laberinto de Barnes induce un incremento rápido en los niveles de acH3K14 en la corteza prelímbica y el hipocampo 1 hora después de terminado el entrenamiento (datos sin publicar), mientras que 2 horas después del entrenamiento se observa una reducción en los niveles de acetilación por debajo del nivel basal (Ureña, 2016). Estos resultados apuntan, como se señaló antes, a que el incremento inicial en los niveles de acetilación de las histonas inducido por el entrenamiento espacial activa mecanismos homeostáticos que conducen a la tardía hipoacetilación compensatoria que se observa hasta 24 horas después de terminado el entrenamiento.

De manera semejante a lo observado con el entrenamiento, también encontramos que la inhibición de las HDACs con TSA produjo a largo plazo una reducción en los niveles de acetilación de la H3 en la corteza prelímbica, efecto que contrasta con su acción de evitar la desacetilación de las histonas a corto plazo (ANEXO B). En este sentido, se ha reportado previamente que la exposición de células en cultivo a inhibidores de las HDACs induce respuestas compensatorias que conducen a la hipoacetilación demorada de las histonas. En un estudio pionero, Covault y colaboradores (1982) expusieron células de hepatoma (HTC) al inhibidor de las HDACs butirato de sodio, y siguieron los cambios en los niveles de acetilación de histonas en presencia del inhibidor y luego de su retirada. Como se esperaba, el butirato de sodio incrementó inicialmente los niveles de acetilación en las histonas H2a, H2b, H3 y H4, pero al retirarse el fármaco, se observaron reducciones

progresivas en los niveles de acetilación de histonas, incluso por debajo de los niveles basales (14-h), efecto que se atribuyó a la reducción en la expresión de proteínas con actividad HAT (Covault *et al.*, 1982). En este mismo sentido, se ha encontrado que la exposición a inhibidores de las HDACs, como SAHA o ácido valpróico, reduce la expresión de genes que codifican para proteínas con actividad HAT en linfoblastos humanos en cultivos (Halsall *et al.*, 2015). Efectos compensatorios para mantener el balance de acetilación de las histonas se han reportado incluso en plantas. Se reportó que células de alfalfa (*Medicago sativa*) en cultivo expuestas a TSA muestran una hiperacetilación inicial de las histonas H2b, H3 y H4, efecto que es seguido de incrementos progresivos en la actividad desacetilasa, que conducen a la hipoacetilación de las histonas hasta por 18 horas (Waterborg and Kapros, 2002). De forma notable, también se ha reportado que ratones adultos a los que se les administró de forma sistémica TSA, expresan un programa genético relacionado con la desacetilación de las histonas y la condensación de la cromatina en el hipocampo (Lopez-Atalaya *et al.*, 2013).

Finalmente, al analizar el estrés como factor común en los grupos experimentales con y sin entrenamiento, encontramos que éste induce la hiperacetilación de la H3 en la amígdala, pero sus efectos en la corteza y el hipocampo dependen de su interacción con el entrenamiento, provocando una hiperacetilación tardía en los animales sin entrenamiento espacial, pero una hipoacetilación tardía en los animales entrenados. Como se discutió antes, es probable que la hiperacetilación de la H3 en la amígdala se asocie al incremento de conductas defensivas e hiperactividad del eje HPA en respuesta a nuevos desafíos ambientales que se han observado tras la restricción de movimientos durante 1 hora (ANEXO A). La hiperacetilación de la histona H3 en la corteza y el hipocampo inducida por estrés en animales no entrenados parece resultar de activación de mecanismos compensatorios. En la presente investigación encontramos que el estrés agudo induce a largo plazo una hiperacetilación de la H3 en la corteza prelímbica y el hipocampo, efectos que contrastan la hipoacetilación de la H3 inducida por este mismo protocolo de estrés 1 hora después de terminada su inducción (Ureña, 2016). Efectos compensatorios en la acetilación de las histonas inducidos por estrés han sido descritos en un modelo de estrés crónico. Covington y colaboradores han descrito que el desafío social repetido durante 10 días consecutivos induce una rápida hipoacetilación de H3 en la lisina 14

en el núcleo accumbens de ratones C57BL/6J, una hora después de terminado el protocolo de estrés, y que, sin embargo, 1 ó 10 días después de terminado el estrés se presentan reducciones persistentes en la acetilación de histonas, efecto que se asoció a la reducción en la expresión de HDAC2 en esta región del cerebro (Covington *et al.*, 2009).

Estos resultados sugieren que los cambios en la acetilación de las histonas inducidos por el entrenamiento espacial, el estrés o la inhibición de las HDACs, se asocian con la activación de mecanismos compensatorios que regulan de forma dinámica el balance de acetilación de histonas, por lo que las interacciones entre los tratamientos resultan complejas y dependen de forma crítica del momento de su inducción. En conjunto, estos resultados permiten inferir un papel dinámico de la acetilación de las histonas como mecanismo epigenético subyacente a los efectos del estrés agudo sobre la consolidación de la memoria espacial.

#### **5.1.6. La inhibición de las HDACs previene los cambios en HDAC2/Hdac2 inducidos por el estrés agudo únicamente en animales sin entrenamiento en la tarea espacial**

Se ha descrito que la sobre-expresión de HDAC2 en el hipocampo deteriora la consolidación de la memoria espacial (Guan *et al.*, 2009) y que el estrés prenatal o crónico inducen su sobre-expresión, provocando la reducción de los niveles de acetilación de histonas en el hipocampo dorsal y deteriorando la consolidación de la memoria (Benoit, Rakic and Frick, 2015; Rei *et al.*, 2015). Múltiples reportes indican que el incremento en los niveles de glucocorticoides induce la expresión de HDAC2 (Guan *et al.*, 2009; Penney and Tsai, 2014; Rei *et al.*, 2015; Duan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017), proteína que, además, puede asociarse con el receptor de glucocorticoides, reprimiendo la transcripción de genes con secuencias GRE en su promotor, o induciendo la trans-represión de genes sin esta secuencia (Ito, Barnes and Adcock, 2000; Barnes, Adcock and Ito, 2005). Sin embargo, los efectos del estrés agudo sobre la expresión de HDAC2 y su relación con la consolidación de la memoria espacial y la acetilación de histonas no se habían estudiado antes. En el presente estudio exploramos si los cambios a largo plazo en la acetilación de las histonas inducidos por los tratamientos experimentales se relacionaban con cambios en la traducción o la transcripción de HDAC2 en la corteza, el hipocampo y la amígdala.

En términos generales, encontramos que el estrés agudo alteró a largo plazo la expresión de HDAC2 en la corteza, el hipocampo y la amígdala de animales entrenados y no entrenados en la tarea espacial, cambios que, sin embargo, se evitaron con la inhibición de las HDACs, sólo en animales sin entrenamiento. De forma llamativa, la expresión de HDAC2 en la corteza y el hipocampo de animales sin entrenamiento se asoció con el nivel de acetilación de la histona H3 en estas mismas regiones. Al analizar la transcripción de *Hdac2*, encontramos que el estrés redujo su expresión en la corteza y la amígdala de animales no entrenados, y que la inhibición de las HDACs previno este efecto. Sin embargo, en animales con entrenamiento en la tarea espacial, el estrés incrementó la expresión de HDAC2 en la corteza, pero la redujo en el hipocampo, mientras que indujo el incremento de *Hdac2* en la corteza, efectos que no se previnieron con la inhibición de las HDACs. Estos resultados señalan que, como se esperaba, el estrés agudo altera la expresión de HDAC2 y que la expresión de esta proteína se asocia con cambios en los niveles de acetilación de las histonas. Sin embargo, dado que la inhibición de las HDACs no resultó efectiva para prevenir estos cambios en animales entrenados, la regulación de la expresión de HDAC2 por el estrés agudo parece depender, además de la acetilación de histonas, de otros mecanismos activados por el entrenamiento en la tarea espacial. Se conoce que el entrenamiento espacial en el laberinto de Barnes altera de forma dinámica la actividad de proteínas quinasas y fosfatasa en el hipocampo (Ortíz-Montero, 2011) las cuales pueden fosforilar/desfosforilar las histonas, y que el entrenamiento en otros modelos de memoria induce cambios en la metilación de las histonas (Gupta *et al.*, 2010; Kim and Kaang, 2017) y del DNA (Rodrigues, Schafe and LeDoux, 2004; Roth *et al.*, 2015; Oliveira, 2016) en el hipocampo y la corteza, por lo que es probable que estas otras modificaciones epigenéticas tengan un papel en la regulación de la expresión de HDAC2.

También se encontró que el entrenamiento espacial, analizado como factor, provoca reducción de la expresión de HDAC2 e incremento de la expresión de *Hdac2* en el hipocampo, cambios que sugieren la participación de mecanismos compensatorios en la expresión de esta desacetilasa de histonas. En apoyo a esta posibilidad, también se observó, por una parte, que la inhibición de las HDACs provoca reducciones de la expresión de HDAC2 e incremento de la transcripción de *Hdac2* en el hipocampo y, por otra, que el estrés agudo provoca aumento de la

expresión de HDAC2 y reducción de la expresión de *Hdac2* en el hipocampo. Si bien se ha descrito que el complejo GR/glucocorticoide se une a la secuencia GRE en el promotor de HDAC2 para inducir su transcripción (Guan *et al.*, 2009; Penney and Tsai, 2014; Rei *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017), se desconocen los mecanismos epigenéticos que regulan la expresión de HDAC2. Sin embargo, nuestros resultados señalan que la inducción de la expresión de HDAC2 por estrés agudo está regulada por la acetilación de las histonas y que probablemente, otros mecanismos epigenéticos también lo hacen; de hecho, cabe la posibilidad de que los incrementos en HDAC2 puedan posteriormente reducir la acetilación de las histonas en su promotor, reduciendo su transcripción de manera homeostática.

Finalmente, dado que la inhibición de las HDACs no previno los cambios en la expresión de HDAC2 en animales con entrenamiento espacial y que en estos animales la expresión de HDAC2 no se asoció con el desempeño en la prueba de memoria o los niveles de acetilación de la histona H3, es muy probable que el efecto benéfico de la inhibición de las HDACs sobre la memoria en animales estresados esté mediado por otras desacetilasas de histonas. En este sentido, se ha identificado que otras HDACs de tipo I y II, como la HDAC1, HDAC3, HDAC5 o HDAC6, regulan la respuesta de estrés (White and Wood, 2014) y la consolidación de la memoria (Gräff and Tsai, 2013b). Será entonces interesante explorar los cambios inducidos por el estrés, el entrenamiento y la inhibición de las HDACs sobre estas otras desacetilasas en el hipocampo y la corteza.

#### **5.1.7. La inhibición de las HDACs previene que el estrés agudo altere la expresión de GR/*Nr3c1* y los niveles de corticosterona en plasma después de la prueba de memoria**

Dado que la expresión y/o actividad de HDAC2 está regulada por la activación de los receptores de glucocorticoides, y que la respuesta de estrés depende de la activación y densidad de GR en regiones del cerebro que regulan la actividad del eje HPA y participan en la consolidación de la memoria, resultó esencial conocer los efectos del estrés agudo sobre los niveles de corticosterona y la expresión de GR/*Nr3c1*, así como su asociación con HDAC2.



Se ha descrito que el estrés post-natal (Palma-Gudiel *et al.*, 2015), el estrés crónico en la adultez (Kitraki, Karandrea and Kittas, 1999; Meyer *et al.*, 2001; Fuchsl and Reber, 2016), el estrés agudo intenso asociado a estrés post-traumático (Liberzon *et al.*, 1999; Vukojevic *et al.*, 2014), y el estrés agudo breve (Mifsud *et al.*, 2016) alteran la expresión de GR/*Nr3c1* en el hipocampo de forma dinámica y persistente, alterando la regulación negativa de la respuesta de estrés ante nuevas demandas ambientales.

En concordancia con estos estudios, en la presente investigación se encontró que el estrés alteró la expresión de GR y *Nr3c1* en la corteza y el hipocampo; específicamente, el estrés agudo redujo la expresión de GR en la corteza y la aumentó en el hipocampo de animales entrenados y no entrenados, mientras redujo la expresión de *Nr3c1* en la corteza y el hipocampo de animales sin entrenamiento, pero la incrementó en animales entrenados. Además, el estrés agudo mejoró el incremento en los niveles de corticosterona en plasma en respuesta a la prueba de memoria; aumento asociado con un peor desempeño en la prueba de memoria (incremento en la latencia a meta y disminución de la velocidad media de desplazamiento). De forma notable, la inhibición sistémica de las HDACs evitó estos cambios. Estos resultados indican que la modificación la expresión del receptor de glucocorticoides en la corteza y el hipocampo y la facilitación de la liberación de corticosterona durante la prueba de memoria provocadas por un estrés agudo son mediadas por alteración del balance de acetilación de las histonas. En apoyo de esta afirmación, también se encontró que la expresión de GR se asoció de forma positiva con los niveles de acH3K14 en la corteza, y de forma negativa en el hipocampo. El papel de la acetilación de histonas en la regulación de la respuesta de estrés y la consolidación de la memoria había sido previamente investigado por Maurice y colaboradores (2008), quienes encontraron que la delección de PCAF (factor asociado a p300/CBP), una proteína con actividad HAT, provoca en ratones un fenotipo caracterizado por una respuesta exagerada del eje HPA y deterioro de la memoria (Maurice *et al.*, 2008).

Otros mecanismos epigenéticos, además de la acetilación de las histonas, se han relacionado con los efectos del estrés sobre la regulación de la expresión de GR/*Nr3c1*. Por ejemplo, el trato negligente de las madres a sus hijos durante el periodo de lactancia induce metilación del DNA en el promotor del exón 17 del gen *Nr3c1* en el hipocampo, además de hipoacetilación de la histona H3(K9), lo que provoca en la edad adulta una respuesta exacerbada del eje HPA e incremento de

conductas defensivas (Weaver *et al.*, 2004; Weaver, Meaney and Szyf, 2006; Weaver, 2007). Estos cambios en la metilación del promotor 1<sub>7</sub> del gen *Nr3c1* también se observaron en el hipocampo de animales adultos que experimentaron estrés prenatal (Mueller and Bale, 2008), en hombres suicidas con historia de maltrato infantil (McGowan *et al.*, 2009), en leucocitos de personas adultas que crecieron en circunstancias adversas (Tyrka *et al.*, 2012) y en células del cordón umbilical de recién nacidos cuyas madres sufrieron depresión durante el último trimestre del embarazo (Oberlander *et al.*, 2008). De forma notable, la administración intracerebroventricular o intrahipocampal de TSA durante siete días consecutivos revirtió los cambios en la expresión de *Nr3c1*, la desregulación del eje HPA, y la expresión de conductas tipo-ansiedad en ratones adultos hijos de madres negligentes (Weaver *et al.*, 2004; Weaver, Meaney and Szyf, 2006; Weaver, 2007).

Finalmente, en el presente estudio se encontró que, por lo general, los cambios en la expresión de GR inducidos por el estrés agudo tuvieron un sentido opuesto a los cambios en la expresión de *Nr3c1*. Estos resultados concuerdan con el fenómeno denominado *regulación homóloga a la baja* del receptor de glucocorticoides, el cual constituye un mecanismo homeostático auto-regulatorio para lidiar con cambios en los niveles de glucocorticoides asociados al ritmo circadiano, la administración de corticoides exógenos o la activación de la respuesta de estrés (Dong *et al.*, 1988; Oakley and Cidlowski, 1993; Liberzon *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 2006; Mifsud *et al.*, 2016). En este sentido, se ha descrito que *Nr3c1* tiene en su promotor una secuencia reguladora de respuesta a los glucocorticoides con efecto negativo (nGRE), la cual permite reprimir su expresión tras incrementos de los niveles de glucocorticoides y la activación de GR (Kadmiel and Cidlowski, 2013; Vandevyver, Dejager and Libert, 2014; Mifsud *et al.*, 2016; Wiley, Higgins and Athey, 2016).

En conjunto, estos resultados sugieren que el estrés afecta la memoria y la actividad del eje HPA a través de la regulación epigenética de la expresión de *Nr3c1*/GR en estructuras como el hipocampo y la corteza cerebral. Identificar las HDACs específicas que median los cambios inducidos por el estrés será relevante para probar inhibidores selectivos de las HDACs como herramienta terapéutica para prevenir sus efectos deletéreos.

### **5.1.8. Existe una asociación entre la expresión de HDAC2 y GR, pero su co-localización no es alterada por los tratamientos experimentales**

Dado que la expresión y actividad de HDAC2 está regulada por la activación de GR (Ito, Barnes and Adcock, 2000; Barnes, Adcock and Ito, 2005; Guan *et al.*, 2009; Penney and Tsai, 2014; Rei *et al.*, 2015; Duan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017), se exploró la relación entre la expresión de HDAC2 y la de GR, así como su co-localización nuclear en respuesta al estrés, el entrenamiento espacial y la inhibición de las HDACs.

Se encontró que la expresión de HDAC2 y GR se asocian de forma positiva en la corteza prefrontal y el hipocampo (fascia dentada y CA1), independientemente de si los animales recibieron o no entrenamiento en la tarea espacial. Además, la expresión de *Hdac2* y *Nr3c1* también se asocian de forma positiva, e independiente del entrenamiento, en corteza prefrontal y amígdala, mientras que en el hipocampo esta correlación solo ocurrió en animales no entrenados. Estos resultados sugieren que la expresión de HDAC2/*Hdac2* y GR/*Nr3c1* puede ser regulada por mecanismos comunes que inducen o reprimen la transcripción de ambas proteínas; una segunda posibilidad, es que ambas proteínas se regulen mutuamente. En este sentido, es posible proponer que incrementos en la expresión y activación de GR inducen la transcripción de *Hdac2*, y que los incrementos en HDAC2 inducen la desacetilación de las histonas alrededor de *Nr3c1*; incluso, se podría plantear que HDAC2 y GR forman un complejo con afinidad por la secuencia nGRE en el promotor de *Nr3c1*, reprimiendo así su transcripción. Esta regulación bidireccional podría servir como mecanismo de regulación negativa de *Hdac2* y *Nr3c1*, y explicaría las correlaciones observadas en el presente estudio. Experimentos adicionales deberán desarrollarse para evaluar esta hipótesis. Si bien, no hay reportes de que el complejo HDAC2/GR se ubique en la secuencia nGRE del promotor de *Nr3c1* en neuronas, si se ha identificado que este complejo puede reprimir la expresión de múltiples genes en células alveolares expuestas a glucocorticoides como la dexametasona (Ito, Barnes and Adcock, 2000; Barnes, Adcock and Ito, 2005).

Dado que HDAC2 y GR pueden formar parte de complejos represores (Ito, Barnes and Adcock, 2000; Barnes, Adcock and Ito, 2005), se exploró la co-localización de estas proteínas en el núcleo de células de la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala en respuesta a los distintos tratamientos experimentales. En términos

generales, se encontró que, si bien HDAC2 y GR están co-localizados en el núcleo de las células de la corteza, el hipocampo y la amígdala, los tratamientos experimentales no modifican de forma sistemática la co-localización de estas proteínas, independientemente de si los animales fueron o no entrenados en la tarea espacial. De forma aislada, se observó que, en animales estresados, que no fueron entrenados en la tarea espacial, la co-localización de HDAC2 y GR en el hipocampo (fascia dentada y CA1) fue significativamente menor; por otra parte, en animales entrenados en la tarea espacial la co-localización de estas proteínas en la amígdala basolateral fue significativamente menor.

En conjunto, estos resultados sugieren que, a largo plazo, si bien el estrés altera a la expresión de HDAC2 y GR, no modifica su co-localización nuclear. Este hecho no descarta que ocurran cambios en asociación de estas proteínas a corto plazo, posibilidad que tendrá que ser evaluada mediante experimentos adicionales.

#### **5.1.9. La inhibición de las HDACs no previene que el estrés altere a largo plazo la expresión de sub-unidades del receptor NMDA**

El deterioro en la consolidación de la memoria dependiente del hipocampo inducida por estrés crónico se asocia con la reducción en la expresión de genes que codifican para subunidades del receptor NMDA, como *Grin2a* y *Grin2b* (Rei *et al.*, 2015), así como con la reducción en la proporción *Grin2b/Grin2a* en el hipocampo (Costa-Nunes *et al.*, 2014). Es probable que estos cambios inducidos por estrés dependan de incrementos en los niveles de corticosterona, en tanto que la perfusión con 5.0 nM de corticosterona en rodajas de hipocampo induce una disminución en la expresión de *Grin1* y *Grin2b*, así como la razón *Grin2b/Grin2a* (Mahmoud and Amer, 2014). Además, la expresión de *Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b* también se ve disminuida en la corteza prefrontal de ratas expuestas estrés crónico (Lee and Goto, 2011). Dados estos antecedentes, se evaluó si, el efecto deletéreo del estrés sobre la memoria, y su reversión por la inhibición de las HDACs, se relaciona con cambios en la expresión de subunidades del receptor NMDA en la corteza, el hipocampo o la amígdala.

De forma semejante a lo reportado en estudios con estrés crónico, el estrés agudo, por sí solo, redujo la expresión de *Grin1* y *Grin2b* en el hipocampo y la corteza prefrontal, además de reducir la expresión de *Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b* en la amígdala. Sin embargo, la inhibición de las HDACs de tipo I y II no previno tales cambios, lo que

sugiere la participación de mecanismos distintos o adicionales al desbalance en acetilación de las histonas en la regulación de la expresión de subunidades del receptor NMDA por estrés agudo. De forma interesante, se observó que el entrenamiento espacial indujo la reducción de la expresión de *Grin1* y *Grin2b* en la corteza y el hipocampo, y que el estrés en animales entrenados atenúo tales reducciones en la corteza, pero no en el hipocampo. La inhibición de las HDACs solo previno el efecto del estrés sobre *Grin2b* en la corteza, pero no sobre *Grin1*, lo que de nuevo sugiere que los efectos del estrés agudo sobre la expresión de subunidades del receptor NMDA está regulada por mecanismo adicionales a la alteración del balance de acetilación de las histonas por las HDACs de tipo I y II. En este sentido, se ha descrito que el estrés induce otras modificaciones epigenéticas, que incluyen cambios en la expresión de las HDACs de tipo III (sirtuínas) (Ferland and Schrader, 2011) y la metilación del DNA (Klengel *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2015) o las histonas (Hunter, 2012).

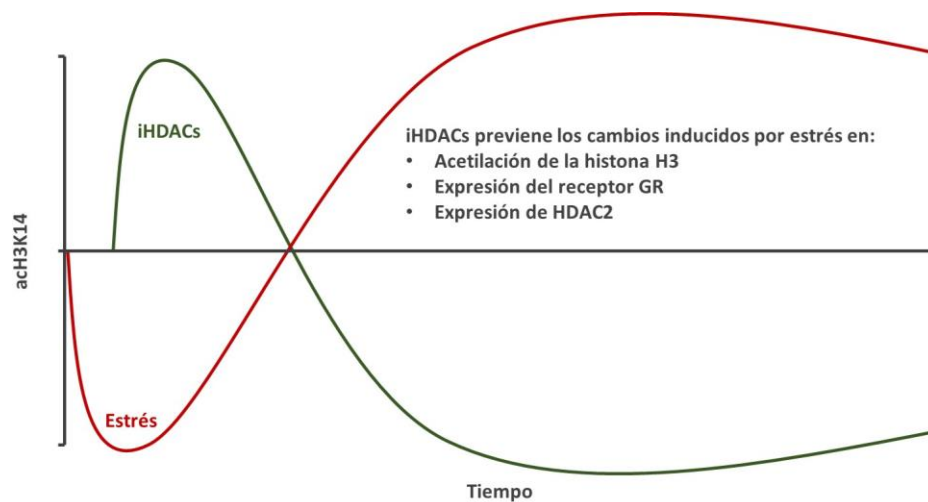
Por otra parte, si bien la inducción de la plasticidad sináptica y el aprendizaje espacial depende de la activación de receptores de glutamato, particularmente receptores de tipo NMDA (Rezvani, 2006; Morris, 2013), el papel de este tipo de receptor en la consolidación de la memoria ha sido menos explorado. Se ha descrito, sin embargo, que el entrenamiento espacial induce a corto plazo reducciones en la expresión de la subunidad NR1 del receptor NMDA, subunidad necesaria para la conformación de receptores funcionales, pero una mayor proporción de la subunidad NR2B con respecto de NR2A en el hipocampo (Cavallaro, D'Agata and Alkon, 2002; Loftis and Janowsky, 2003), cambios que supondrían una reducción del número de receptores NMDA funcionales, los cuales, sin embargo, tendrían la propiedad de permanecer abiertos por más tiempo. En el presente estudio, se encontró que el entrenamiento espacial indujo la reducción a largo plazo de la expresión de los genes *Grin1* en la corteza y el hipocampo, lo que es concordante con los estudios antes mencionados; sin embargo, el entrenamiento también indujo la reducción de la expresión de *Grin2b* en estas mismas regiones, además de reducir la proporción *Grin2b/Grin2a* en la corteza. Estas observaciones sugieren que la expresión de genes codificantes para receptores NMDA probablemente esté sujeta a regulación homeostática manteniendo la excitabilidad de los circuitos neuronales de la corteza y el hipocampo en un rango óptimo. En este sentido, se ha descrito que los cambios en el número de las sinapsis y su fuerza inducidos por el aprendizaje supone un desafío

para mantener la actividad neuronal en un rango estable, lo que requiere la activación de mecanismos de plasticidad sináptica homeostática (Turrigiano, 2012; Fox and Stryker, 2017), como por ejemplo, la regulación del tráfico de receptores de glutamato en sitios sinápticos en respuesta a cambios en las tasas de disparo de la célula a través de un conjunto de sensores dependientes de calcio (Turrigiano, 2012).

En conjunto, estos resultados sugieren que es poco probable que los efectos deletéreos del estrés agudo sobre la consolidación de la memoria espacial se relacionen con cambios en la expresión de subunidades del receptor NMDA. Sin embargo, indican que los cambios en la expresión de estos genes, inducidos por estrés agudo, involucran mecanismos adicionales a la desacetilación de las histonas. Por otra parte, estos resultados plantean la posibilidad de que el estrés agudo y el entrenamiento espacial puedan interferir a largo plazo con la adquisición de nueva información al reducir la densidad de receptores NMDA y alterar su conformación.

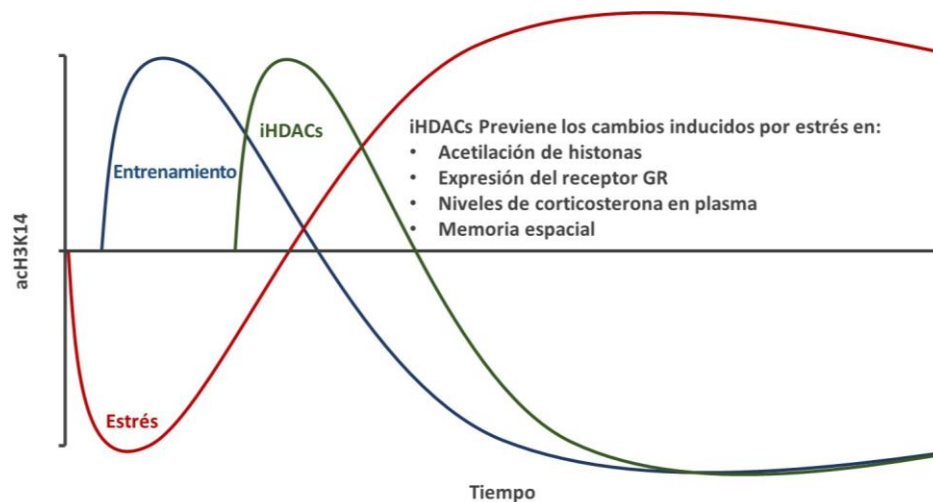
#### 5.1.10. Los efectos del estrés agudo están mediados epigenéticamente por la alteración del balance de la acetilación de las histonas

En conjunto, estos resultados sugieren que la inhibición de las HDACs contrarresta la hipoacetilación inicial inducida por el estrés agudo, evitando los cambios en el balance de acetilación de las histonas, así como los cambios en la expresión del *GR/Nr3c1* y *HDAC2/Hdac2* en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala de ratas Wistar macho adultas (Figura 66).



**Figura 66. Modelo explicativo de la efectividad de la inhibición de las HDACs para prevenir los efectos del estrés agudo en animales no entrenados en la tarea espacial.**

Por su parte, la hipoacetilación de las histonas, inducida por el estrés agudo antes del entrenamiento espacial, competiría con la hiperacetilación inducida por el entrenamiento, interfiriendo con la consolidación de la memoria. Sin embargo, la inhibición de las HDACs prevendría la desacetilación de las histonas y evitaría el desbalance de los niveles de acetilación de las histonas y los cambios en la expresión de *GR/Nr3c1*, permitiendo la consolidación de la memoria y evitando los incrementos en los niveles de corticosterona ante nuevas demandas ambientales (Figura 67).



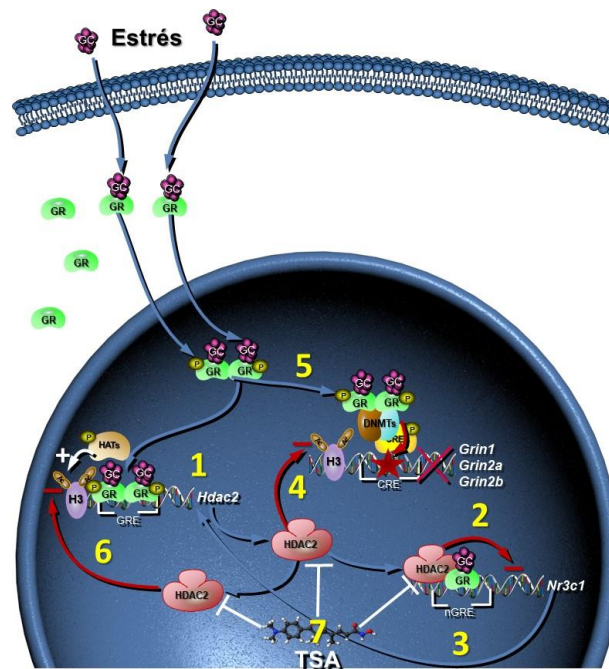
**Figura 67. Modelo explicativo de la efectividad de la inhibición de las HDACs para prevenir los efectos del estrés agudo en animales entrenados en el laberinto espacial de Barnes.**

#### 5.1.11. Preguntas de investigación derivadas de los resultados obtenidos

A partir de los hallazgos acá discutidos surgen nuevas preguntas acerca de los mecanismos que regulan la expresión de GR, HDAC2 y subunidades del receptor NMDA. En la figura 68 se representan de forma gráfica las preguntas relacionadas con los efectos del estrés agudo y la inhibición de las HDACs en animales no entrenados en la tarea espacial, mientras que en la figura 69 se representan las preguntas surgidas de los resultados obtenidos con animales entrenados.

Dados los efectos del estrés agudo sobre la acetilación de histonas, la expresión de GR, HDAC2 y subunidades del receptor NMDA, así como la efectividad de la inhibición de las HDACs de tipo I y II para prevenir la mayoría de estos efectos en **animales no entrenados** en la tarea espacial (Figura 67), se plantean las siguientes preguntas:

1. ¿El estrés agudo por restricción de movimientos durante 1 hora induce incrementos en los niveles de corticosterona que activan los receptores GR y se unen al elemento GRE en el promotor de HDAC2 induciendo su expresión?
2. ¿La expresión de *Nr3c1* es reprimida por el complejo GR/HDAC2 unido a la secuencia nGRE en su promotor?
3. ¿La reducción en GR afecta de forma negativa la expresión de *Hdac2*?
4. ¿La HDAC2 reprime la expresión de subunidades de NMDA por la desacetilación de las histonas próximas a sus promotores?
5. ¿La activación de GR dada por incrementos en los niveles de glucocorticoides después del estrés agudo activa otros mecanismos epigenéticos, como la metilación del DNA, en los promotores de subunidades del receptor NMDA?
6. ¿La HDAC2 desacetila las histonas ubicadas en proximidad su promotor, actuando como un mecanismo de auto-regulación de su expresión?
7. ¿La prevención de los efectos del estrés se da por su acción sobre HDAC2?

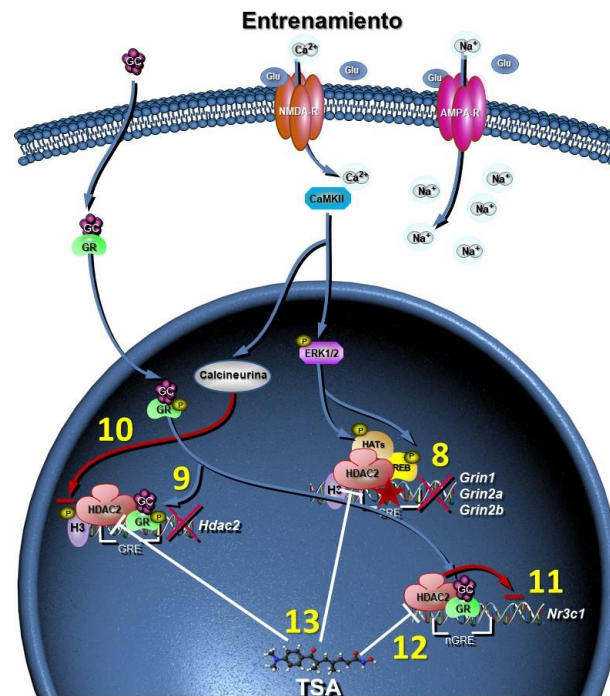


**Figura 68. Preguntas de investigación derivadas de los experimentos realizados en animales sin entrenamiento espacial.** Los números señalan la pregunta formulada en el texto. Abreviaturas: GC: glucocorticoides; GR: receptor de glucocorticoides; H3: histona H3; HATs: acetil-transferasa de histonas; DNMTs: desmetilasas de DNA; P: fosforilación; Ac: acetilación ★: metilación; GRE: elemento de respuesta a los glucocorticoides; nGRE: elemento negativo de respuesta a los glucocorticoides; CRE: elemento de unión CREB. TSA: Tricostatina A. Las flechas en azul indican inducción, mientras que las flechas en rojo indican desacetilación. La inhibición de HDAC2 por la TSA se señala en forma de T en color blanco.



Dada la efectividad de la inhibición de las HDACs de tipo I y II para prevenir algunos de los efectos del estrés sobre la acetilación de histonas y la expresión de GR/*Nr3c1* en **animales entrenados en la tarea espacial** (Figura 68), se plantean las siguientes preguntas:

8. ¿La desacetilación de las histonas por HDAC2 inducida por estrés antes del entrenamiento reprime la expresión de subunidades del receptor NMDA?
9. ¿El incremento en los niveles de corticosterona inducidos por el entrenamiento espacial alteran la expresión de *Hdac2*?
10. ¿El entrenamiento induce la activación de proteínas fosfatasa que desfosforilan las histonas promoviendo la represión de la expresión génica?
11. ¿El incremento de los niveles de corticosterona inducidos por el entrenamiento espacial afectan la expresión de *Nr3c1*?



**Figura 69. Preguntas de investigación derivadas de los experimentos realizados en animales entrenados en la tarea espacial.** Los números señalan la pregunta formulada en el texto. Abreviaturas: NMDA-R: receptor NMDA; AMPA-R: receptor AMPA;  $Ca^{2+}$ : Calcio;  $Na^{+}$ : Sodio; CaMKII: calcio-calmodulina quinasa-II; ERK1/2: proteínas quinasa activadas por mitógenos 1/2; GC: glucocorticoides; GR: receptor de glucocorticoides; H3: histona H3; HATs: acetil-transferasa de histonas; DNMTs: desmetilasas de DNA; P: fosforilación; Ac: acetilación ★: metilación; GRE: elemento de respuesta a los glucocorticoides; nGRE: elemento negativo de respuesta a los glucocorticoides; CRE: elemento de unión CREB. TSA: Tricostatina A. Las flechas en azul indican inducción. La inhibición de HDAC2 por la TSA se señala en forma de T en color blanco.

12. ¿La recuperación de la expresión de GR depende de la inhibición de HDAC2 por TSA?
13. ¿La expresión de HDAC2 y de subunidades de NMDA están reguladas por la metilación del DNA o la desfosforilación de las colas de las histonas, por lo que la inhibición de las HDACs no es efectiva para revertir los efectos del estrés en su expresión?

## 5.2. Conclusiones

El estrés agudo por sí sólo provoca, 24 horas después de su inducción, incremento en los niveles de acetilación de histonas en la corteza y el hipocampo y la amígdala; cambios que se contraponen a la hipoacetilación inducida por el entrenamiento espacial en estas mismas regiones. De forma notable, el estrés agudo inducido antes del entrenamiento espacial potencia la hipoacetilación de las histonas inducida por el entrenamiento.

El estrés agudo induce la expresión de GR y HDAC2 en el hipocampo, mientras la reprime en la corteza prelímbica, independientemente de si los animales fueron o no entrenados en la tarea espacial. La expresión de GR y HDAC2 en la corteza y el hipocampo se relaciona de manera significativa con los niveles de acetilación de la histona H3.

La inducción del estrés agudo antes del entrenamiento espacial deteriora el desempeño en la prueba de memoria a largo plazo, y tal desmejora se relaciona con reducción en los niveles de acetilación de la histona H3 en la corteza y el hipocampo. Además, el estrés agudo, inducido antes del entrenamiento, potencia el incremento en las concentraciones de corticosterona plasmática en respuesta a la prueba de memoria.

La alteración del balance de acetilación de las histonas mediante la inhibición de las desacetilasas de tipo I y II, previene que el estrés deteriore la consolidación de la memoria espacial, potencie el incremento en los niveles de corticosterona después de la prueba de memoria, e induzca cambios a largo plazo en la acetilación de la histona H3 y en la expresión de GR y HDAC2 en distintas regiones del cerebro; esto, a pesar de que la inhibición de las desacetilasas por sí sola tiene escasos efectos, y no mejora sustancialmente la consolidación de la memoria espacial.

Los efectos tardíos del estrés agudo son, al menos parcialmente, atribuibles a cambios en la actividad desacetilasa en regiones del cerebro que sustentan la consolidación de la memoria y regulan la actividad del eje HPA, mecanismo que altera epigenéticamente la expresión de GR y HDAC2, pero no de subunidades del receptor NMDA. Estos efectos de la actividad desacetilasa dependen del contexto celular y de su interacción con los cambios moleculares inducidos por el estrés y/o el entrenamiento espacial.

### 5.3. Perspectivas Futuras

- Evaluar en el modelo *in vivo* los cambios inducidos por estrés agudo, entrenamiento espacial, e inhibición de las HDACs (pocas horas después del tratamiento) sobre los niveles de acetilación de histonas, activación de GRs (fosforilación) y HDAC2 (actividad enzimática), expresión de *Nr3c1*, *Hdac2*, *Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b* (por hibridación *in situ*), y posible asociación de HDAC2 y GRs (por ChIP) a los promotores de estos (*Nr3c1* y *Hdac2*) en la corteza pre-límbica, fascia dentada, CA1 y amígdala basolateral en ratas Wistar macho adultas.
- Evaluar la efectividad de inhibidores selectivos de las HDACs (p.e. HDAC2), administrados en el hipocampo o la corteza prefrontal, para prevenir los efectos del estrés sobre la memoria y en los demás marcadores evaluados en esta investigación.
- Evaluar en modelo *in vivo* o *ex vivo* (rodajas de tejido cerebral de ratas Wistar), la efectividad de la inhibición de las HDACs sobre los cambios inducidos por la administración de corticosterona en la plasticidad sináptica (potenciación a largo plazo) en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala de ratas Wistar y los cambios asociados en la acetilación de histonas y la expresión de GR y HDAC2.
- Evaluar en cultivos de neuronas piramidales la efectividad del silenciamiento o inhibición de selectiva de HDACs para prevenir los efectos de la exposición a corticosterona sobre los niveles de acetilación de histonas, activación de GRs (fosforilación) y HDAC2 (actividad enzimática), expresión de *Nr3c1* y *Hdac2* (por hibridación *in situ*), y la posible asociación de HDAC2 y/o GRs a los promotores de estos genes (ChIP).

## REFERENCIAS

- Acosta, A. (2007) *Determinación de niveles de corticosterona en ratos norvegicus sometidas a estrés agudo por restricción de movimientos*. Universidad Nacional de Colombia.
- Alarcón, J. M., Malleret, G., Touzani, K., Vronskaya, S., Ishii, S., Kandel, E. R. and Barco, A. (2004) 'Chromatin Acetylation, Memory, and LTP Are Impaired in CBP+/- Mice: A Model for the Cognitive Deficit in Rubinstein-Taybi Syndrome and Its Amelioration', *Neuron*, 42(6), pp. 947–959. doi: 10.1016/j.neuron.2004.05.021.
- Alberini, C. M., Bambah-mukku, D. and Chen, D. Y. (2012) 'Memory Consolidation and its Underlying Mechanisms', in *Memory Mechanisms in Health and Disease*, pp. 147–170. Available at: [http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/9789814366700\\_0005?queryID=%24%7BresultBean.queryID%7D&](http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/9789814366700_0005?queryID=%24%7BresultBean.queryID%7D&).
- Alberini, C. M. and Kandel, E. R. (2015) 'The regulation of transcription in memory consolidation', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), p. a021741. doi: 10.1101/cshperspect.a021741.
- Almaguer-Melian, W., Bergado-Rosado, J., Pavon-Fuentes, N., Alberti-Amador, E., Merceron-Martinez, D. and Frey, J. U. (2012) 'Novelty exposure overcomes foot shock-induced spatial-memory impairment by processes of synaptic-tagging in rats', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(3), pp. 953–958. doi: 10.1073/pnas.1114198109.
- Barichello, T., Generoso, J. S., Simões, L. R., Faller, C. J., Ceretta, R. A., Petronilho, F., Lopes-Borges, J., Valvassori, S. S. and Quevedo, J. (2015) 'Sodium Butyrate Prevents Memory Impairment by Re-establishing BDNF and GDNF Expression in Experimental Pneumococcal Meningitis.', *Molecular neurobiology*, 52(1), pp. 734–40. doi: 10.1007/s12035-014-8914-3.
- Barnes, C. A. (1979) 'Memory Deficits Associated With Senescence: A Neurophysiological and Behavioral Study in the Rat', *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93(1), pp. 74–104. doi: 10.1037/h0077579.
- Barnes, P., Adcock, I. and Ito, K. (2005) 'Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases', *European Respiratory Journal*, 25(3), pp. 552–563. doi: 10.1183/09031936.05.00117504.
- Barrett, R. M., Malvaez, M., Kramar, E., Matheos, D. P., Arrizon, A., Cabrera, S. M., Lynch, G., Greene, R. W. and Wood, M. A. (2011) 'Hippocampal focal knockout of CBP affects specific histone modifications, long-term potentiation, and long-term memory.', *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 36(8), pp. 1545–56. doi: 10.1038/npp.2011.61.
- Benedetti, R., Conte, M. and Altucci, L. (2015) 'Targeting Histone Deacetylases in Diseases: Where Are We?', *Antioxidants & redox signaling*, 23(1), pp. 99–126. doi: 10.1089/ars.2013.5776.
- Benoit, J. D., Rakic, P. and Frick, K. M. (2015) 'Prenatal stress induces spatial memory deficits and epigenetic changes in the hippocampus indicative of heterochromatin formation and reduced gene expression', *Behavioural Brain Research*, 281, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.bbr.2014.12.001.
- Bilang-Bleuel, A., Ulbricht, S., Chandramohan, Y., De Carli, S., Droste, S. K. and Reul, J. M. H. M. (2005) 'Psychological stress increases histone H3 phosphorylation in adult dentate gyrus granule neurons: involvement in a glucocorticoid receptor-dependent behavioural', *European Journal of Neuroscience*, 22(August), pp. 1691–1700. doi:

- 10.1111/j.1460-9568.2005.04358.x.
- Bohacek, J. and Mansuy, I. M. (2015) 'Molecular insights into transgenerational non-genetic inheritance of acquired behaviours', *Nature Reviews Genetics*. Nature Research, 16(11), pp. 641–652. doi: 10.1038/nrg3964.
- Bousiges, O., Neidl, R., Majchrzak, M., Muller, M. A., Barbelivien, A., Pereira de Vasconcelos, A., Schneider, A., Loeffler, J. P., Cassel, J. C. and Boutillier, A. L. (2013) 'Detection of Histone Acetylation Levels in the Dorsal Hippocampus Reveals Early Tagging on Specific Residues of H2B and H4 Histones in Response to Learning', *PLoS ONE*, 8(3), p. e57816. doi: 10.1371/journal.pone.0057816.
- Bousiges, O., Vasconcelos, A. P. De, Neidl, R., Cosquer, B., Herbeaux, K., Panteleeva, I., Loeffler, J.-P., Cassel, J.-C. and Boutillier, A.-L. (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: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group, 35(13), pp. 2521–37. doi: 10.1038/npp.2010.117.
- Bredy, T. T. W. and Barad, M. (2008) 'The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear', *Learning & Memory*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15(1), pp. 39–45. doi: 10.1101/lm.801108.
- Buynitsky, T. and Mostofsky, D. I. (2009) 'Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments.', *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 33(7), pp. 1089–98. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.05.004.
- Cadle, C. E. and Zoladz, P. R. (2015) 'Stress time-dependently influences the acquisition and retrieval of unrelated information by producing a memory of its own.', *Frontiers in Psychology*, 6(June), p. 910. doi: 10.3389/fpsyg.2015.00910.
- Carroll, J. C., Iba, M., Bangasser, D. A., Valentino, R. J., James, M. J., Brunden, K. R., Lee, V. M.-Y. and Trojanowski, J. Q. (2011) 'Chronic stress exacerbates tau pathology, neurodegeneration, and cognitive performance through a corticotropin-releasing factor receptor-dependent mechanism in a transgenic mouse model of tauopathy.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(40), pp. 14436–49. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3836-11.2011.
- Carter, S. D., Mifsud, K. R. and Reul, J. M. H. M. (2015) 'Distinct epigenetic and gene expression changes in rat hippocampal neurons after Morris water maze training.', *Frontiers in behavioral neuroscience*. Frontiers, 9, p. 156. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00156.
- Carter, S. D., Mifsud, K. R., Reul, J. M. H. M., Hunter, R. G., Weaver, I. C. G., De Kloet, E. R., Gray, J. D., Reul, J. M. H. M., Carter, S. D. and Mifsud, K. R. (2015) 'Distinct epigenetic and gene expression changes in rat hippocampal neurons after Morris water maze training.', *Frontiers in behavioral neuroscience*. Frontiers, 9(June), p. 156. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00156.
- Castino, M. R., Cornish, J. L. and Clemens, K. J. (2015) 'Inhibition of histone deacetylases facilitates extinction and attenuates reinstatement of nicotine self-administration in rats.', *PloS one*, 10(4), p. e0124796. doi: 10.1371/journal.pone.0124796.
- Cavallaro, S., D'Agata, V. and Alkon, D. L. (2002) 'Programs of gene expression during the laying down of memory formation as revealed by DNA microarrays', *Neurochemical Research*, 27(10), pp. 1201–1207. doi: 10.1023/A:1020933627597.
- Cavallaro, S., D'Agata, V., Manickam, P., Dufour, F. and Alkon, D. L. (2002) 'Memory-

- specific temporal profiles of gene expression in the hippocampus.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), pp. 16279–16284. doi: 10.1073/pnas.242597199.
- Cerón, J. (2015) *Efectos de la exposición a un estresor o la administración sistémica de corticosterona en dos momentos post-entrenamiento, sobre la consolidación de la memoria espacial en el laberinto circular de Barnes*.
- Cerón, J. and Lamprea, M. R. (2016) 'Effects of stress and corticosterone on spatial memory consolidation and Arc protein expression in hippocampal dentate gyrus in rats', in *Neuroscience - 2016, Book 3 (Sunday)*. San Diego CA: Society for Neuroscience, p. 128. Available at: <http://www.abstractsonline.com/pp8/#!/4071/presentation/31539> (Accessed: 5 October 2017).
- Chandramohan, Y., Droste, S. K. and Reul, J. M. H. 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), pp. 815–28. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04396.x.
- Chattarji, S., Tomar, A., Suvrathan, A., Ghosh, S. and Rahman, M. M. (2015) 'Neighborhood matters: divergent patterns of stress-induced plasticity across the brain', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 18(10), pp. 1364–1375. doi: 10.1038/nn.4115.
- Chen, D. Y., Bambah-Mukku, D., Pollonini, G. and Alberini, C. M. (2012) 'Glucocorticoid receptors recruit the CaMKII $\alpha$ -BDNF-CREB pathways to mediate memory consolidation.', *Nature neuroscience*, 15(12), pp. 1707–14. doi: 10.1038/nn.3266.
- Chen, M. H., Li, Y. J., Kawakami, T., Xu, S. M. and Chuang, P. T. (2004) 'Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates', *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 18(6), pp. 641–659. doi: 10.1101/gad.1185804.
- Cho, J., Yu, N.-K., Choi, J.-H., Sim, S.-E., Kang, S. J., Kwak, C., Lee, S., Kim, J., Choi, D. II, Kim, V. N. and Kaang, B. (2015) 'Multiple repressive mechanisms in the hippocampus during memory formation.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 350(6256), pp. 82–7. doi: 10.1126/science.aac7368.
- Chwang, W. B., Arthur, J. S., Schumacher, A. and Sweatt, J. D. (2007) 'The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(46), pp. 12732–42. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2522-07.2007.
- Chwang, W. B., O'Riordan, K. J., Levenson, J. M. and Sweatt, J. D. (2006) 'ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning', *Learning & Memory*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 13(3), pp. 322–328. doi: 10.1101/lm.152906.
- Codd, R., Braich, N., Liu, J., Soe, C. Z. and Pakchung, A. a H. (2009) 'Zn(II)-dependent histone deacetylase inhibitors: suberoylanilide hydroxamic acid and trichostatin A.', *The International Journal of biochemistry and Cell Biology*, 41(4), pp. 736–739. doi: 10.1016/j.biocel.2008.05.026.
- Costa-Nunes, J., Zubareva, O., Araújo-Correia, M., Valença, A., Schroeter, C. A., Pawluski, J. L., Vignisse, J., Steinbusch, H., Hermes, D., Phillipines, M., Steinbusch, H. M. W. and Strekalova, T. (2014) 'Altered emotionality, hippocampus-dependent

- performance and expression of NMDA receptor subunit mRNAs in chronically stressed mice', *Stress*, 17(1), pp. 108–116. doi: 10.3109/10253890.2013.872619.
- Covault, J., Sealy, L., Schnell, R., Shires, A. and Chalkley, R. (1982) 'Histone hypoacetylation following release of HTC cells from butyrate.', *The Journal of biological chemistry*, 257(10), pp. 5809–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6950936> (Accessed: 24 October 2017).
- Covington, H. E., Maze, I., LaPlant, Q. C., Vialou, V. F., Ohnishi, Y. N., Berton, O., Fass, D. M., Renthal, W., Rush, A. J., Wu, E. Y., Ghose, S., Krishnan, V., Russo, S. J., Tamminga, C., Haggarty, S. J. and Nestler, E. J. (2009) 'Antidepressant Actions of Histone Deacetylase Inhibitors', *Journal of Neuroscience*, 29(37), pp. 11451–11460. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1758-09.2009.
- Covington, H. E., Maze, I., Sun, H., Bomze, H. M., DeMaio, K. D., Wu, E. Y., Dietz, D. M., Lobo, M. K., Ghose, S., Mouzon, E., Neve, R. L., Tamminga, C. A. and Nestler, E. J. (2011) 'A role for repressive histone methylation in cocaine-induced vulnerability to stress.', *Neuron*, 71(4), pp. 656–70. doi: 10.1016/j.neuron.2011.06.007.
- Covington, H. E., Maze, I., Vialou, V. and Nestler, E. J. (2015) 'Antidepressant action of HDAC inhibition in the prefrontal cortex', *Neuroscience*. NIH Public Access, 298, pp. 329–335. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.04.030.
- Covington, H. E., Vialou, V. F., Laplant, Q. C., Ohnishi, Y. N. and Nestler, E. J. (2012) 'Hippocampal-Dependent Antidepressant-Like Activity of Histone Deacetylase Inhibition', *Neuroscience Letters*, 493(3), pp. 122–126. doi: 10.1016/j.neulet.2011.02.022.Hippocampal-Dependent.
- Crystal, J. D. (2016) 'Animal models of source memory.', *Journal of the experimental analysis of behavior*, 105(1), pp. 56–67. doi: 10.1002/jeab.173.
- Dagnas, M., Micheau, J., Decorte, L., Beracochea, D. and Mons, N. (2015) 'Post-training, intrahippocampal HDAC inhibition differentially impacts neural circuits underlying spatial memory in adult and aged mice', *Hippocampus*, p. n/a-n/a. doi: 10.1002/hipo.22406.
- Dagnas, M. and Mons, N. (2013) 'Region- and age-specific patterns of histone acetylation related to spatial and cued learning in the water maze', *Hippocampus*, 23(7), pp. 581–591. doi: 10.1002/hipo.22116.
- Diamond, D. M., Campbell, A. M., Park, C. R., Woodson, J. C., Conrad, C. D., Bachstetter, A. D. and Mervis, R. F. (2006) 'Influence of predator stress on the consolidation versus retrieval of long-term spatial memory and hippocampal spinogenesis', *Hippocampus*, 16(7), pp. 571–576. doi: 10.1002/hipo.20188.
- Dokmanovic, M., Clarke, C. and Marks, P. a (2007) 'Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives.', *Molecular cancer research : MCR*, 5(10), pp. 981–989. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-0324.
- Dong, Y., Poellinger, L., Gustafsson, J.-Å. and Okret, S. (1988) 'Regulation of Glucocorticoid Receptor Expression: Evidence for Transcriptional and Posttranslational Mechanisms', *Molecular Endocrinology*, 2(12), pp. 1256–1264. doi: 10.1210/mend-2-12-1256.
- Duan, R., Liu, X., Wang, T., Wu, L., Gao, X. and Zhang, Z. (2016) 'Histone Acetylation Regulation in Sleep Deprivation-Induced Spatial Memory Impairment', *Neurochemical Research*, 41(9), pp. 2223–2232. doi: 10.1007/s11064-016-1937-6.
- Earls, L. R., Westmoreland, J. J. and Zakharenko, S. S. (2014) 'Non-coding RNA regulation of synaptic plasticity and memory: Implications for aging', *Ageing Research Reviews*, 17, pp. 34–42. doi: 10.1016/j.arr.2014.03.004.
- Eichenbaum, H. and Fortin, N. J. (2005) 'Bridging the gap between brain and behavior:



- cognitive and neural mechanisms of episodic memory.’, *Journal of the experimental analysis of behavior*, 84(3), pp. 619–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16596982> (Accessed: 23 July 2016).
- Falkenberg, K. J. and Johnstone, R. W. (2014) ‘Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders.’, *Nature reviews. Drug discovery*. Nature Publishing Group, 13(9), pp. 673–91. doi: 10.1038/nrd4360.
- Fass, D. M., Reis, S. A., Ghosh, B., Hennig, K. M., Joseph, N. F., Zhao, W.-N., Nieland, T. J. F., Guan, J.-S., Kuhnle, C. E. G., Tang, W., Barker, D. D., Mazitschek, R., Schreiber, S. L., Tsai, L.-H. and Haggarty, S. J. (2013) ‘Crebinostat: a novel cognitive enhancer that inhibits histone deacetylase activity and modulates chromatin-mediated neuroplasticity.’, *Neuropharmacology*. NIH Public Access, 64, pp. 81–96. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.06.043.
- Federman, N., Fustiñana, M. S. and Romano, A. (2009) ‘Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories.’, *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 16(10), pp. 600–6. doi: 10.1101/lm.1537009.
- Feng, J., Zhou, Y., Campbell, S. L., Le, T., Li, E., Sweatt, J. D., Silva, A. J. and Fan, G. (2010) ‘Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons.’, *Nature neuroscience*, 13(4), pp. 423–30. doi: 10.1038/nn.2514.
- Ferland, C. L. and Schrader, L. A. (2011) ‘Regulation of histone acetylation in the hippocampus of chronically stressed rats: A potential role of sirtuins’, *Neuroscience*. Elsevier Inc., 174, pp. 104–114. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.10.077.
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Mungenast, A. and Tsai, L. H. (2010) ‘Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders’, *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(12), pp. 605–617. doi: 10.1016/j.tips.2010.09.003.
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M. and Tsai, L.-H. (2007) ‘Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling.’, *Nature*, 447(7141), pp. 178–82. doi: 10.1038/nature05772.
- Fontán-Lozano, Á., Romero-Granados, R., Troncoso, J., Múnera, A., Delgado-García, J. M., Carrión, Á. M. and 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), pp. 193–201. doi: 10.1016/j.mcn.2008.06.009.
- Fox, K. and Stryker, M. (2017) ‘Integrating Hebbian and homeostatic plasticity: introduction.’, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. The Royal Society, 372(1715). doi: 10.1098/rstb.2016.0413.
- Francis, Y. I., Fà, M., Ashraf, H., Zhang, H., Staniszewski, A., Latchman, D. S. and Arancio, O. (2009) ‘Dysregulation of histone acetylation in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer’s disease.’, *Journal of Alzheimer’s disease : JAD*, 18(1), pp. 131–9. doi: 10.3233/JAD-2009-1134.
- Franklin, T. B. and Mansuy, I. M. (2010) ‘The prevalence of epigenetic mechanisms in the regulation of cognitive functions and behaviour’, *Current Opinion in Neurobiology*. Elsevier Ltd, 20(4), pp. 441–449. doi: 10.1016/j.conb.2010.04.007.
- Franklin, T. B., Saab, B. J. and Mansuy, I. M. (2012) ‘Neural Mechanisms of Stress Resilience and Vulnerability’, *Neuron*, 75(5), pp. 747–761. doi: 10.1016/j.neuron.2012.08.016.
- Fuchikami, M., Morinobu, S., Kurata, A., Yamamoto, S. and Yamawaki, S. (2009) ‘Single immobilization stress differentially alters the expression profile of transcripts of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and histone acetylation at its promoters

- in the rat hippocampus.', *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 12(1), pp. 73–82. doi: 10.1017/S1461145708008997.
- Fuchikami, M., Yamamoto, S., Morinobu, S., Takei, S. and Yamawaki, S. (2010) 'Epigenetic regulation of BDNF gene in response to stress', *Psychiatry Investigation*, 7(4), pp. 251–256. doi: 10.4306/pi.2010.7.4.251.
- Füchsl, A. M. and Reber, S. O. (2016) 'Chronic Psychosocial Stress and Negative Feedback Inhibition: Enhanced Hippocampal Glucocorticoid Signaling despite Lower Cytoplasmic GR Expression.', *PloS one*. Public Library of Science, 11(4), p. e0153164. doi: 10.1371/journal.pone.0153164.
- Ganai, S. A., Ramadoss, M. and Mahadevan, V. (2016) 'Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors - emerging roles in neuronal memory, learning, synaptic plasticity and neural regeneration.', *Current neuropharmacology*, 14(1), pp. 55–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26487502> (Accessed: 22 October 2016).
- García, A., Martí, O., Vallès, A., Dal-Zotto, S. and Armario, A. (2000) 'Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure.', *Neuroendocrinology*, 72(2), pp. 114–25. doi: 54578.
- Genoux, D., Haditsch, U., Knobloch, M., Michalon, A., Storm, D. and Mansuy, I. M. (2002) 'Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory.', *Nature*, 418(6901), pp. 970–5. doi: 10.1038/nature00928.
- Gerber, D. E., Boothman, D. A., Fattah, F. J., Dong, Y., Zhu, H., Skelton, R. A., Priddy, L. L., Vo, P., Dowell, J. E., Sarode, V., Leff, R., Meek, C., Xie, Y. and Schiller, J. H. (2015) 'Phase 1 study of romidepsin plus erlotinib in advanced non-small cell lung cancer.', *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 90(3), pp. 534–41. doi: 10.1016/j.lungcan.2015.10.008.
- Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (2000) 'The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors.', *Genes & development*, 14(2), pp. 121–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10652267> (Accessed: 18 October 2016).
- Good, M. (2002) 'Spatial Memory and Hippocampal Function: Where are we now?', *Psicológica*, 23, pp. 109–138.
- Govindarajan, N., Agis-Balboa, R. C., Walter, J., Sananbenesi, F. and Fischer, A. (2011) 'Sodium butyrate improves memory function in an Alzheimer's disease mouse model when administered at an advanced stage of disease progression.', *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 26(1), pp. 187–97. doi: 10.3233/JAD-2011-110080.
- Graff, J., Kim, D., Dobbin, M. M. and Tsai, L. (2011) 'Epigenetic Regulation of Gene Expression in Physiological and Pathological Brain Processes', *Physiological Reviews*. American Physiological Society, 91(2), pp. 603–649. doi: 10.1152/physrev.00012.2010.
- Gräff, J., Koshibu, K., Jouvenceau, A., Dutar, P. and Mansuy, I. M. (2010) 'Protein phosphatase 1-dependent transcriptional programs for long-term memory and plasticity.', *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 17(7), pp. 355–63. doi: 10.1101/lm.1766510.
- Gräff, J., Rei, D., Guan, J., Wang, W.-Y., Seo, J., Hennig, K. M., Nieland, T. J. F., Fass, D. M., Kao, P. F., Su, S. C., Samiei, A., Joseph, N., Haggarty, S. J., Kahn, M., Su, S. C., Samiei, A., Joseph, N., Haggarty, S. J., Delalle, I. and Tsai, L.-H. (2012) 'An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain', *Nature*, 483(7388), pp. 222–226. doi: 10.1038/nature10849.An.
- Gräff, J. and Tsai, L.-H. (2013a) 'Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin.', *Nature reviews. Neuroscience*. Nature Publishing Group, 14(2), pp. 97–

111. doi: 10.1038/nrn3427.
- Gräff, J. and Tsai, L.-H. (2013b) 'The potential of HDAC inhibitors as cognitive enhancers.', *Annual review of pharmacology and toxicology*, 53, pp. 311–30. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140216.
- Gräff, J., Woldemichael, B. T., Berchtold, D., Dewarrat, G. and Mansuy, I. M. (2012) 'Dynamic histone marks in the hippocampus and cortex facilitate memory consolidation', *Nature communications*, 3, p. 991. doi: 10.1038/ncomms1997.
- Groeneweg, F. L., Karst, H., de Kloet, E. R. and Joëls, M. (2011) 'Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response', *The Journal of endocrinology*. BioScientifica, 209(2), pp. 153–167. doi: 10.1530/JOE-10-0472.
- Guan, J.-S., Haggarty, S. J., Giacometti, E., Dannenberg, J.-H., Joseph, N., Gao, J., Nieland, T. J. F., Zhou, Y., Wang, X., Mazitschek, R., Bradner, J. E., DePinho, R. A., Jaenisch, R. and Tsai, L.-H. (2009) 'HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity.', *Nature*. Nature Publishing Group, 459(7243), pp. 55–60. doi: 10.1038/nature07925.
- Guan, Z., Giustetto, M., Lomvardas, S., Kim, J. H., Miniaci, M. C., Schwartz, J. H., Thanos, D. and Kandel, E. R. (2002) 'Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure', *Cell*. Elsevier, 111(4), pp. 483–493. doi: 10.1016/S0092-8674(02)01074-7.
- Gupta, S., Kim, S. Y., Artis, S., Molfese, D. L., Schumacher, A., Sweatt, J. D., Paylor, R. E. and Lubin, F. D. (2010) 'Histone methylation regulates memory formation.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(10), pp. 3589–99. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3732-09.2010.
- Gutiérrez-Mecinas, M., Trollope, A. F., Collins, A., Morfett, H., Hesketh, S. a, Kersanté, F. and Reul, J. M. H. M. (2011) 'Long-lasting behavioral responses to stress involve a direct interaction of glucocorticoid receptors with', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(33), pp. 13806–13811. doi: 10.1073/pnas.1104383108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1104383108.
- Haettig, J., Stefanko, D. P., Multani, M. L., Figueroa, D. X., McQuown, S. C. and Wood, M. A. (2011) 'HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a CBP-dependent manner.', *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 18(2), pp. 71–9. doi: 10.1101/lm.1986911.
- Halsall, J. A., Turan, N., Wiersma, M. and 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(1), p. 29. doi: 10.1186/s13072-015-0021-9.
- Hart, A. K., Fioravante, D., Liu, R.-Y., Phares, G. A., Cleary, L. J. and Byrne, J. H. (2011) 'Serotonin-mediated synapsin expression is necessary for long-term facilitation of the Aplysia sensorimotor synapse.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(50), pp. 18401–11. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2816-11.2011.
- Hawk, J. D., Florian, C. and Abel, T. (2011) 'Post-training intrahippocampal inhibition of class I histone deacetylases enhances long-term object-location memory.', *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 18(6), pp. 367–370. doi: 10.1101/lm.2097411.
- Heller, E. A., Cates, H. M., Peña, C. J., Sun, H., Shao, N., Feng, J., Golden, S. A., Herman, J. P., Walsh, J. J., Mazei-Robison, M., Ferguson, D., Knight, S., Gerber, M. A., Nievera, C., Han, M.-H., Russo, S. J., Tamminga, C. S., Neve, R. L., Shen, L.,

- Zhang, H. S., Zhang, F. and Nestler, E. J. (2014) 'Locus-specific epigenetic remodeling controls addiction- and depression-related behaviors.', *Nature neuroscience*, 17(12), pp. 1720–7. doi: 10.1038/nn.3871.
- Hinwood, M., Tynan, R. J., Day, T. A. and Walker, F. R. (2011) 'Repeated social defeat selectively increases  $\delta$ FosB expression and histone H3 acetylation in the infralimbic medial prefrontal cortex.', *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 21(2), pp. 262–71. doi: 10.1093/cercor/bhq080.
- Hollis, F., Wang, H., Dietz, D., Gunjan, A. and Kabbaj, M. (2010) 'The effects of repeated social defeat on long-term depressive-like behavior and short-term histone modifications in the hippocampus in male Sprague-Dawley rats', *Psychopharmacology*, 211(1), pp. 69–77. doi: 10.1007/s00213-010-1869-9.
- Hudson, G. M., Watson, P. J., Fairall, L., Jamieson, A. G. and Schwabe, J. W. R. (2015) 'Insights into the Recruitment of Class IIa Histone Deacetylases (HDACs) to the SMRT/NCOR Transcriptional Repression Complex.', *The Journal of biological chemistry*, 290(29), pp. 18237–44. doi: 10.1074/jbc.M115.661058.
- Hunter, R. G. (2012) 'Epigenetic effects of stress and corticosteroids in the brain', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 6(April), p. 18. doi: 10.3389/fncel.2012.00018.
- Hunter, R. G., McCarthy, K. J., Milne, T. a, Pfaff, D. W. and McEwen, B. S. (2009) 'Regulation of hippocampal H3 histone methylation by acute and chronic stress.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(49), pp. 20912–20917. doi: 10.1073/pnas.0911143106.
- Intlekofer, K. A., Berchtold, N. C., Malvaez, M., Carlos, A. J., McQuown, S. C., Cunningham, M. J., Wood, M. A. and Cotman, C. W. (2013) 'Exercise and sodium butyrate transform a subthreshold learning event into long-term memory via a brain-derived neurotrophic factor-dependent mechanism.', *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(10), pp. 2027–34. doi: 10.1038/npp.2013.104.
- Ito, K., Barnes, P. J. and Adcock, I. M. (2000) 'Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12.', *Molecular and cellular biology*, 20(18), pp. 6891–6903. doi: 10.1128/MCB.20.18.6891-6903.2000.
- Itzhak, Y., Liddie, S. and Anderson, K. L. (2013) 'Sodium butyrate-induced histone acetylation strengthens the expression of cocaine-associated contextual memory.', *Neurobiology of learning and memory*, 102, pp. 34–42. doi: 10.1016/j.nlm.2013.03.007.
- Iyer, S. P. and Foss, F. F. (2015) 'Romidepsin for the Treatment of Peripheral T-Cell Lymphoma.', *The oncologist*, 20(9), pp. 1084–91. doi: 10.1634/theoncologist.2015-0043.
- Jeong, Y. H., Park, C. H., Yoo, J., Shin, K. Y., Ahn, S.-M., Kim, H.-S., Lee, S. H., Emson, P. C. and Suh, Y.-H. (2006) 'Chronic stress accelerates learning and memory impairments and increases amyloid deposition in APPV717I-CT100 transgenic mice, an Alzheimer's disease model.', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(6), pp. 729–31. doi: 10.1096/fj.05-4265fje.
- Kadmiel, M. and Cidlowski, J. a. (2013) 'Glucocorticoid receptor signaling in health and disease', *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd, 34(9), pp. 518–530. doi: 10.1016/j.tips.2013.07.003.
- Karamboulas, C., Swedani, A., Ward, C., Al-Madhoun, A. S., Wilton, S., Boisvenue, S., Ridgeway, A. G. and Skerjanc, I. S. (2006) 'HDAC activity regulates entry of mesoderm

- cells into the cardiac muscle lineage', *Journal of Cell Science*, 119(20), pp. 4305–4314. doi: 10.1242/jcs.03185.
- Kart-Teke, E., De Souza Silva, M. a., Huston, J. P. and Dere, E. (2006) 'Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences', *Neurobiology of Learning and Memory*, 85(2), pp. 173–182. doi: 10.1016/j.nlm.2005.10.002.
- Kerimoglu, C., Agis-Balboa, R. C., Kranz, A., Stilling, R., Bahari-Javan, S., Benito-Garagorri, E., Halder, R., Burkhardt, S., Stewart, A. F. and Fischer, A. (2013) 'Histone-methyltransferase MLL2 (KMT2B) is required for memory formation in mice.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(8), pp. 3452–64. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3356-12.2013.
- Kilgore, M., Miller, C. A., Fass, D. M., Hennig, K. M., Haggarty, S. J., Sweatt, J. D. and Rumbaugh, G. (2010) 'Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease.', *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(4), pp. 870–80. doi: 10.1038/npp.2009.197.
- Kim, J. J. and Diamond, D. M. (2002) 'The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories.', *Nature reviews. Neuroscience*, 3(6), pp. 453–462. doi: 10.1038/nrn849.
- Kim, J. J., Koo, J. W., Lee, H. J. and Han, J.-S. (2005) 'Amygdalar inactivation blocks stress-induced impairments in hippocampal long-term potentiation and spatial memory.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(6), pp. 1532–1539. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4623-04.2005.
- Kim, J. J., Lee, H. J., Han, J. S. and Packard, M. G. (2001) 'Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. MyJoVE Corporation, 21(14), pp. 5222–5228. doi: 10.1038/5222 [pii].
- Kim, M.-S., Akhtar, M. W., Adachi, M., Mahgoub, M., Bassel-Duby, R., Kavalali, E. T., Olson, E. N. and Monteggia, L. M. (2012) 'An essential role for histone deacetylase 4 in synaptic plasticity and memory formation.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(32), pp. 10879–86. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2089-12.2012.
- Kim, S. and Kaang, B.-K. (2017) 'Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory', *Experimental & Molecular Medicine*. Nature Publishing Group, 49(1), p. e281. doi: 10.1038/emm.2016.140.
- Kino, T. (2013) 'Glucocorticoid Receptor', in LJ, D. G., G, C., and K, D. (eds) *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905394>.
- Kitamura, T., Ogawa, S. K., Roy, D. S., Okuyama, T., Morrissey, M. D., Smith, L. M., Redondo, R. L. and Tonegawa, S. (2017) 'Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory.', *Science (New York, N.Y.)*, 356(6333), pp. 73–78. doi: 10.1126/science.aam6808.
- Kitraki, E., Karandrea, D. and Kittas, C. (1999) 'Long-Lasting Effects of Stress on Glucocorticoid Receptor Gene Expression in the Rat Brain', *Neuroendocrinology*, 69(5), pp. 331–338. doi: 10.1159/000054435.
- Klengel, T., Pape, J., Binder, E. B. and Mehta, D. (2014) 'The role of DNA methylation in stress-related psychiatric disorders', *Neuropharmacology*, pp. 115–132. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.01.013.
- de Kloet, E. R., Joëls, M. and Holsboer, F. (2005) 'Stress and the brain: from adaptation to disease.', *Nature reviews. Neuroscience*, 6(6), pp. 463–75. doi: 10.1038/nrn1683.

- Korte, M. and Schmitz, D. (2016) 'Cellular and System Biology of Memory: Timing, Molecules, and Beyond.', *Physiological reviews*, 96(2), pp. 647–93. doi: 10.1152/physrev.00010.2015.
- Korzus, E., Rosenfeld, M. G. M. G. and Mayford, M. (2004) 'CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation.', *Neuron*. Elsevier, 42(6), pp. 961–72. doi: 10.1016/j.neuron.2004.06.002.
- Koshibu, K., Gräff, J., Beullens, M., Heitz, F. D., Berchtold, D., Russig, H., Farinelli, M., Bollen, M. and Mansuy, I. M. (2009) 'Protein phosphatase 1 regulates the histone code for long-term memory.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(41), pp. 13079–13089. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3610-09.2009.
- Kouraklis, G. and Theocharis, S. (2006) 'Histone deacetylase inhibitors: a novel target of anticancer therapy (review).', *Oncology reports*, 15(2), pp. 489–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16391874> (Accessed: 23 October 2016).
- Landry, C. D., Kandel, E. R. and Rajasethupathy, P. (2013) 'New mechanisms in memory storage: PiRNAs and epigenetics', *Trends in Neurosciences*. Elsevier Ltd, 36(9), pp. 535–542. doi: 10.1016/j.tins.2013.05.004.
- Lattal, K. M., Barrett, R. M. and Wood, M. A. (2007) 'Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction.', *Behavioral neuroscience*, 121(5), pp. 1125–1131. doi: 10.1037/0735-7044.121.5.1125.
- Lattal, K. M., Radulovic, J. and Lukowiak, K. (2006) 'Extinction: Does It or Doesn't It? The Requirement of Altered Gene Activity and New Protein Synthesis', *Biological Psychiatry*. Elsevier, 60(4), pp. 344–351. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.05.038.
- LeDoux, J. E. (1994) 'The amygdala: contributions to fear and stress', *Seminars in Neuroscience*, 6(4), pp. 231–237. doi: 10.1006/smns.1994.1030.
- Lee, J., Vogt, C. E., McBairty, M. and Al-Hashimi, H. M. (2013) 'Influence of dimethylsulfoxide on RNA structure and ligand binding.', *Analytical chemistry*, 85(20), pp. 9692–8. doi: 10.1021/ac402038t.
- Lee, Y. a. and Goto, Y. (2011) 'Chronic stress modulation of prefrontal cortical NMDA receptor expression disrupts limbic structure-prefrontal cortex interaction', *European Journal of Neuroscience*, 34(3), pp. 426–436. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07750.x.
- Levenson, J. M., O'Riordan, K. J., Brown, K. D., Trinh, M. a., Molfese, D. L. and Sweatt, J. D. (2004) 'Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus', *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), pp. 40545–40559. doi: 10.1074/jbc.M402229200.
- Liberzon, I., López, J. F., Flagel, S. B., Vázquez, D. M. and Young, E. A. (1999) 'Differential regulation of hippocampal glucocorticoid receptors mRNA and fast feedback: relevance to post-traumatic stress disorder.', *Journal of neuroendocrinology*, 11(1), pp. 11–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9918224> (Accessed: 21 November 2017).
- Loftis, J. M. and Janowsky, A. (2003) 'The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications.', *Pharmacology & therapeutics*, 97(1), pp. 55–85. doi: 10.1016/S0163-7258(02)00302-9.
- Lopez-Atalaya, J. P., Ito, S., Valor, L. M., Benito, E. and Barco, A. (2013) 'Genomic targets, and histone acetylation and gene expression profiling of neural HDAC inhibition', *Nucleic Acids Research*, 41(17), pp. 8072–8084. doi: 10.1093/nar/gkt590.
- Maddox, S. A. and Schafe, G. E. (2011) 'Epigenetic alterations in the lateral amygdala are required for reconsolidation of a Pavlovian fear memory.', *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 18(9), pp. 579–93. doi: 10.1101/lm.224341.
- Mahmoud, G. S. and Amer, A. S. (2014) 'Co-application of corticosterone and growth

- hormone upregulates NR2B protein and increases the NR2B:NR2A ratio and synaptic transmission in the hippocampus', *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 14(4), pp. e486–e494. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25364551> (Accessed: 22 November 2017).
- Malvaez, M., McQuown, S. C., Rogge, G. A., Astarabadi, M., Jacques, V., Carreiro, S., Rusche, J. R. and Wood, M. A. (2013) 'HDAC3-selective inhibitor enhances extinction of cocaine-seeking behavior in a persistent manner.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(7), pp. 2647–52. doi: 10.1073/pnas.1213364110.
- Maurice, T., Duclot, F., Meunier, J., Naert, G., Givalois, L., Meffre, J., Célérier, A., Jacquet, C., Copois, V., Mechti, N., Ozato, K. and Gongora, C. (2008) 'Altered memory capacities and response to stress in p300/CBP-associated factor (PCAF) histone acetylase knockout mice.', *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(7), pp. 1584–1602. doi: 10.1038/sj.npp.1301551.
- McEwen, B. S. (2007) 'Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain.', *Physiological reviews*, 87(3), pp. 873–904. doi: 10.1152/physrev.00041.2006.
- McEwen, B. S., Bowles, N. P., Gray, J. D., Hill, M. N., Hunter, R. G., Karatsoreos, I. N. and Nasca, C. (2015) 'Mechanisms of stress in the brain.', *Nature neuroscience*, 18(10), pp. 1353–63. doi: 10.1038/nn.4086.
- McEwen, B. S., Nasca, C. and Gray, J. D. (2016) 'Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex', *Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group, 41(1), pp. 3–23. doi: 10.1038/npp.2015.171.
- McGowan, P. O., Sasaki, A., D'Alessio, A. C., Dymov, S., Labonté, B., Szyf, M., Turecki, G. and Meaney, M. J. (2009) 'Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse.', *Nature neuroscience*, 12(3), pp. 342–8. doi: 10.1038/nn.2270.
- McKinsey, T. A. (2012) 'Therapeutic Potential for HDAC Inhibitors in the Heart', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52(1), pp. 303–319. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134712.
- McQuown, S. C., Barrett, R. M., Matheos, D. P., Post, R. J., Rogge, G. A., Alenghat, T., Mullican, S. E., Jones, S., Rusche, J. R., Lazar, M. A. and Wood, M. A. (2011) 'HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(2), pp. 764–74. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5052-10.2011.
- McQuown, S. C. and Wood, M. A. (2010) 'Epigenetic regulation in substance use disorders.', *Current psychiatry reports*, 12(2), pp. 145–53. doi: 10.1007/s11920-010-0099-5.
- McReynolds, J. R., Anderson, K. M., Donowho, K. M. and McIntyre, C. K. (2014) 'Noradrenergic actions in the basolateral complex of the amygdala modulate Arc expression in hippocampal synapses and consolidation of aversive and non-aversive memory', *Neurobiology of Learning and Memory*. Elsevier Inc., 115(September), pp. 49–57. doi: 10.1016/j.nlm.2014.08.016.
- Meyer, U., van Kampen, M., Isovich, E., Flügge, G. and Fuchs, E. (2001) 'Chronic psychosocial stress regulates the expression of both GR and MR mRNA in the hippocampal formation of tree shrews', *Hippocampus*, 11(3), pp. 329–336. doi: 10.1002/hipo.1047.
- Mifsud, K. R., Sauderson, E. A., Spiers, H., Carter, S. D., Trollope, A. F., Mill, J. and

- Reul, J. M. H. M. H. M. (2016) 'Rapid Down-Regulation of Glucocorticoid Gene Expression in the Dentate Gyrus after Acute Stress in vivo: Role of DNA Methylation and microRNA Activity', *Neuroendocrinology*, 8 April, pp. 157–169. doi: 10.1159/000445875.
- Millard, C. J., Varma, N., Saleh, A., Morris, K., Watson, P. J., Bottrill, A. R., Fairall, L., Smith, C. J. and Schwabe, J. W. (2016) 'The structure of the core NuRD repression complex provides insights into its interaction with chromatin.', *eLife*, 5. doi: 10.7554/eLife.13941.
- Miller, C. A., Campbell, S. L. and Sweatt, J. D. (2008) 'DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity', *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(4), pp. 599–603. doi: 10.1016/j.nlm.2007.07.016.
- Miller, C. A., Gavin, C. F., White, J. A., Parrish, R. R., Honasoge, A., Yancey, C. R., Rivera, I. M., Rubio, M. D., Rumbaugh, G. and Sweatt, J. D. (2010) 'Cortical DNA methylation maintains remote memory.', *Nature neuroscience*. NIH Public Access, 13(6), pp. 664–6. doi: 10.1038/nn.2560.
- Miller, C. A. and Sweatt, J. D. (2007) 'Covalent modification of DNA regulates memory formation.', *Neuron*. Elsevier, 53(6), pp. 857–69. doi: 10.1016/j.neuron.2007.02.022.
- Miller, L., Foradori, C. D., Lalmansingh, A. S., Sharma, D., Handa, R. J. and Uht, R. M. (2011) 'Histone deacetylase 1 (HDAC1) participates in the down-regulation of corticotropin releasing hormone gene (crh) expression.', *Physiology & behavior*, 104(2), pp. 312–20. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.03.026.
- Miyagawa, K., Tsuji, M. and Takeda, H. (2012) 'Possible involvement of histone acetylation in the development of emotional resistance to stress stimuli', *Japanese Journal of Neuropsychopharmacology*. Elsevier B.V., 32(2), pp. 263–267. doi: 10.1016/j.bbr.2012.08.010.
- Moloney, R. D., Stilling, R. M., Dinan, T. G. and Cryan, J. F. (2015) 'Early-life stress-induced visceral hypersensitivity and anxiety behavior is reversed by histone deacetylase inhibition', *Neurogastroenterology and Motility*, 27(12), pp. 1831–1836. doi: 10.1111/nmo.12675.
- Monsey, M. S., Ota, K. T., Akingbade, I. F., Hong, E. S. and Schafe, G. E. (2011) 'Epigenetic Alterations are Critical for Fear Memory Consolidation and Synaptic Plasticity in The Lateral Amygdala', *PLoS ONE*. Edited by I. Izquierdo. Public Library of Science, 6(5), p. e19958. doi: 10.1371/journal.pone.0019958.
- Morris, R. G. M. (2013) 'NMDA receptors and memory encoding', *Neuropharmacology*, 74, pp. 32–40. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.014.
- Mueller, B. R. and Bale, T. L. (2008) 'Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(36), pp. 9055–65. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1424-08.2008.
- Murphy, K. J., Fox, G. B., Foley, A. G., Gallagher, H. C., O'Connell, A., Griffin, A. M., Nau, H. and Regan, C. M. (2001) 'Pentyl-4-yn-valproic acid enhances both spatial and avoidance learning, and attenuates age-related NCAM-mediated neuroplastic decline within the rat medial temporal lobe.', *Journal of neurochemistry*, 78(4), pp. 704–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520891> (Accessed: 24 April 2015).
- NIH (2011) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th edn, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th edn. National Academies Press (US). doi: 10.17226/12910.
- O'Loinsigh, E. D., Gherardini, L. M., Gallagher, H. C., Foley, A. G., Murphy, K. J. and



- Regan, C. M. (2004) 'Differential enantioselective effects of pentyl-4-yn-valproate on spatial learning in the rat, and neurite outgrowth and cyclin D3 expression in vitro.', *Journal of neurochemistry*, 88(2), pp. 370–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14690525> (Accessed: 23 October 2016).
- Oakley, R. H. and Cidlowski, J. A. (1993) 'Homologous down regulation of the glucocorticoid receptor: the molecular machinery.', *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 3(2), pp. 63–88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8324294> (Accessed: 10 January 2018).
- Oakley, R. H. and Cidlowski, J. A. (2013) 'The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease.', *The Journal of allergy and clinical immunology*. NIH Public Access, 132(5), pp. 1033–44. doi: 10.1016/j.jaci.2013.09.007.
- Oberlander, T. F., Weinberg, J., Papsdorf, M., Grunau, R., Misri, S. and Devlin, A. M. (2008) 'Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses', *Epigenetics*, 3(2), pp. 97–106. doi: 10.4161/epi.3.2.6034.
- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H. and Nakatani, Y. (1996) 'The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases.', *Cell*, 87(5), pp. 953–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8945521> (Accessed: 18 October 2016).
- Oliveira, A. M. M. (2016) 'DNA methylation: a permissive mark in memory formation and maintenance.', *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 23(10), pp. 587–93. doi: 10.1101/lm.042739.116.
- Oliveira, A. M. M., Abel, T., Brindle, P. K. and Wood, M. A. (2006) 'Differential role for CBP and p300 CREB-binding domain in motor skill learning.', *Behavioral Neuroscience*. American Psychological Association, 120(3), pp. 724–729. doi: 10.1037/0735-7044.120.3.724.
- Oliveira, A. M. M., Estévez, M. A., Hawk, J. D., Grimes, S., Brindle, P. K. and Abel, T. (2011) 'Subregion-specific p300 conditional knock-out mice exhibit long-term memory impairments.', *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 18(3), pp. 161–9. doi: 10.1101/lm.1939811.
- Oliveira, A. M. M., Wood, M. A., McDonough, C. B. and Abel, T. (2007) 'Transgenic mice expressing an inhibitory truncated form of p300 exhibit long-term memory deficits.', *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 14(9), pp. 564–72. doi: 10.1101/lm.656907.
- Olton, D. S. (1977) 'Spatial memory.', *Scientific American*, 236(6), pp. 82–4, 89–94, 96, 98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/867028> (Accessed: 18 July 2016).
- Ortega, L. A., Prado-Rivera, M. A., Cárdenas-Poveda, D. C., McLinden, K. A., Glueck, A. C., Gutiérrez, G., Lamprea, M. R. and Papini, M. R. (2013) 'Tests of the aversive summation hypothesis in rats: Effects of restraint stress on consummatory successive negative contrast and extinction in the Barnes maze', *Learning and Motivation*, 44(3), pp. 159–173. doi: 10.1016/j.lmot.2013.02.001.
- Ortiz-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 fosfatasa pp1 y pp2b en el hipocampo*. Universidad Nacional de Colombia.
- Owen, G. R. and Brenner, E. A. (2012) 'Mapping molecular memory: navigating the cellular pathways of learning.', *Cellular and molecular neurobiology*, 32(6), pp. 919–41. doi: 10.1007/s10571-012-9836-0.

- Pacák, K. and Palkovits, M. (2001) 'Stressor specificity of central neuroendocrine responses: Implications for stress-related disorders', *Endocrine Reviews*, 22(February), pp. 502–548. doi: 10.1210/er.22.4.502.
- Pagar, K. P., Sardar, S. M. and Vavia, P. R. (2014) 'Novel L-lactide-depsipeptide polymeric carrier for enhanced brain uptake of rivastigmine in treatment of Alzheimer's disease.', *Journal of biomedical nanotechnology*, 10(3), pp. 415–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24730237> (Accessed: 22 October 2016).
- Palma-Gudiel, H., Córdova-Palomera, A., Leza, J. C. and Fañanás, L. (2015) 'Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) methylation processes as mediators of early adversity in stress-related disorders causality: A critical review', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Pergamon, 55, pp. 520–535. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.05.016.
- Palma, V. and Ruiz i Altaba, A. (2004) 'Hedgehog-Gli signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex.', *Development (Cambridge, England)*, 131(2), pp. 337–345. doi: 10.1242/dev.00930.
- Pandey, K., Sharma, K. P. and Sharma, S. K. (2015) 'Histone deacetylase inhibition facilitates massed pattern-induced synaptic plasticity and memory.', *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 22(10), pp. 514–8. doi: 10.1101/lm.039289.115.
- Panicker, J., Li, Z., McMahon, C., Sizer, C., Steadman, K., Piekarczyk, R., Bates, S. E. and Thiele, C. J. (2010) 'Romidepsin (FK228/depsipeptide) controls growth and induces apoptosis in neuroblastoma tumor cells.', *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(9), pp. 1830–8. doi: 10.4161/cc.9.9.11543.
- Park, C. R., Zoladz, P. R., Conrad, C. D., Fleshner, M. and Diamond, D. M. (2008) 'Acute predator stress impairs the consolidation and retrieval of hippocampus-dependent memory in male and female rats.', *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 15(4), pp. 271–280. doi: 10.1101/lm.721108.
- Park, J., Thomas, S. and Munster, P. N. (2015) 'Epigenetic modulation with histone deacetylase inhibitors in combination with immunotherapy.', *Epigenomics*, 7(4), pp. 641–52. doi: 10.2217/epi.15.16.
- Paxinos, G. and Watson, C. (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*.
- Peixoto, P. and Lansiaux, A. (2006) '[Histone-deacetylases inhibitors: from TSA to SAHA].', *Bulletin du cancer*, 93(1), pp. 27–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455503> (Accessed: 21 October 2016).
- Pelaia, G., Vatrella, A., Cuda, G., Maselli, R. and Marsico, S. A. (2003) 'Molecular mechanisms of corticosteroid actions in chronic inflammatory airway diseases.', *Life sciences*, 72(14), pp. 1549–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12551744> (Accessed: 18 October 2016).
- Peleg, S., Sananbenesi, F., Zovoillis, A., Burkhardt, S., Bahari-Javan, S., Agis-Balboa, R. C., Cota, P., Wittham, J. L., Gogol-Doering, A., Opitz, L., Salinas-Riester, G., Dettenhofer, M., Kang, H., Farinelli, L., Chen, W. and Fischer, A. (2010) 'Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice.', *Science (New York, N.Y.)*, 328(5979), pp. 753–6. doi: 10.1126/science.1186088.
- Penney, J. and Tsai, L.-H. (2014) 'Histone deacetylases in memory and cognition', *Science Signaling*. American Association for the Advancement of Science, 7(355), p. re12-re12. doi: 10.1126/scisignal.aaa0069.
- Petry, F. S., Dornelles, A. S., Lichtenfels, M., Valiati, F. E., de Farias, C. B., Schwartzmann, G., Parent, M. B. and Roesler, R. (2016) 'Histone deacetylase inhibition prevents the impairing effects of hippocampal gastrin-releasing peptide receptor antagonism on memory consolidation and extinction', *Behavioural Brain*

- Research*. Elsevier, 307, pp. 46–53. doi: 10.1016/j.bbr.2016.03.041.
- Pfaffl, M. W. (2001) 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.', *Nucleic acids research*, 29(9), p. e45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886> (Accessed: 1 December 2016).
- Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B. S. and Sanacora, G. (2012) 'The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission.', *Nature reviews. Neuroscience*. Nature Publishing Group, 13(1), pp. 22–37. doi: 10.1038/nrn3138.
- Popp, J., Wolfsgruber, S., Heuser, I., Peters, O., Hüll, M., Schröder, J., Möller, H.-J., Lewczuk, P., Schneider, A., Jahn, H., Luckhaus, C., Perneczky, R., Frölich, L., Wagner, M., Maier, W., Wiltfang, J., Kornhuber, J. and Jessen, F. (2015) 'Cerebrospinal fluid cortisol and clinical disease progression in MCI and dementia of Alzheimer's type.', *Neurobiology of aging*, 36(2), pp. 601–7. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.10.031.
- Rei, D., Mason, X., Seo, J., Gräff, J., Rudenko, A., Wang, J., Rueda, R., Siegert, S., Cho, S., Canter, R. G., Mungenast, A. E., Deisseroth, K. and Tsai, L.-H. (2015) 'Basolateral amygdala bidirectionally modulates stress-induced hippocampal learning and memory deficits through a p25/Cdk5-dependent pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(23), p. 201415845. doi: 10.1073/pnas.1415845112.
- Reolon, G. K., Maurmann, N., Werenicz, A., Garcia, V. A., Schröder, N., Wood, M. A. and Roesler, R. (2011) 'Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats.', *Behavioural brain research*, 221(1), pp. 329–32. doi: 10.1016/j.bbr.2011.03.033.
- Reul, J. M. H. M. (2014) 'Making Memories of Stressful Events: A Journey Along Epigenetic, Gene Transcription, and Signaling Pathways', *Frontiers in Psychiatry*. Frontiers, 5, p. 5. doi: 10.3389/fpsy.2014.00005.
- Reul, J. M. H. M. J., Hesketh, S. S. A., Collins, A. and Mecinas, M. G. (2009) 'Epigenetic mechanisms in the dentate gyrus act as a molecular switch in hippocampus-associated memory formation', *Epigenetics*, 4(7), pp. 434–439. doi: 10.4161/epi.4.7.9806.
- Rezvani, A. H. (2006) 'Involvement of the NMDA System in Learning and Memory', in *Animal Models of Cognitive Impairment*. CRC Press/Taylor & Francis, pp. 1–30. doi: 10.1201/9781420004335.ch4.
- Rodrigues, G. M., Toffoli, L. V., Manfredo, M. H., Francis-Oliveira, J., Silva, A. S., Raquel, H. A., Martins-Pinge, M. C., Moreira, E. G., Fernandes, K. B., Pelosi, G. G. and Gomes, M. V. (2015) 'Acute stress affects the global DNA methylation profile in rat brain: Modulation by physical exercise', *Behavioural Brain Research*, 279, pp. 123–128. doi: 10.1016/j.bbr.2014.11.023.
- Rodrigues, S. M., Schafe, G. E. and LeDoux, J. E. (2004) 'Molecular Mechanisms Underlying Emotional Learning and Memory in the Lateral Amygdala', *Neuron*. Elsevier, 44(1), pp. 75–91. doi: 10.1016/j.neuron.2004.09.014.
- Roesler, R. and Schröder, N. (2011) 'Cognitive enhancers: focus on modulatory signaling influencing memory consolidation.', *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. Elsevier Inc., 99(2), pp. 155–63. doi: 10.1016/j.pbb.2010.12.028.
- Roosendaal, B., Hernandez, A., Cabrera, S. M., Hagewoud, R., Malvaez, M., Stefanko, D. P., Haettig, J. and Wood, M. a (2010) 'Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(14), pp. 5037–5046. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5717-09.2010.
- Rosenberg, T., Gal-Ben-Ari, S., Dieterich, D. C., Kreutz, M. R., Ziv, N. E., Gundelfinger, E. D. and Rosenblum, K. (2014) 'The roles of protein expression in synaptic plasticity and

- memory consolidation.', *Frontiers in molecular neuroscience*, 7, p. 86. doi: 10.3389/fnmol.2014.00086.
- Roth, E. D., Roth, T. L., Money, K. M., SenGupta, S., Eason, D. E. and Sweatt, J. D. (2015) 'DNA methylation regulates neurophysiological spatial representation in memory formation', *Neuroepigenetics*. Elsevier, 2, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.nepig.2015.03.001.
- Rumbaugh, G., Sullivan, S. E., Ozkan, E. D., Rojas, C. S., Hubbs, C. R., Aceti, M., Kilgore, M., Kudugunti, S., Puthanveetil, S. V, Sweatt, J. D., Rusche, J. and Miller, C. A. (2015) 'Pharmacological Selectivity Within Class I Histone Deacetylases Predicts Effects on Synaptic Function and Memory Rescue.', *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 40(10), pp. 2307–16. doi: 10.1038/npp.2015.93.
- Russo, M. F., Ah Loy, S. R., Battle, A. R. and Johnson, L. R. (2016) 'Membrane Associated Synaptic Mineralocorticoid and Glucocorticoid Receptors Are Rapid Regulators of Dendritic Spines.', *Frontiers in cellular neuroscience*. Frontiers Media SA, 10, p. 161. doi: 10.3389/fncel.2016.00161.
- Sailaja, B. S., Cohen-Carmon, D., Zimmerman, G., Soreq, H. and Meshorer, E. (2012) 'Stress-induced epigenetic transcriptional memory of acetylcholinesterase by HDAC4.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(52), pp. E3687-95. doi: 10.1073/pnas.1209990110.
- Salamon, E. (2002) 'Mechanisms of knowledge learning and acquisition.', *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 8(7), p. RA133-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12118212> (Accessed: 23 July 2016).
- Sanderson, L., Taylor, G. W., Aboagye, E. O., Alao, J. P., Latigo, J. R., Coombes, R. C. and Vigushin, D. M. (2004) 'Plasma pharmacokinetics and metabolism of the histone deacetylase inhibitor trichostatin a after intraperitoneal administration to mice', *Drug metabolism and disposition*, 32(10), pp. 1132–1138. doi: 10.1124/dmd.104.000638.The.
- Sandi, C. (2013) 'Stress and cognition', *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, 4(3), pp. 245–261. doi: 10.1002/wcs.1222.
- Sandi, C. and Pinelo-Nava, M. T. (2007) 'Stress and memory: Behavioral effects and neurobiological mechanisms', *Neural Plasticity*, 2007, p. 78970. doi: 10.1155/2007/78970.
- Sandi, C., Woodson, J. C., Haynes, V. F., Park, C. R., Touyarot, K., Lopez-Fernandez, M. A., Venero, C. and Diamond, D. M. (2005) 'Acute stress-induced impairment of spatial memory is associated with decreased expression of neural cell adhesion molecule in the hippocampus and prefrontal cortex', *Biological Psychiatry*. Elsevier, 57(8), pp. 856–864. doi: 10.1016/j.biopsych.2004.12.034.
- Sardari, M., Rezayof, A. and Khodagholi, F. (2015) 'Hippocampal signaling pathways are involved in stress-induced impairment of memory formation in rats.', *Brain research*, 1625, pp. 54–63. doi: 10.1016/j.brainres.2015.08.015.
- Schaaf, M. J. M. and Cidlowski, J. A. (2002) 'Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance.', *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 83(1–5), pp. 37–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12650700> (Accessed: 18 October 2016).
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. and Cardona, A. (2012) 'Fiji: an open-source

- platform for biological-image analysis', *Nature Methods*, 9(7), pp. 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019.
- Schneiderman, N., Ironson, G. and Siegel, S. D. (2005) 'Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants.', *Annual review of clinical psychology*. NIH Public Access, 1, pp. 607–28. doi: 10.1146/annurev.clinpsy.1.102803.144141.
- Schroeder, F. A., Lin, C. L., Crusio, W. E. and Akbarian, S. (2007) 'Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse.', *Biological psychiatry*, 62(1), pp. 55–64. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.06.036.
- Schwabe, L., Joëls, M., Roozendaal, B., Wolf, O. T. and Oitzl, M. S. (2012) 'Stress effects on memory: An update and integration', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Elsevier Ltd, 36(7), pp. 1740–1749. doi: 10.1016/j.neubiorev.2011.07.002.
- Selenica, M.-L., Benner, L., Housley, S. B., Manchec, B., Lee, D. C., Nash, K. R., Kalin, J., Bergman, J. A., Kozikowski, A., Gordon, M. N. and Morgan, D. (2014) 'Histone deacetylase 6 inhibition improves memory and reduces total tau levels in a mouse model of tau deposition.', *Alzheimer's research & therapy*. BioMed Central, 6(1), p. 12. doi: 10.1186/alzrt241.
- Selye, H. (1998) 'A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents', *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. American Psychiatric Publishing, 10(2), p. 230a–231. doi: 10.1176/jnp.10.2.230a.
- Sharma, S., Taliyan, R. and Ramagiri, S. (2015) 'Histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, improves learning and memory in high-fat diet-induced cognitive deficits in mice.', *Journal of molecular neuroscience : MN*, 56(1), pp. 1–11. doi: 10.1007/s12031-014-0461-x.
- Sheppard, K. A., Phelps, K. M., Williams, A. J., Thanos, D., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., Gerritsen, M. E. and Collins, T. (1998) 'Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1.', *The Journal of biological chemistry*, 273(45), pp. 29291–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792627> (Accessed: 18 October 2016).
- Shields, G. S., Sazma, M. A., McCullough, A. M. and Yonelinas, A. P. (2017) 'The effects of acute stress on episodic memory: A meta-analysis and integrative review.', *Psychological Bulletin*, 143(6), pp. 636–675. doi: 10.1037/bul0000100.
- Shirazi, S. N., Friedman, A. R., Kaufer, D. and Sakhai, S. A. (2015) 'Glucocorticoids and the Brain: Neural Mechanisms Regulating the Stress Response.', *Advances in experimental medicine and biology*, 872, pp. 235–52. doi: 10.1007/978-1-4939-2895-8\_10.
- Smith, S. M. and Vale, W. W. (2006) 'The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress.', *Dialogues in clinical neuroscience*. Les Laboratoires Servier, 8(4), pp. 383–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17290797> (Accessed: 6 October 2016).
- Squire, L. R. (2004) 'Memory systems of the brain: A brief history and current perspective', *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(3), pp. 171–177. doi: 10.1016/j.nlm.2004.06.005.
- Stankiewicz, A. M., Swiergiel, A. H. and Lisowski, P. (2013) 'Epigenetics of stress adaptations in the brain', *Brain Research Bulletin*. Elsevier Inc., 98, pp. 76–92. doi: 10.1016/j.brainresbull.2013.07.003.
- Steckert, A. V., Comim, C. M., Igna, D. M. D., Dominguni, D., Mendonça, B. P., Ornell, F., Colpo, G. D., Gubert, C., Kapczinski, F., Barichello, T., Quevedo, J. and Dal-Pizzol, F. (2015) 'Effects of sodium butyrate on aversive memory in rats submitted to sepsis.'

- Neuroscience letters*, 595, pp. 134–8. doi: 10.1016/j.neulet.2015.04.019.
- Stefanko, D. P., Barrett, R. M., Ly, A. R., Reolon, G. K. and Wood, M. A. (2009) 'Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(23), pp. 9447–52. doi: 10.1073/pnas.0903964106.
- Sterner, D. E. and Berger, S. L. (2000) 'Acetylation of histones and transcription-related factors.', *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. American Society for Microbiology (ASM), 64(2), pp. 435–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10839822> (Accessed: 29 July 2016).
- Sultan, F. A. and Day, J. J. (2011) 'Epigenetic mechanisms in memory and synaptic function', *Epigenomics*. NIH Public Access, 3(2), pp. 157–181. doi: 10.2217/epi.11.6.
- Sumida, K., Igarashi, Y., Toritsuka, N., Matsushita, T., Abe-Tomizawa, K., Aoki, M., Urushidani, T., Yamada, H. and Ohno, Y. (2011) 'Effects of DMSO on gene expression in human and rat hepatocytes', *Human & Experimental Toxicology*, 30(10), pp. 1701–1709. doi: 10.1177/0960327111399325.
- Sweatt, J. D. (2010) *Mechanisms of memory*. Academic.
- Tonegawa, S., Pignatelli, M., Roy, D. S. and Ryan, T. J. (2015) 'Memory engram storage and retrieval', *Current Opinion in Neurobiology*, 35, pp. 101–109. doi: 10.1016/j.conb.2015.07.009.
- Tran, L., Chaloner, A., Sawalha, a. H. and Greenwood Van-Meerveld, B. (2013) 'Importance of epigenetic mechanisms in visceral pain induced by chronic water avoidance stress.', *Psychoneuroendocrinology*. Elsevier Ltd, 38(6), pp. 898–906. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.09.016.
- Tran, L., Schulkin, J., Ligon, C. O. and Greenwood-Van Meerveld, B. (2014) 'Epigenetic modulation of chronic anxiety and pain by histone deacetylation.', *Molecular psychiatry*. Nature Publishing Group, 20(August), pp. 1–13. doi: 10.1038/mp.2014.122.
- Tresguerres, J. A., Ariznavarreta Ruiz, C. and Alfaro González, V. (2010) *Fisiología humana*. McGraw-Hill-Interamericana.
- Troncoso, J., Lamprea, M., Cuestas, D. and Múnera, 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), pp. 207–222. Available at: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/9692> (Accessed: 26 November 2016).
- Turrigiano, G. (2012) 'Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function.', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4(1), p. a005736. doi: 10.1101/cshperspect.a005736.
- Tyrka, A. R., Price, L. H., Marsit, C., Walters, O. C. and Carpenter, L. L. (2012) 'Childhood adversity and epigenetic modulation of the leukocyte glucocorticoid receptor: preliminary findings in healthy adults.', *PLoS one*, 7(1), p. e30148. doi: 10.1371/journal.pone.0030148.
- Uchida, S., Nishida, A., Hara, K., Kamemoto, T., Suetsugi, M., Fujimoto, M., Watanuki, T., Wakabayashi, Y., Otsuki, K., McEwen, B. S. and Watanabe, Y. (2008) 'Characterization of the vulnerability to repeated stress in Fischer 344 rats: possible involvement of microRNA-mediated down-regulation of the glucocorticoid receptor.', *The European journal of neuroscience*, 27(9), pp. 2250–61. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06218.x.
- Ureña, G. (2016) *Efectos del estrés agudo en la consolidación de la memoria espacial y la acetilación de la histona 3 en el cerebro*. *Efectos del estrés agudo en la consolidación de la memoria espacial y la acetilación de la histona 3 en el cerebro*. Universidad Nacional de Colombia.

- Vandevyver, S., Dejager, L. and Libert, C. (2014) 'Comprehensive overview of the structure and regulation of the glucocorticoid receptor.', *Endocrine reviews*, 35(4), pp. 671–93. doi: 10.1210/er.9014-1010.
- Vanelzakker, M. B., Zoladz, P. R., Thompson, V. M., Park, C. R., Halonen, J. D., Spencer, R. L. and Diamond, D. M. (2011) 'Influence of Pre-Training Predator Stress on the Expression of c-fos mRNA in the Hippocampus, Amygdala, and Striatum Following Long-Term Spatial Memory Retrieval.', *Frontiers in behavioral neuroscience*, 5(June), p. 30. doi: 10.3389/fnbeh.2011.00030.
- Vargas-López, V., Lamprea, M. R. and Múnera, A. (2011) 'Characterizing spatial extinction in an abbreviated version of the Barnes maze', *Behavioural Processes*. Elsevier, 86(1), pp. 30–38. doi: 10.1016/j.beproc.2010.08.002.
- Vargas-López, V., Lamprea, M. R. and Múnera, A. (2016) 'Histone deacetylase inhibition abolishes stress-induced spatial memory impairment', *Neurobiology of Learning and Memory*. Academic Press Inc., 134, pp. 328–338. doi: 10.1016/j.nlm.2016.08.009.
- Vecsey, C. G., Hawk, J. D., Lattal, K. M., Stein, J. M., Fabian, S. a, Attner, M. a, Cabrera, S. M., McDonough, C. B., Brindle, P. K., Abel, T. and Wood, M. a (2007) 'Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 27(23), pp. 6128–6140. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0296-07.2007.
- Ververis, K. and Karagiannis, T. C. (2012) 'Overview of the Classical Histone Deacetylase Enzymes and Histone Deacetylase Inhibitors', *ISRN Cell Biology*, 2012(Figure 1), pp. 1–12. doi: 10.5402/2012/130360.
- Villain, H., Florian, C. and Roullet, P. (2016) 'HDAC inhibition promotes both initial consolidation and reconsolidation of spatial memory in mice.', *Scientific reports*, 6, p. 27015. doi: 10.1038/srep27015.
- Volmar, C.-H. and Wahlestedt, C. (2015) 'Histone deacetylases (HDACs) and brain function', *Neuroepigenetics*. The Authors, 1, pp. 20–27. doi: 10.1016/j.nepig.2014.10.002.
- Vreugdenhil, E., Verissimo, C. S. L., Mariman, R., Kamphorst, J. T., Barbosa, J. S., Zweers, T., Champagne, D. L., Schouten, T., Meijer, O. C., de Kloet, E. R. and Fitzsimons, C. P. (2009) 'MicroRNA 18 and 124a down-regulate the glucocorticoid receptor: implications for glucocorticoid responsiveness in the brain.', *Endocrinology*, 150(5), pp. 2220–8. doi: 10.1210/en.2008-1335.
- Vukojevic, V., Kolassa, I.-T., Fastenrath, M., Gschwind, L., Spalek, K., Milnik, A., Heck, A., Vogler, C., Wilker, S., Demougin, P., Peter, F., Atucha, E., Stetak, A., Roozendaal, B., Elbert, T., Papassotiropoulos, A. and de Quervain, D. J.-F. (2014) 'Epigenetic Modification of the Glucocorticoid Receptor Gene Is Linked to Traumatic Memory and Post-Traumatic Stress Disorder Risk in Genocide Survivors', *Journal of Neuroscience*, 34(31), pp. 10274–10284. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1526-14.2014.
- Wagner, F. F., Zhang, Y.-L., Fass, D. M., Joseph, N., Gale, J. P., Weïwer, M., McCarren, P., Fisher, S. L., Kaya, T., Zhao, W.-N., Reis, S. A., Hennig, K. M., Thomas, M., Lemercier, B. C., Lewis, M. C., Guan, J. S., Moyer, M. P., Scolnick, E., Haggarty, S. J., Tsai, L.-H. and Holson, E. B. (2015) 'Kinetically Selective Inhibitors of Histone Deacetylase 2 (HDAC2) as Cognition Enhancers.', *Chemical science (Royal Society of Chemistry : 2010)*. NIH Public Access, 6(1), pp. 804–815. doi: 10.1039/C4SC02130D.
- Walters, B. J. J. and Zovkic, I. B. B. (2015) 'Building up and knocking down: An emerging role for epigenetics and proteasomal degradation in systems consolidation', *Neuroscience*. IBRO, 300, pp. 39–52. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.05.005.

- Wang, S. E., Ko, S. Y., Jo, S., Choi, M., Lee, S. H., Jo, H. R., Seo, J. Y., Lee, S. H., Kim, Y. S., Jung, S. J. and Son, H. (2017) 'TRPV1 Regulates Stress Responses through HDAC2', *Cell Reports*. Elsevier, 19(2), pp. 401–412. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.050.
- Wapenaar, H. and Dekker, F. J. (2016) 'Histone acetyltransferases: challenges in targeting bi-substrate enzymes.', *Clinical epigenetics*, 8, p. 59. doi: 10.1186/s13148-016-0225-2.
- Waterborg, J. H. and Kapros, T. (2002) 'Kinetic analysis of histone acetylation turnover and Trichostatin A induced hyper- and hypoacetylation in alfalfa.', *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 80(3), pp. 279–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12123281> (Accessed: 6 October 2015).
- Weaver, I. C. G. (2007) 'Epigenetic programming by maternal behavior and pharmacological intervention. Nature versus nurture: let's call the whole thing off.', *Epigenetics*, 2(1), pp. 22–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965624> (Accessed: 17 October 2016).
- Weaver, I. C. G., Cervoni, N., Champagne, F. a, D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., Dymov, S., Szyf, M. and Meaney, M. J. (2004) 'Epigenetic programming by maternal behavior.', *Nature neuroscience*, 7(8), pp. 847–54. doi: 10.1038/nn1276.
- Weaver, I. C. G., Meaney, M. J. and Szyf, M. (2006) 'Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(9), pp. 3480–5. doi: 10.1073/pnas.0507526103.
- West, A. E., Griffith, E. C. and Greenberg, M. E. (2002) 'Regulation of transcription factors by neuronal activity.', *Nature reviews. Neuroscience*, 3(12), pp. 921–31. doi: 10.1038/nrn987.
- White, A. O. and Wood, M. a. (2014) 'Does stress remove the HDAC brakes for the formation and persistence of long-term memory?', *Neurobiology of Learning and Memory*, 112, pp. 61–67. doi: 10.1016/j.nlm.2013.10.007.
- Whittle, N. and Singewald, N. (2014) 'HDAC inhibitors as cognitive enhancers in fear, anxiety and trauma therapy: where do we stand?', *Biochemical Society Transactions*. Portland Press Limited, 42(2), pp. 569–581. doi: 10.1042/BST20130233.
- Wiegert, O., Joëls, M. and Krugers, H. (2006) *Timing is essential for rapid effects of corticosterone on synaptic potentiation in the mouse hippocampus.*, *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi: 10.1101/lm.87706.
- Wiley, J. W., Higgins, G. A. and Athey, B. D. (2016) 'Stress and glucocorticoid receptor transcriptional programming in time and space: Implications for the brain-gut axis.', *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. NIH Public Access, 28(1), pp. 12–25. doi: 10.1111/nmo.12706.
- Yang, Y., Yamada, T., Hill, K. K., Hemberg, M., Reddy, N. C., Cho, H. Y., Guthrie, A. N., Oldenborg, A., Heiney, S. A., Ohmae, S., Medina, J. F., Holy, T. E. and Bonni, A. (2016) 'Chromatin remodeling inactivates activity genes and regulates neural coding', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 353(6296), pp. 300–306. doi: 10.1126/science.aad4225.
- Yao, Z., DuBois, D. C., Almon, R. R. and Jusko, W. J. (2006) 'Modeling Circadian Rhythms of Glucocorticoid Receptor and Glutamine Synthetase Expression in Rat Skeletal Muscle', *Pharmaceutical Research*, 23(4), pp. 670–679. doi: 10.1007/s11095-005-9608-3.
- Yeh, S.-H., Lin, C.-H. and Gean, P.-W. (2004) 'Acetylation of nuclear factor-kappaB in rat

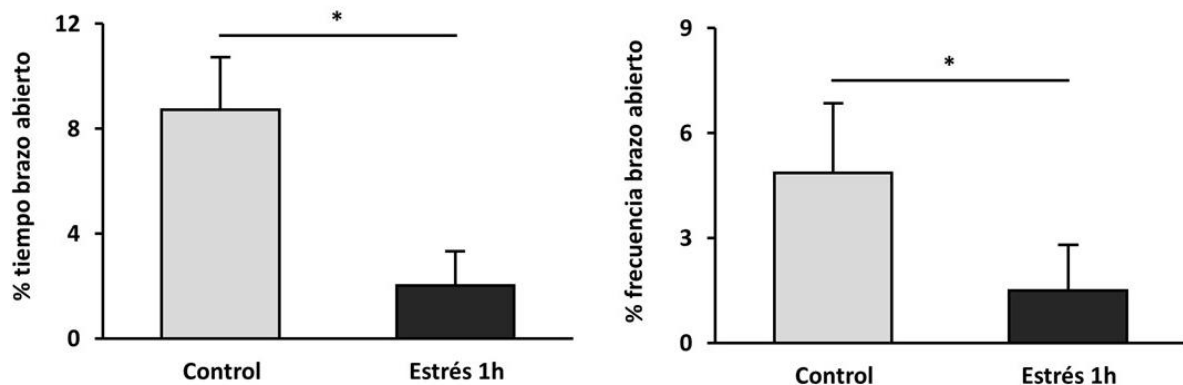


- amygdala improves long-term but not short-term retention of fear memory.’, *Molecular pharmacology*, 65(5), pp. 1286–92. doi: 10.1124/mol.65.5.1286.
- Yoo, D. Y., Kim, D. W., Kim, M. J., Choi, J. H., Jung, H. Y., Nam, S. M., Kim, J. W., Yoon, Y. S., Choi, S. Y. and Hwang, I. K. (2015) ‘Sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates SIRT2-induced memory impairment, reduction of cell proliferation, and neuroblast differentiation in the dentate gyrus’, *Neurological Research*, 37(1), pp. 69–76. doi: 10.1179/1743132814Y.0000000416.
- Yu, N.-K. and Kaang, B.-K. (2016) ‘Gene repressive mechanisms in the mouse brain involved in memory formation.’, *BMB reports*, 49(4), pp. 199–200. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26949020> (Accessed: 1 August 2016).
- Zhang, Z.-Y. and Schluesener, H. J. (2013) ‘Oral administration of histone deacetylase inhibitor MS-275 ameliorates neuroinflammation and cerebral amyloidosis and improves behavior in a mouse model.’, *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 72(3), pp. 178–85. doi: 10.1097/NEN.0b013e318283114a.
- Zhao, Z., Fan, L. and Frick, K. M. (2010) ‘Epigenetic alterations regulate estradiol-induced enhancement of memory consolidation’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 107(12), pp. 5605–5610. doi: 10.1073/pnas.0910578107.
- Zhong, T., Qing, Q. J., Yang, Y., Zou, W. Y., Ye, Z., Yan, J. Q. and Guo, Q. L. (2014) ‘Repression of contextual fear memory induced by isoflurane is accompanied by reduction in histone acetylation and rescued by sodium butyrate.’, *British journal of anaesthesia*, 113(4), pp. 634–43. doi: 10.1093/bja/aeu184.
- Zhu, J., Zhao, N., Chen, Y., Zhu, L., Zhong, Q., Liu, J. and Chen, T. (2016) ‘Sodium butyrate modulates a methamphetamine-induced conditioned place preference.’, *Journal of neuroscience research*. doi: 10.1002/jnr.23835.
- Zoladz, P. R., Park, C. R., Halonen, J. D., Salim, S., Alzoubi, K. H., Srivareerat, M., Fleshner, M., Alkadhi, K. a. and Diamond, D. M. (2012) ‘Differential expression of molecular markers of synaptic plasticity in the hippocampus, prefrontal cortex, and amygdala in response to spatial learning, predator exposure, and stress-induced amnesia’, *Hippocampus*, 22(3), pp. 577–589. doi: 10.1002/hipo.20922.

## **ANEXOS**

## ANEXO A: Efectos Demorados de la Restricción de Movimientos Sobre la Conducta Defensiva y los Niveles de Corticosterona

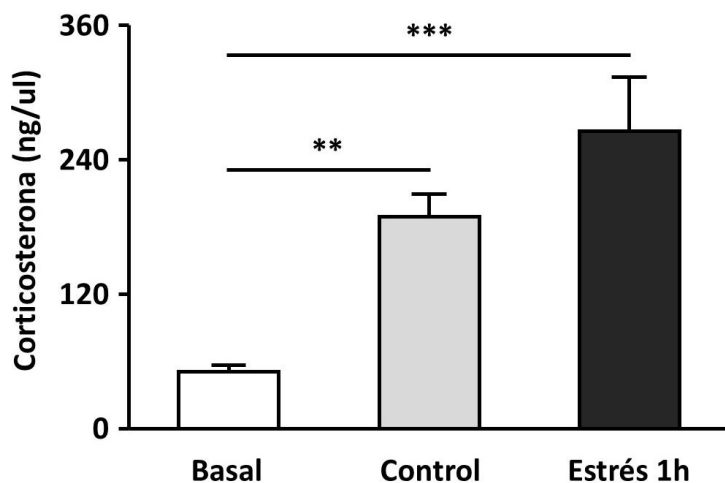
Se realizó un experimento piloto para determinar los efectos tardíos (24 horas post-inducción) del estrés agudo por 1 hora de restricción de movimientos sobre la conducta defensiva evaluada en el laberinto en cruz elevado (LCE, Figura A1). Para esto se comparó la frecuencia de entradas al brazo abierto y el tiempo que permanecieron los animales en él, dependiendo de si habían sido previamente estresados (Estrés-1h,  $n = 5$ ), o no (Control,  $n = 6$ ) usando pruebas *t-student*. Se encontró que el estrés agudo redujo a largo plazo el número de entradas al brazo abierto del LCE ( $t_{(9)} = 2.301$ ,  $p = 0.047$ ), y los animales también permanecieron menos tiempo en él durante los 5 minutos de duración de la prueba ( $t_{(9)} = 2.658$ ,  $p = 0.026$ ). Estos resultados indican que el estrés agudo incrementa a largo plazo la conducta defensiva.



**Figura A1. El estrés agudo induce a largo plazo incrementos en la conducta defensiva.** Porcentaje de tiempo y frecuencia de exploración del brazo abierto del LCE. Abreviaturas: \*, diferencia significativa entre grupos.

Se analizó, además, el efecto a largo plazo del estrés agudo sobre los niveles de corticosterona en plasma inmediatamente después de la exposición al LCE. Como línea de base se usó un grupo de animales que no fueron estresados, ni se expusieron al LCE (Basal,  $n = 6$ ). Se encontró que la exposición al laberinto y el estrés alteraron los niveles de corticosterona en plasma (Figura A2; ANOVA 1 vía;  $F_{(2, 15)} = 12.460$ ,  $p < 0,001$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que la exposición al laberinto en animales no estresados (Control vs Basal:  $t = 3.089$ ,  $p = 0.008$ ), o estresados (Estrés-1h vs Basal:  $t = 4.957$ ,  $p < 0.001$ ) indujo incrementos en los niveles de corticosterona

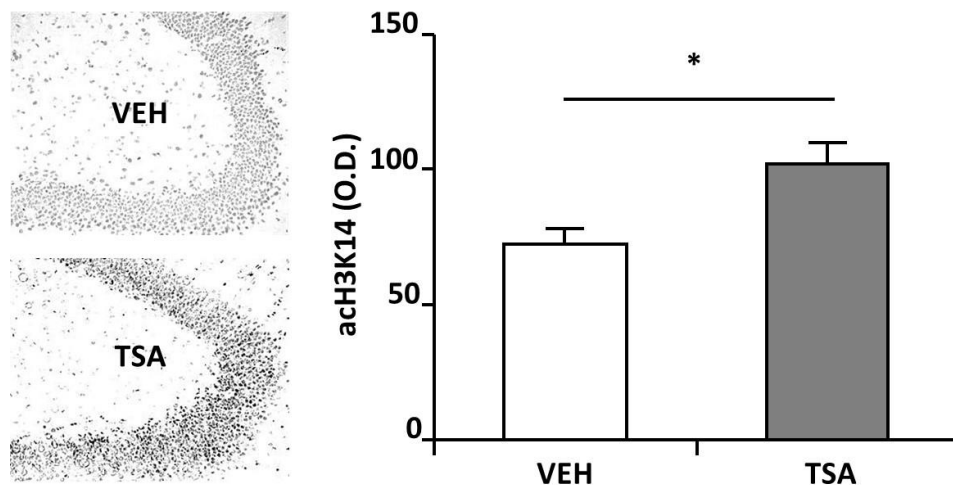
en plasma; incremento que fueron mayor en los animales estresados, pero sin superar el nivel de significancia (Estrés-1h vs Control:  $t = 2.089$ ,  $p = 0.057$ ).



**Figura A2.** La exposición al LCE induce incrementos en los niveles de corticosterona en plasma, especialmente en los animales estresados 24 horas antes. Abreviaturas: \*, diferencia significativa entre grupos.

## ANEXO B: Hiperacetilación a Corto Plazo Inducida por la Inhibición de las HDACs con TSA

Se realizó un experimento piloto para verificar que la inhibición sistémica de las HDACs de tipo I y II indujera a corto plazo (30 minutos) la hiperacetilación de la histona H3 en el cerebro de las ratas (Figura B1). Para esto se inyectó intraperitonealmente una dosis de 1mg/kg de TSA (n = 3) una hora antes de la toma de las muestras. Los resultados de los niveles de acetilación en la fascia dentada de animales inyectados con TSA se compararon con una prueba *t-student* con los niveles en animales inyectados con vehículo (18% DMSO, n = 3). Se encontró que la TSA incrementó de manera significativa los niveles de acetilación de la lisina 14 de la histona H3 ( $t_{(4)} = 2.939$ ,  $p = 0.042$ ).



**Figura B1. La inhibición sistémica de las HDACs con TSA incrementa los niveles de acetilación de la histona H3 en el hipocampo.** Microfotografías representativas del giro dentado (izquierda); unidades relativas de densidad óptica (derecha). Abreviaturas: \*, diferencia significativa entre grupos.

### ANEXO C: Efectos Tardíos de la Inyección Intraperitoneal de DMSO

Se evaluó la posibilidad de que la inyección de DMSO 18%, utilizado como vehículo en los experimentos, pudiera tener efectos intrínsecos a largo plazo (24 horas post-administración). Para esto se compararon los niveles de corticosterona y de acetilación de histonas, así como la expresión de GR, HDAC2, *Nr3c1*, *Hdac2*, *Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b* en animales inyectados con DMSO 18% (DMSO; n = 4) con animales que no recibieron ningún tratamiento (Basal; n = 4). Los análisis con pruebas *t-student* (Tabla C1) mostraron que la inyección de DMSO tuvo efectos pequeños, pero significativos sobre los niveles plasmáticos de corticosterona y la acetilación de la histona H3 en el giro dentado del hipocampo y en la amígdala basolateral.

Técnica	Variable	Tejido	t	p
ELISA	Corticosterona	Plasma	-2,596	0,041*
Inmunofluorescencia	GR	Corteza Prelímbica	0,344	0,742
		Hipocampo (DG)	0,612	0,563
		Hipocampo (CA1)	-1,316	0,236
		Amígdala (BLA)	-1,995	0,093
	HDAC2	Corteza Prelímbica	1,739	0,133
		Hipocampo (DG)	-0,517	0,623
		Hipocampo (CA1)	-0,216	0,836
		Amígdala (BLA)	-2,135	0,077
Inmunohistoquímica	acH3K14	Corteza Prelímbica	0,852	0,427
		<b>Hipocampo (DG)</b>	<b>2,487</b>	<b>0,047*</b>
		Hipocampo (CA1)	0,987	0,362
		<b>Amígdala (BLA)</b>	<b>2,656</b>	<b>0,038*</b>
qRT-PCR	<i>Nr3c1</i>	Corteza	-0,310	0,764
		Hipocampo	-0,0426	0,967
		Amígdala	-1,101	0,303
	<i>Hdac2</i>	Corteza	-0,121	0,907
		Hipocampo	-0,0557	0,957
		Amígdala	-0,667	0,524
	<i>Grin1</i>	Corteza	-0,685	0,513
		Hipocampo	-0,243	0,815
		Amígdala	-1,041	0,328
	<i>Grin2a</i>	Corteza	0,851	0,420
		Hipocampo	0,607	0,561
		Amígdala	-1,200	0,264
	<i>Grin2b</i>	Corteza	-0,778	0,459
		Hipocampo	-0,345	0,739
		Amígdala	-0,955	0,368
	<i>Gabra1</i>	Corteza	-0,771	0,463
		Hipocampo	-1,064	0,318
		Amígdala	0,301	0,771
	<i>Gabra2</i>	Corteza	0,121	0,907
		Hipocampo	-0,125	0,904
		Amígdala	0,358	0,730

**Tabla C1. La inyección i.p. de DMSO tiene escasos efectos a largo plazo.** Abreviaturas: \*, diferencias significativas entre grupos.

## **ANEXO D: Efectos de la Administración Intraperitoneal de DMSO o Solución Salina sobre la consolidación de la memoria espacial**

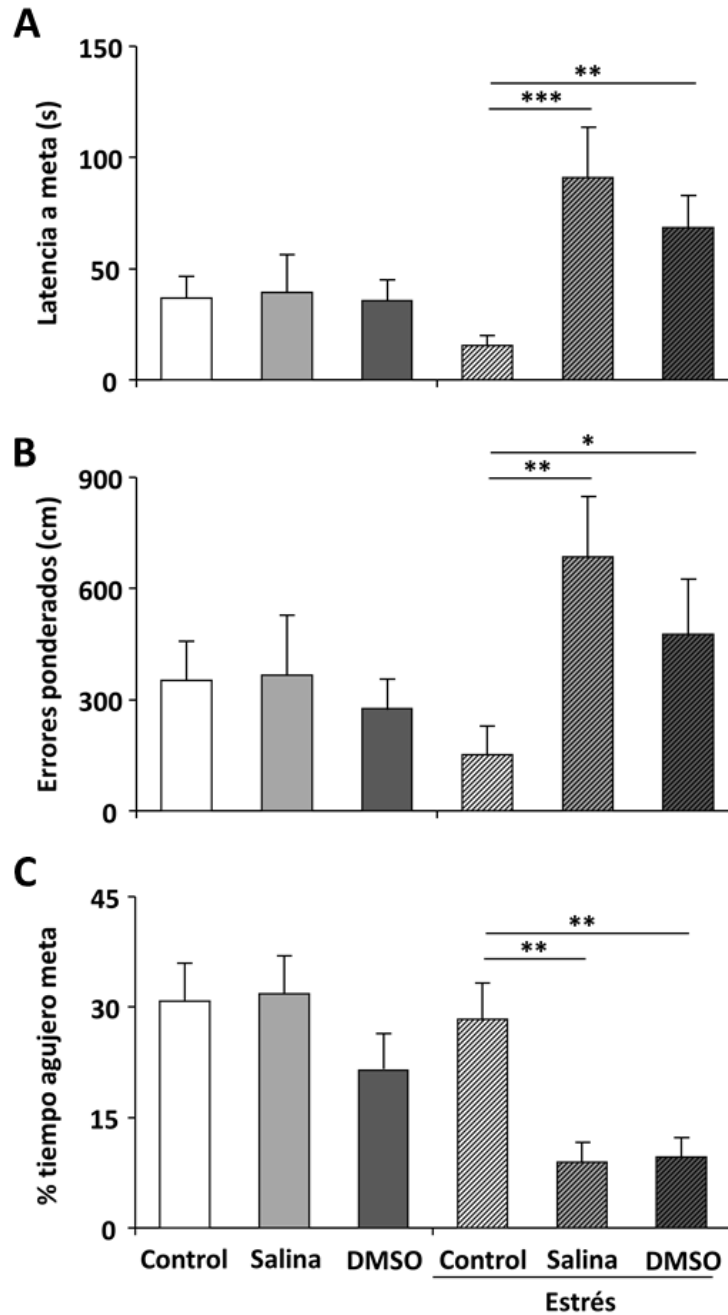
Se determinó el efecto de la administración de una inyección de vehículo (DMSO o solución salina) sobre la consolidación de la memoria espacial en animales tanto estresados como no estresados (Figura D). Para esto se usó una prueba ANOVA de una vía comparando la latencia al agujero meta, el número de errores ponderados y el porcentaje de tiempo de exploración del agujero meta durante la prueba en: 1) animales entrenados en la tarea espacial pero que no recibieron inyección después del entrenamiento ( $n = 10$ ), 2) animales inyectados con solución salina al 0,9% ( $n = 6$ ), 3) animales inyectados con DMSO al 18% en solución salina ( $n = 9$ ), 4) animales sometidos a estrés antes del entrenamiento sin inyección ( $n = 9$ ), 5) 4) animales sometidos a estrés antes del entrenamiento que recibieron solución salina ( $n = 6$ ) y 6) animales estresados y entrenados inyectados con DMSO al 18% ( $n = 9$ ).

Se encontró que los tratamientos experimentales alteraron la latencia al agujero meta en la prueba (Figura D1-A;  $F_{(5, 48)} = 4.447$ ,  $p = 0,002$ ). Los análisis *post-hoc* mostraron que la inyección de solución salina incrementó la latencia al agujero meta en animales estresados ( $t = 4.103$ ,  $p < 0.001$ ), pero no en animales no estresados ( $t = 0.147$ ,  $p = 0.883$ ). De manera semejante, la inyección de DMSO incrementó la latencia en animales estresados ( $t = 3.288$ ,  $p = 0.002$ ), pero no en animales sin estrés ( $t = 0.072$ ,  $p = 0.943$ ). No se encontraron diferencias significativas entre animales estresados tratados con solución salina o DMSO ( $t = 1.153$ ,  $p = 0.255$ ).

El número de errores ponderados también fue alterado por los tratamientos experimentales (Figura D1-B;  $F_{(5, 48)} = 2.597$ ,  $p = 0,049$ ). Específicamente se encontró que la inyección de solución salina incrementó el número de errores en animales estresados ( $t = 3.058$ ,  $p = 0.003$ ), pero no en animales no estresados ( $t = 0.058$ ,  $p = 0.954$ ). De manera semejante, la inyección de DMSO incrementó los errores en animales estresados ( $t = 2.076$ ,  $p = 0.043$ ), pero no en animales sin estrés ( $t = 0.485$ ,  $p = 0.630$ ). No se encontraron diferencias significativas entre animales estresados tratados con solución salina o DMSO ( $t = 1.186$ ,  $p = 0.242$ ).

El porcentaje de tiempo de exploración del agujero también se alteró por los tratamientos experimentales (Figura D1-C;  $F_{(5, 48)} = 5.063$ ,  $p < 0,001$ ). Específicamente se encontró que la inyección de solución salina redujo el porcentaje de exploración del agujero meta en animales estresados ( $t = 2.981$ ,  $p = 0.004$ ), pero no en animales no

estresados ( $t = 0.158$ ,  $p = 0.875$ ). De manera semejante, la inyección de DMSO redujo la exploración del agujero meta en animales estresados ( $t = 3.248$ ,  $p = 0.002$ ), pero no en animales sin estrés ( $t = 1.564$ ,  $p = 0.125$ ). No se encontraron diferencias significativas entre animales estresados tratados con solución salina o DMSO ( $t = 0.089$ ,  $p = 0.929$ ).



**Figura D1. La inyección i.p. de solución salina o DMSO empeoró la consolidación de la memoria espacial en animales estresados antes del entrenamiento. A) Latencia a meta. B) Errores ponderados. C) % tiempo al agujero meta. Abreviaturas: \*, diferencia significativa entre grupos.**



## **ANEXO E: Efectos Globales de la Inhibición de las HDACs, el Estrés Agudo y el Entrenamiento Espacial**

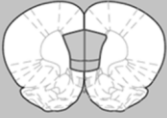
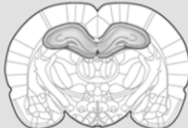

Para determinar el efecto global del estrés agudo, en entrenamiento espacial y la inhibición de las HDACs, al considerar los ocho grupos experimentales incluidos en la investigación, se realizaron pruebas ANOVA de 3 vías. Este análisis permitió identificar el efecto de cada tratamiento como factor, así como los efectos de sus interacciones. En la tabla E1 se presentan los resultados del análisis de varianza.

Se encontró que el **entrenamiento espacial**: 1) indujo incrementos en los niveles de corticosterona en plasma después de la prueba de memoria, 2) redujo la acetilación de histonas en la corteza prelímbica, el hipocampo y la amígdala, 3) incrementó la expresión de GR en la corteza prelímbica, pero la redujo en la amígdala basolateral, 4) redujo la expresión de *Nr3c1* en la corteza prefrontal y el hipocampo, 5) redujo la expresión de HDAC2 en el hipocampo y la amígdala basolateral, 6) redujo la expresión de *Hdac2* en la corteza prefrontal, pero la incrementa en el hipocampo, 7) redujo la expresión de *Grin1* y *Grin2b* en la corteza prefrontal y de *Grin1* y *Grin2a* en el hipocampo.

Por su parte el **estrés agudo**: 1) incrementó la acetilación de histonas en la amígdala, 2) redujo la expresión de GR en la corteza prelímbica, pero la incrementó en la fascia dentada del hipocampo y en la amígdala basolateral, 3) redujo la expresión de *Nr3c1* en el hipocampo y la amígdala, 4) redujo la expresión de HDAC2 en la corteza prelímbica, pero la aumenta en la fascia dentada del hipocampo, 5) redujo la expresión de *Grin1* en la corteza prefrontal, y *Grin1*, *Grin2a* y *Grin2b* en el hipocampo y la amígdala.

Finalmente, la **inhibición de las HDACs**: 1) redujo la acetilación de histonas en la corteza prelímbica y la amígdala, 2) redujo la expresión de GR en el hipocampo, 3) redujo la expresión de HDAC2 en el hipocampo y la amígdala basolateral, 4) incrementó la expresión de *Hdac2* en el hipocampo, 5) incrementó la expresión de *Grin2a* en la corteza prefrontal.

Una representación gráfica de los efectos globales de cada uno de los factores incluidos en el diseño experimental (Estrés, Entrenamiento Espacial, Tratamiento farmacológico) se representan en la figura E1.

	ESTRÉS		ENTRENAMIENTO		TSA
<b>Corteza prefrontal</b> 	GR↓	HDAC2↓	acH3↓	<i>Hdac2</i> <sub>mRNA</sub> ↓	acH3↓
	GR <sub>mRNA</sub> ↓		GR↑	GR <sub>mRNA</sub> ↓	<i>Grin2b</i> ↓
<b>Hipocampo</b> 	GR↑	HDAC2↑	acH3↓	HDAC2↓	HDAC2↓
	GR <sub>mRNA</sub> ↓	<i>Grin2b</i> ↓	GR <sub>mRNA</sub> ↓	<i>Hdac2</i> <sub>mRNA</sub> ↑	<i>Hdac2</i> <sub>mRNA</sub> ↑
<b>Amígdala</b> 	GR↑	acH3↑	acH3↓	HDAC2↓	acH3↓
	GR <sub>mRNA</sub> ↓	<i>Grin2b</i> ↓	GR↓		HDAC2↓

**Figura D1. Efectos globales de los Factores Estrés, Entrenamiento espacial y Tratamiento farmacológico.**

La **interacción entrenamiento y estrés** indujo cambios en: 1) la acetilación de histonas en la corteza prelímbica y la amígdala basolateral, 2) la expresión de *Nr3c1* en la corteza prefrontal y la amígdala, 3) la expresión de *Hdac2* en la corteza prefrontal y el hipocampo, 4) la expresión de *Grin1* y *Grin2b* en la corteza prefrontal y la amígdala, y 4) la expresión de *Grin2a* en la amígdala.

La **interacción entrenamiento e inhibición de las HDACs** indujo cambios en: 1) la acetilación de la histona H3 en la corteza y el hipocampo, 2) la expresión de HDAC2 en la corteza prelímbica y el hipocampo y la amígdala.

La **interacción estrés e inhibición de las HDACs** provocó cambios en: 1) los niveles de corticosterona en plasma, 2) la acetilación de histonas en la corteza prelímbica, la región CA1 del hipocampo y la amígdala basolateral, 3) la expresión de GR en la corteza prelímbica y el hipocampo, 4) la expresión de *Nr3c1* en el hipocampo, 4) la expresión de HDAC2 en la corteza prelímbica la fascia dentada del hipocampo y la amígdala basolateral, y 5) la expresión de *Grin2a* en el hipocampo.

Además, la **interacción entrenamiento, estrés e inhibición de las HDACs** alteró: 1) los niveles de corticosterona en plasma, 2) la acetilación de histonas en la corteza prelímbica, el hipocampo y la amígdala, 3) la expresión de GR en la corteza prelímbica, 4) la expresión de HDAC2 en la corteza prelímbica, la región CA1 del hipocampo y la amígdala basolateral, y 5) la expresión de *Nr3c1* y *Grin2b* en la corteza prefrontal.

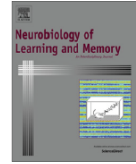
Tabla E1. ANOVA de tres vías para cada factor y sus interacciones.

Tejido	Variable	Entrenamiento		Fármaco		Entrenamiento x Estrés		Entrenamiento x Fármaco		Fármaco x Estrés		Entrenamiento x Fármaco x Estrés	
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Sangre	Plasma	242,984	<0,001	0,665	0,427	1,584	0,226	7,642	0,014	5,025	0,04	13,85	0,002
Corteza	Prelimbica	24,799	<0,001	3,158	0,088	2,327	0,14	0,549	0,466	31,919	<0,001	6,45	0,018
	Receptor GR												
	HDAC2	2,353	0,138	2,397	0,135	3,168	0,088	9,235	0,006	11,839	0,002	2,597	0,121
	acH3K14	42,436	<0,001	6,376	0,019	13,567	0,001	17,179	<0,001	16,807	<0,001	20,01	<0,001
	Nr3C1	34,84	<0,001	0,0014	0,971	9,948	0,004	0,635	0,433	0,453	0,507	14,76	<0,001
	Hdac2	16,514	<0,001	0,345	0,562	9,761	0,005	0,916	0,348	1,286	0,268	5,927	0,023
	Grin1	15,894	<0,001	0,0001	0,991	8,936	0,006	0,0172	0,897	0,613	0,441	0,978	0,332
	Grin2a	1,387	0,25	6,913	0,015	0,457	0,506	1,623	0,215	0,083	0,776	1,525	0,229
Grin2b	53,777	<0,001	0,515	0,48	30,645	<0,001	0,195	0,662	0,357	0,556	4,323	0,048	
Fascia Dentada	Receptor GR	1,465	0,238	6,893	0,015	1,043	0,317	0,00664	0,936	7,863	0,011	0,971	0,334
Fascia Dentada	HDAC2	7,336	0,012	7,22	0,013	1,681	0,207	8,368	0,008	29,605	<0,001	6,287	0,019
Fascia Dentada	acH3K14	8,666	0,007	0,595	0,448	1,686	0,206	13,855	0,001	2,92	0,101	30,005	<0,001
CA1	Receptor GR	3,754	0,065	8,537	0,007	3,352	0,081	2,629	0,118	9,785	0,005	2,882	0,103
	HDAC2	14,611	<0,001	9,976	0,004	0,0114	0,916	24,416	<0,001	0,496	0,488	14,338	<0,001
Hipocampo CA1	acH3K14	61,209	<0,001	1,171	0,291	0,943	0,341	35,378	<0,001	17,35	<0,001	28,865	<0,001
	Nr3C1	41,544	<0,001	0,906	0,351	0,885	0,356	1,656	0,21	12,774	0,002	1,088	0,307
Total	Hdac2	23,099	<0,001	7,406	0,012	7,604	0,011	1,683	0,207	0,073	0,789	0,473	0,498
	Grin1	7,295	0,012	5E-05	0,994	1,134	0,298	0,238	0,631	1,757	0,198	2,384	0,136
Total	Grin2a	26,034	<0,001	1,12	0,301	0,165	0,688	1,336	0,259	6,016	0,022	0,199	0,659
	Grin2b	1,219	0,281	0,0385	0,846	0,74	0,398	3,888	0,061	3,438	0,076	2,115	0,159
Basolateral	Receptor GR	25,543	<0,001	1,841	0,187	2,821	0,106	0,24	0,628	0,355	0,557	2,953	0,099
	HDAC2	106,019	<0,001	5,607	0,026	0,00524	0,943	9,731	0,005	13,314	0,001	46,041	<0,001
Basolateral	acH3K14	22,175	<0,001	4,589	0,043	8,426	0,008	2,964	0,098	7,709	0,01	18,156	<0,001
	Nr3C1	1,843	0,187	1,739	0,201	17,365	<0,001	0,84	0,369	1,463	0,238	2,243	0,147
Total	Hdac2	1,285	0,268	4,27	0,051	0,309	0,584	0,0422	0,839	0,0022	0,963	3,526	0,073
	Grin1	0,0134	0,909	0,356	0,557	8,399	0,008	0,0541	0,818	1,15	0,294	0,00292	0,957
Total	Grin2a	0,158	0,695	0,245	0,625	5,056	0,034	0,471	0,499	0,665	0,423	0,449	0,509
	Grin2b	1,403	0,248	1,015	0,324	13,56	0,001	0,176	0,679	0,831	0,371	0,868	0,361



Contents lists available at ScienceDirect

## Neurobiology of Learning and Memory

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ynlme](http://www.elsevier.com/locate/ynlme)

## Histone deacetylase inhibition abolishes stress-induced spatial memory impairment

Viviana Vargas-López<sup>a,b</sup>, Marisol R. Lamprea<sup>a,c</sup>, Alejandro Múnera<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup> Behavioral Neurophysiology Laboratory, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia<sup>b</sup> Physiological Sciences Department, School of Medicine, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia<sup>c</sup> Psychology Department, School of Human Sciences, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 6 May 2016

Revised 19 July 2016

Accepted 17 August 2016

Available online 18 August 2016

## Keywords:

Acute stress

Corticosterone

Epigenetics

Histone deacetylation

Spatial memory

Stress induced-memory impairment

Trichostatin A

## ABSTRACT

Acute stress induced before spatial training impairs memory consolidation. Although non-epigenetic underpinning of such effect has been described, the epigenetic mechanisms involved have not yet been studied. Since spatial training and intense stress have opposite effects on histone acetylation balance, it is conceivable that disruption of such balance may underlie acute stress-induced spatial memory consolidation impairment and that inhibiting histone deacetylases prevents such effect. Trichostatin-A (TSA, a histone deacetylase inhibitor) was used to test its effectiveness in preventing stress' deleterious effect on memory. Male Wistar rats were trained in a spatial task in the Barnes maze; 1-h movement restraint was applied to half of them before training. Immediately after training, stressed and non-stressed animals were randomly assigned to receive either TSA (1 mg/kg) or vehicle intraperitoneal injection. Twenty-four hours after training, long-term spatial memory was tested; plasma and brain tissue were collected immediately after the memory test to evaluate corticosterone levels and histone H3 acetylation in several brain areas. Stressed animals receiving vehicle displayed memory impairment, increased plasma corticosterone levels and markedly reduced histone H3 acetylation in prelimbic cortex and hippocampus. Such effects did not occur in stressed animals treated with TSA. The aforementioned results support the hypothesis that acute stress induced-memory impairment is related to histone deacetylation.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Although it is usually an adaptive response, depending on its intensity or reiteration stress can enhance or impair hippocampus-dependent memory (Sandi & Pinelo-Nava, 2007). It has been described that intense or chronic stress impairs spatial memory (Kim & Diamond, 2002). In this sense, acute stress induced before spatial training has a deleterious effect on spatial memory consolidation without affecting spatial acquisition (Almaguer-Melian et al., 2012; Diamond et al., 2006; Kim, Koo, Lee, & Han, 2005; Kim, Lee, Han, & Packard, 2001; Park, Zoladz, Conrad, Fleshner, & Diamond, 2008; Sandi et al., 2005); such stress-induced consolidation impairment in spatial as well as in non-spatial tasks has been associated to cellular and molecular alterations, including significant reduction of total and phosphory-

lated Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (pCAMK-II), phosphorylated cAMP response element-binding (pCREB), transcription factor *c-fos* expression, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neural cell adhesion molecule (NCAM), activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc), and dendritic spine density in the hippocampus (Almaguer-Melian et al., 2012; Diamond et al., 2006; Sandi et al., 2005; Sardari, Rezayof, & Khodagholi, 2015; Vanelzakker et al., 2011; Zoladz et al., 2012). By contrast, epigenetic mechanisms involved in acute stress-induced memory impairment have not been reported.

Due to the emerging interest in the epigenetic mechanisms involved in learning and memory, it has been found that training in several hippocampus-dependent learning tasks promotes histone acetylation in rodents' hippocampus and prelimbic cortex several hours after training (Bousiges et al., 2010; Dagnas, Micheau, Decorte, Beracochea, & Mons, 2015; Dagnas & Mons, 2013; Gräff, Woldemichael, Berchtold, Dewarrat, & Mansuy, 2012; Levenson et al., 2004). On the other hand, it has been reported that persistent or high intensity stress reduces histone acetylation (Benoit, Rakic, & Frick, 2015; Miller et al., 2011; Rei et al., 2015; Sailaja, Cohen-Carmon, Zimmerman, Soreq, &

\* Corresponding author at: Laboratorio de Neurofisiología Comportamental, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Edificio 471, Oficina 430, Carrera 30 N° 45-03, Ciudad Universitaria, 111321 Bogotá D.C., Colombia.

E-mail address: [famunera@unal.edu.co](mailto:famunera@unal.edu.co) (A. Múnera).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2016.08.009>

1074-7427/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

### **Presentación de Resultados Derivados la Tesis en Eventos Internacionales**

- Vargas-López, V. & Múnera, A. "Trichostatin A prevents stress-induced spatial memory impairment. Poster presentado en Neuroscience 2016, 46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. San Diego, Estados Unidos, 2016. <https://www.sfn.org/Annual-Meeting/Neuroscience-2016/Sessions-and-Events/Program/Abstract-PDFs-2016>
- Vargas-López V, Lamprea M, Múnera A. Histone deacetylase inhibition hinders acute stress-induced impairment on spatial memory and increased retrieval-related corticosterone release. Poster presentado en 9th FENS Forum of Neuroscience, Milán – Italia - 2014. [http://fens2014.meetingxpert.net/FENS\\_427/poster\\_103853/program.aspx/anchor103853](http://fens2014.meetingxpert.net/FENS_427/poster_103853/program.aspx/anchor103853)

### **Presentación de Resultados Derivados de la Tesis en Eventos Nacionales**

- Vargas-López V, Lamprea M, Múnera A. La inhibición farmacológica de las desacetilasas de histonas impide que el estrés agudo deteriore la consolidación de la memoria espacial". Charla en el Simposio de Neurociencia Comportamental en el X Congreso Nacional/XI Seminario Internacional de Neurociencias, Pereira - Colombia - 2016. <http://colne.org.co/wp-content/uploads/2016/01/MEMORIAS-CONGRESO-2016.pdf>

### **Otros Artículos Publicados por la Candidata**

- Vargas-López V, Torres-Berrio A, González-Martínez L, Múnera A, Lamprea MR. Acute restraint stress and corticosterone transiently disrupts novelty preference in an object recognition task. *Behavioural Brain Research*, 2015; 291: 60 - 66. doi: 10.1016/j.bbr.2015.05.006
- Vargas-López V, Lamprea MR, Múnera A. Characterizing spatial extinction in an abbreviated version of the Barnes maze. *Behavioural Processes*, 2011; 86(1): 30 - 38. doi: 10.1016/j.beproc.2010.08.002
- Torres A, Vargas V, Múnera A, Lamprea M. Evaluación de preferencia por la forma o la textura de dos tipos de objetos en ratas Wistar. *Revista Colombiana de Psicología*, 2007; 16: 49-56. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=80401603>

### **Artículos en Preparación**

- Vargas-López V, Múnera A. Acute stress epigenetically regulates GR and HDAC2 expression in prefrontal cortex and hippocampus.
- Vargas-López V, Ureña-Mendez G, Cerón J, Múnera A, Lamprea MR. Acute stress-induced spatial memory enhancement is associated to histone acetylation balance and increased Arc expression.