



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

IDENTIFICACION DE NEURONAS HIPOCAMPALES  
QUE DISCRIMINAN DOS PROGRAMAS DE REFORZAMIENTO  
EN UNA TAREA DE LABERINTO RADIAL

Tesis que presenta:

**Elohim Emmanuel Esparza Rivera**, como requisito para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias (Neurobiología)

Director de Tesis: Dr. Víctor Ramírez Amaya

Campus Juriquilla, Querétaro, Octubre 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Elohim Emmanuel Esparza Rivera, cuyo título es: "Identificación de las neuronas hipocampales que discriminan dos programas de reforzamiento en una tarea de laberinto radial" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias(Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente  
Dra. Gina Lorena Quirarte

Secretario (Tutor)  
Dr. Víctor Ramírez Amaya

Vocal  
Dr. José Bargas Díaz

Suplente  
Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Suplente  
Dr. Hugo Merchant Nancy

Aprobado por el Comité Académico

---

Coordinador del Programa

## **AGRADECIMIENTOS A:**

Todos los integrantes del laboratorio A-13, en especial a la técnica Itzel Ricaño Cornejo.

Mi tutor y amigo Víctor Ramírez Amaya, por hacer posible esta tesis y aguantar todas mis irreverencias e inconsistencias académicas.

Mi jurado de tesis, por las valiosas opiniones que fueron parte integrante del trabajo que aquí presento

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
Becario No: 210202

El personal del depto. de análisis de Imágenes Digitales

Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos

El personal de la biblioteca

Pilar Galarza Barrios  
Rafael Silva Cruz

El personal del Bioterio

M.V.Z. Martín García Servín

La Vida y a la sagrada Causalidad inescrutable, que me formó por medio de todos aquellos que me han tocado cercanos..., gracias sin nombre que me forcé a darles en acto lo que a cada uno les debo y nos recuerde que, siendo parte minúscula del Todo, lo que hacemos es producto de los otros que nos forjaron y va más allá de lo que imaginamos.

*Difícil arte el de darse valor. Para quienes no lo tienen lo más sencillo es ubicarse bajo la poderosa protección de alguien que si lo tiene y puede ayudarnos cuando estamos desamparados. Sin embargo, como hay tantos sufrimientos en el mundo y ningún ser humano tiene el valor de encararlos, la religión es un consuelo excelente. En realidad la religión es el arte de obtener consuelo y valor frente al sufrimiento y energías para superarlo, sin otro medio que pensar en dios. He conocido hombres cuya dicha era su dios; creían en la dicha y el pensamiento les daba valor. El valor les daba dicha y la dicha va-lor. Cuando el hombre deja de creer en un ser sabio y suprahumano sufre una gran pérdida. Esta es una consecuencia necesaria de todo estudio de la filo-sofía y la naturaleza. No se pierde la creencia en un dios, pero ya no es el dios bondadoso de la infancia; es un ser con caminos que no son nuestros caminos, con pensamientos que no son nuestros pensamientos, y esto no les sirve de mucho a los desamparados.*

Lichtenberg "Aforismos" J. 833

## ÌNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>II</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>III</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>IV</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Nociones Generales.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Mecanismos Básicos de las Redes Neuronales.....</b>	<b>6</b>
<b>3. El Hipocampo .....</b>	<b>9</b>
<b>4. La Codificación del Contexto Espacial .....</b>	<b>14</b>
<b>5. El Mapeo de la Actividad de Poblaciones Neuronales; CatFISH .....</b>	<b>18</b>
<b>6. CatFISH y el Mapeo de la Codificación del Contexto Espacial .....</b>	<b>21</b>
<b>7. El Laberinto Radial y la Codificación del Contexto Espacial .....</b>	<b>23</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>26</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>26</b>
<b>ANIMALES, MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>27</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
<b>1. Del entrenamiento conductual.....</b>	<b>34</b>
<b>2. De CatFISH.....</b>	<b>40</b>
<b>DISCUSIONES .....</b>	<b>45</b>
<b>1. Del entrenamiento conductual.....</b>	<b>45</b>
<b>2. Del correlato neuronal .....</b>	<b>47</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>53</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>54</b>
<b>INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....</b>	<b>61</b>

## RESUMEN

Comprender los procesos de aprendizaje y memoria, implica entender los mecanismos neuronales que les permiten a los organismos reconocer diferentes situaciones conductuales y/o contextuales. El presente trabajo busca estudiar estos mecanismos, a través de identificar las unidades neuronales que responden a dos tareas diferentes en un mismo ambiente espacial. El objetivo de la presente tesis fue caracterizar la conducta de los animales y la actividad neuronal en el hipocampo, región en donde las neuronas responden de manera específica al ambiente espacial. Para ello, entrenamos a ratas en una tarea de discriminación en un laberinto radial de 8 brazos, utilizando dos diferentes tonos asociados con dos recorridos distintos (cada uno compuesto de tres brazos y ambos con movimientos y ángulos de giro equivalentes) utilizando comida como estímulo reforzador. Evaluamos la actividad celular mediante la técnica de catFISH, que se vale de la detección de la expresión del gen inmediato efector Arc, para distinguir a las células que se activan durante dos diferentes épocas conductuales. Encontramos que las regiones de CA1 y CA3 del hipocampo, participan en la codificación de dos recorridos aprendidos en un mismo ambiente de exploración. Esto aporta evidencia de la participación del hipocampo en la codificación del contexto espacial, de acuerdo a las demandas conductuales que los animales tienen que realizar para conseguir el reforzador.

## **SUMMARY**

The understanding of learning and memory processes implies the knowledge of the neural mechanisms that enable organisms to recognize different behavioral conditions and contexts. The present work aimed to study these mechanisms, by identifying the neural units that respond to two different tasks within the same spatial environment. In the present study, we characterize the behavior of animals and the neural activity in the hippocampal region, which is known to contain neurons that respond in a very specific way to the spatial context. We trained male Wistar rats in a discrimination task inside a radial maze using two different tones, paired to two distinct paths (each containing three arms and both with equivalent movements and course angle), and reinforced with food. Cell activity was evaluated through the catFISH technique, which detects expression of the immediate effector gene *Arc*, in order to distinguish activation of cells during two distinct behavioural epochs. We found that CA1 and CA3 regions of hippocampus, participate in the codification of two routes learned in the same exploration environment. This results provide supports evidence of hippocampal participation in spatial context coding, depending on the requirements of the task that allows for obtaining the reward.

## INTRODUCCIÓN

La adaptación de cualquier organismo depende de la forma en que percibe e integra la información que proviene del medio. El sistema nervioso posee una conectividad predeterminada por la herencia y la filogénesis, que dota al animal de un conjunto de conductas, como respuesta a estímulos específicos, que le permiten adaptarse (Lorenz, 1976). Sin embargo, en la ontogenia los circuitos se modifican de acuerdo a las exigencias que impone el entorno, exigencias que pueden ser impuestas por la exposición a ambientes espaciales novedosos o nuevas demandas conductuales en un ambiente ya conocido.

En el presente trabajo, nuestro interés es estudiar cómo el sistema nervioso reconoce y discrimina las condiciones ambientales con las cuales se enfrenta. Pretendemos establecer un modelo con el que podamos estudiar los circuitos neuronales responsables de la discriminación entre diferentes estímulos, que evocan conductas alternativas en el mismo ambiente espacial. Para ello, entrenamos a ratas en una tarea de discriminación en un laberinto radial de 8 brazos, valiéndonos de dos tonos asociados a dos distintos recorridos (cada uno compuesto de tres brazos, ambos con movimientos y ángulos de giro equivalentes). Dado que se utiliza un reforzador (en este caso comida) para que los animales aprendan a recorrer determinados brazos, a la asociación tono-recorrido-refuerzo se le denomina programa de reforzamiento. Una vez que los animales alcanzaron una ejecución de la tarea con un nivel mínimo de errores (<10%) y con evidencia clara de discriminación (prueba estadística de chi cuadrada) de los dos recorridos, realizamos una última sesión de exploración en el laberinto radial. Utilizando ya sea el programa A de reforzamiento (tono de 2000 Hz. asociado al reforzador en brazos 1, 4 y 6) en dos ocasiones separadas por un intervalo de tiempo de 25 min (AA); o bien el programa A en el primer ensayo y luego el programa B (tono de 500 Hz. asociado al reforzador en brazos 3, 5 y 8) en el segundo ensayo 25 min después (AB). Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de la segunda exploración.

Consideramos que las células que responden durante la tarea, incluyen a los grupos de neuronas que generan un patrón de actividad específico para representar la información de la conducta reforzada en un contexto espacial. Evaluamos la actividad celular mediante la técnica de CatFISH. Detectando el transcrito del gen efector de expresión inmediata Arc en estructuras del hipocampo, las cuales se sabe participan en la codificación del reconocimiento y la discriminación del contexto (Leutgeb, Leutgeb, Moser y Moser, 2007). Gracias al conocimiento que se tiene (Guzowski, McNaughton, Barnes y Worley, 1999) del tiempo que le toma al ARNm de Arc acumularse en el núcleo durante el proceso de transcripción (~5min) y posteriormente translocarse hacia el citoplasma de la célula (~30min), podemos identificar a las neuronas que responden durante diferentes épocas conductuales, separadas por un intervalo de ~30 min (Vazdarjanova y Guzowski, 2004). De esta manera, identificamos a las células que respondieron a la primera época de exploración por la presencia del ARNm de Arc en el citoplasma, mientras que las células que respondieron a la segunda exploración presentaron el ARNm de Arc en el núcleo. Las neuronas que respondieron a ambas épocas conductuales se identificaron por la presencia del gen en ambos compartimentos celulares. Los resultados mostraron que tanto la región de CA1 como la de CA3 en el hipocampo, se activan y participan en la codificación del contexto durante la ejecución de la tarea de discriminación en el laberinto radial. Esto aporta evidencia de la participación del hipocampo en la codificación de los dos recorridos, aun cuando estos se hayan dado en el mismo ambiente espacial. Acorde con lo reportado en la literatura (Smith y Mizumori, 2006), los datos demostraron que la codificación del contexto no solo se construye a partir de las pistas del entorno, sino también de acuerdo a las demandas conductuales de la tarea. Confirman que los circuitos neuronales del hipocampo juegan un papel importante en el procesamiento de la información necesaria para el aprendizaje espacial. Lo anterior sugiere que el hipocampo puede generar representaciones estables de diferentes recorridos en un mismo ambiente, útiles para una eficiente conducta de navegación, lo que puede ser una característica importante de la función hipocampal.

## **ANTECEDENTES**

### **1. Nociones Generales**

Mediante el aprendizaje y la memoria los organismos adquieren información del entorno, que se almacena y se utiliza para generar o modificar conductas que le permiten al organismo adaptarse al medio. Para entender cómo se produce esta modificación conductual, es necesario conocer los mecanismos neuronales que les subyacen.

Aunque es claro que las neuronas median todos los procesos cognoscitivos, si las unidades neuronales fueran las encargadas de representar los eventos de estimulación, el número de neuronas que existe en un cerebro limitaría la cantidad de información que este puede procesar. La actividad de cada neurona es altamente variable, la inmensa cantidad de sus contactos sinápticos sugiere que es muy poco probable que por sí misma pueda representar un evento de estimulación; el cual incluye por lo regular una configuración compleja de estímulos (Sakurai, 1999). La codificación de la información en unidades celulares tampoco explicaría la redundancia funcional en el SNC. Ni la compensación de las funciones cognoscitivas que se ha observado después de lesiones que destruyen grupos grandes de células nerviosas (Lashley, 1931). Por tanto, se ha propuesto que el procesamiento de la información se lleva a cabo por redes neuronales que trabajan en serie y/o en paralelo, formando circuitos en los cuales se generan patrones de actividad por estímulos específicos (Sakurai, 1999).

Uno de los primeros neurocientíficos que formalmente planteó esta idea fue el psicólogo Donald Hebb (1949), el cual se basó en las descripciones anatómicas de Lorente de Nó que demuestran la existencia de conexiones recurrentes y una sofisticada red de ramas axonales (Figura 1). Hebb sostuvo que la memoria está sostenida por patrones de actividad coordinados que se repiten en grupos específicos de neuronas. En principio por la reverberación

que permiten las conexiones recurrentes, posteriormente a través de cambios en la eficiencia de la comunicación sináptica y de modificaciones estructurales. A estos grupos Hebb los denominó “ensambles, y sostuvo el supuesto de que podían interactuar unos con otros para formar sistemas más complejos denominados secuencias de fase. Cuanto mayor es el tiempo de reverberación del ensamble, mayor es la probabilidad de que se den cambios estructurales (como crecimiento o engrosamiento de los botones sinápticos) que modifiquen el peso de las sinápsis (el umbral ante el cual la sinápsis es activada) y faciliten la transmisión de la información por rutas específicas.

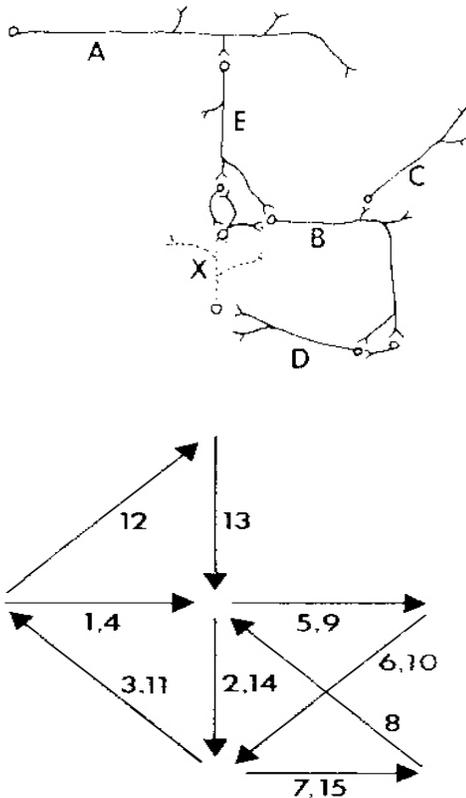


Figura 1. En la zona de la izquierda se muestra un conjunto de neuronas (señaladas por las letras), en la cual B, D y X constituyen conexiones recurrentes que conducen la estimulación hacia las mismas células de donde provino, lo que permite que el circuito reverbere por algún periodo. A la derecha un esquema de un ensamble. Las flechas representan la dirección y los números la secuencia de los potenciales de acción entre las neuronas del circuito (representadas por los espacios a donde llegan las flechas). Ilustran la posibilidad de una alternancia de reverberación por rutas en paralelo funcional, que permiten al ensamble mantenerse activo por más tiempo (modificado del libro de Hebb, 1949).

En la actualidad, el concepto de ensamble se refiere a los grupos de células nerviosas que después de producir un patrón de actividad, a consecuencia de una de estimulación sensorial o conductual, mantienen la capacidad de reproducirlo. Inicialmente mediante la reverberación y posteriormente gracias a los cambios plásticos que ocurren entre sus conexiones. Destacan varias propiedades (Hebb, 1949; Sakurai, 1999) importantes de estos sistemas celulares de representación de la información:

- a) **El traslape**, que es la posibilidad de que una misma neurona pueda ser parte de múltiples ensambles.
- b) **La codificación escasa**, sugiere que un ensamble, conforme se consolida, debe disminuir la cantidad posible de neuronas para evitar la saturación y aumentar la capacidad mnémica del sistema.
- c) **La construcción y reconstrucción dinámica**, que implica que las conexiones sinápticas entre los miembros del ensamble son flexibles aun incluso después de que se ha consolidado.
- d) **La persistencia dinámica**, se refiere a que una vez formado un ensamble, tendera a persistir en el tiempo por medio de la reactivación de su patrón de actividad específico.
- e) **El completamiento dinámico**, considera que la activación de un subconjunto suficientemente grande de las células nerviosas que componen un ensamble, es capaz de activar al ensamble completo. Esto puede ocurrir también con las secuencias de fase que se componen de distintos ensambles.

Con base en estos antecedentes teóricos, las neurociencias consideran que las neuronas procesan la información traduciéndola a un lenguaje o código neuronal producto de la actividad característica de estas células. El código es resultado de patrones de actividad de poblaciones de neuronas y constituye el sustrato celular que representa la información que se recibe del entorno (Guzowski, Knierim y Moser, 2004; Marr, 1971; Sakurai, 1999). Las neuronas individuales, al poder formar parte de varios ensambles, solo codifican

información en la medida en que coordinan su actividad con aquella que se genera en otras neuronas formando así redes neuronales que representan la información. El almacenamiento y la recuperación de la información, implica la repetición de los patrones de actividad en neuronas específicas gracias a la modificación en los pesos de las sinápsis que conforman la red.

## ***2. Mecanismos Básicos de las Redes Neuronales***

Cajal fue el primero en sugerir que las terminales nerviosas podían tener cambios en su conectividad como consecuencia de la actividad neuronal, afirmando que tales cambios podían ser la base de la memoria. Para referirse a estos y otros cambios en la configuración y función del sistema nervioso, Sherrington acuñó el concepto de plasticidad sináptica (citado por Bailey y Kandel, 1993). En la década de los 70s se descubrió lo que se conoce como potenciación a largo plazo (o LTP por sus siglas en inglés). Es un incremento sostenido en la eficacia de la transmisión sináptica que ocurre después de estimular una vía aferente con estímulos de alta frecuencia (Bliss y Lomo en 1973). Este fenómeno plástico fue descrito en la vía perforante, que conecta a las células de la corteza entorrinal con las neuronas del giro dentado, ambas estructuras de la formación hipocampal (ver más adelante la anatomía del hipocampo).

Inicialmente Bliss y Lomo (1973) describieron que la LTP podía durar horas e incluso días, luego se descubrió que puede durar semanas y posiblemente meses (Thompson y Best, 1990). La LTP ha sido propuesta como un modelo celular para explicar los mecanismos que subyacen al aprendizaje y la memoria, ya que es un ejemplo de cómo los ensambles pueden reproducir o modificar patrones de actividad a largo plazo. Acorde con esto, es el hecho de que la modificación en la eficacia sináptica es dependiente de la actividad y se produce en un tiempo breve, lo cual no restringe que el cambio dure semanas o meses. De igual forma, es un fenómeno bien localizado, ya que sólo las sinápsis activadas por la estimulación muestran la potenciación a largo plazo.

Además, puede ser un fenómeno asociativo, en el que la estimulación subumbral convergente de otras vías que proyectan a la misma célula que se está estimulando con alta frecuencia, es necesaria para facilitar la potenciación de la respuesta postsináptica (Carlson, 2000). Este proceso es congruente con el postulado hebbiano, el cual afirma que cuando las sinápsis débiles y fuertes de una misma neurona son estimuladas aproximadamente al mismo tiempo, la débil se fortalece (Hebb, 1949).

La LTP se produce por la activación de los receptores a glutamato de tipo  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) y N-metil-D-aspartato (NMDA), que permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^{+}$  al interior de la célula. Se requiere de la entrada de una fuerte cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  para inducir LTP, por el contrario la entrada de poco  $\text{Ca}^{2+}$  puede inducir una depresión a largo plazo (LTD, un decremento prolongado en la respuesta postsináptica). Tanto la LTP como la LTD dependen de la frecuencia de estimulación en la vía presináptica; una estimulación de alta frecuencia produce LTP, en cambio una de baja frecuencia produce LTD (Bortolotto y Collingridge, 1993; Malenka y Nicoll, 1999). Ambos fenómenos son un ejemplo de cómo las sinápsis modifican su eficiencia y regulan la conducción de la información a través de la red neuronal.

Los eventos moleculares que ocurren como consecuencia de la activación de receptores NMDA, dan lugar a cambios plásticos tempranos y tardíos (Figura 2). Al activarse los receptores NMDA se permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , que provoca la activación de diferentes cinasas como la CaMKII, PKC, Tyrosina cinasa etc. Al activarse éstas, fosforilan diferentes proteínas de membrana entre las que se incluyen los mismos receptores AMPA y NMDA que cambian sus características funcionales y la eficiencia de la respuesta post-sináptica (Kandel, Schwartz y Jessell, 2001). Estos eventos dan lugar a las modificaciones plásticas tempranas, ya que ocurren casi de inmediato y tienden a ser transitorios. Los eventos plásticos tardíos también son regulados por las señales de calcio, pero implican la transcripción de genes (Fields et al. 2005) y la activación de segundos mensajeros como el AMP cíclico. Este funciona como un importante segundo mensajero, cuya actividad regula a otras cinasas que regulan la transcripción de genes mediante la activación de factores de

transcripción como CREB (Kandel et al. 2001). La importancia de la transcripción y traducción de genes para los fenómenos plásticos se ha hecho patente desde hace años. Así, se ha visto que la delección del gen que codifica para la producción de CaM-KII interfiere con el establecimiento de LTP en la región hipocampal de CA1 (Silva et al. 1992). Igualmente, el uso de oligos antisentido que inhiben la traducción del ARNm de un gen llamado Arc (del cual hablaremos más adelante) impiden el mantenimiento del LTP y afectan la consolidación de memorias espaciales (Guzowski et al. 2000; Bramham y Messaoudi, 2005). Lo que además ha sido corroborado con el uso de un “knock out” de Arc (Plath et al. 2005).

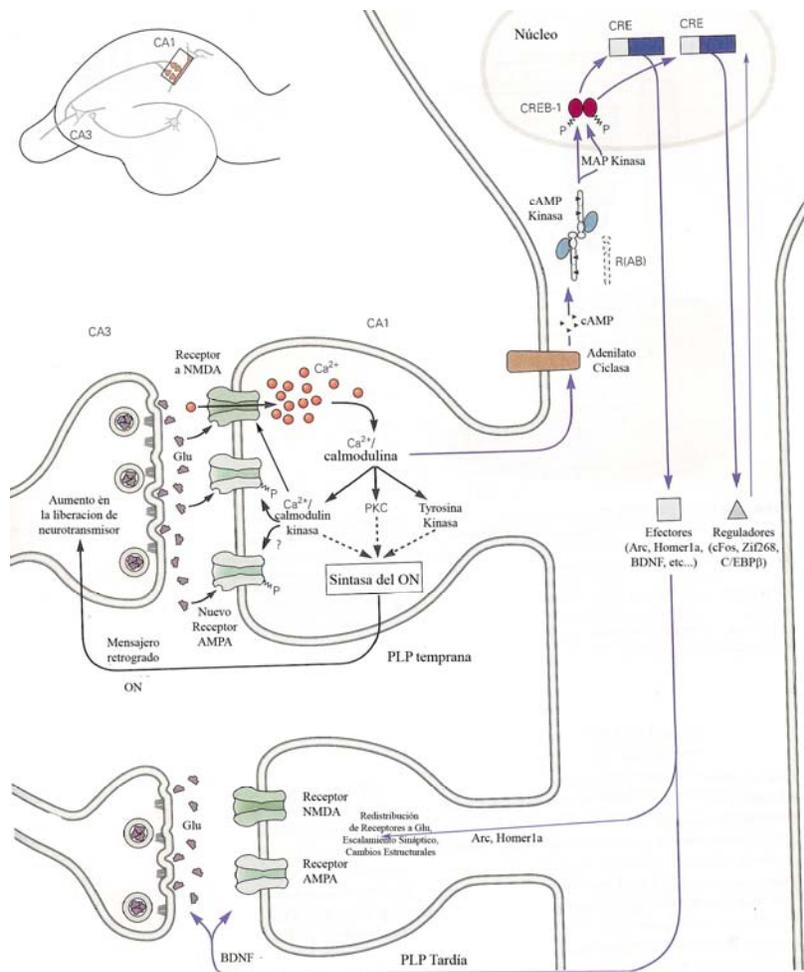


Figura 2. Muestra los mecanismos moleculares por los cuales se produce y se mantiene la LTP a largo plazo, la cascada de segundos mensajeros que inducen distintos cambios estructurales, entre los cuales se encuentra el crecimiento de nuevos contactos sinápticos. Se observa la liberación del neurotransmisor, la activación de los receptores AMPA y NMDA, la entrada masiva de calcio, la activación de proteínas cinasas, la transcripción de genes y la traducción de diversos factores de regulación del crecimiento nervioso que pueden llevar, entre otras cosas, al engrosamiento o desarrollo de nuevos botones sinápticos. El conjunto de estas reacciones moleculares en cadena, son las responsables de que la LTP modifique el peso de las sinápsis y en consecuencia determine la facilitación de la conducción de la información por rutas específicas de la red neural (modificado del Kandel et al. 2001).

La LTP y los mecanismos moleculares que implica resultan de gran relevancia para la adquisición de tareas conductuales. Se conoce que el condicionamiento del reflejo corneal en los conejos, produce un incremento de la eficacia en la transmisión de las sinápsis entre la vía perforante y las células granulares (Weisz, Clark y Thompson, 1984). Morris, Anderson, Lynch y Baudry (1986), demostraron que la administración intraventricular del ácido D-2-amino-5-fosfopentanoico (AP5), un antagonista de los receptores NMDA capaz de bloquear la LTP *in vivo*, imposibilita el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris.

### **3. El Hipocampo**

El descubrimiento de la LTP descrito inicialmente por Bliss y Lomo (1973) se hizo en la formación hipocampal. La importancia de esta estructura para el aprendizaje ha sido relacionada con la consolidación de eventos recientemente aprendidos desde hace mucho tiempo (Milner, 1966). El hipocampo recibe información multimodal de la corteza cerebral a través de la corteza entorrinal, la evidencia experimental apunta a que puede asociar, retener, amplificar y consolidar dicha información (Holscher, 2003). El hipocampo tiene conexiones con la amígdala, el hipotálamo, el septum y los tubérculos mamilares (Thompson y Kim, 1996). En la rata (Figura 3) la formación hipocampal es una estructura elongada, rostro-caudal en forma de "C" desde el núcleo septal sobre y por debajo del diencéfalo, con su eje corriendo en dirección septotemporal (Paxinos y Watson, 1997).

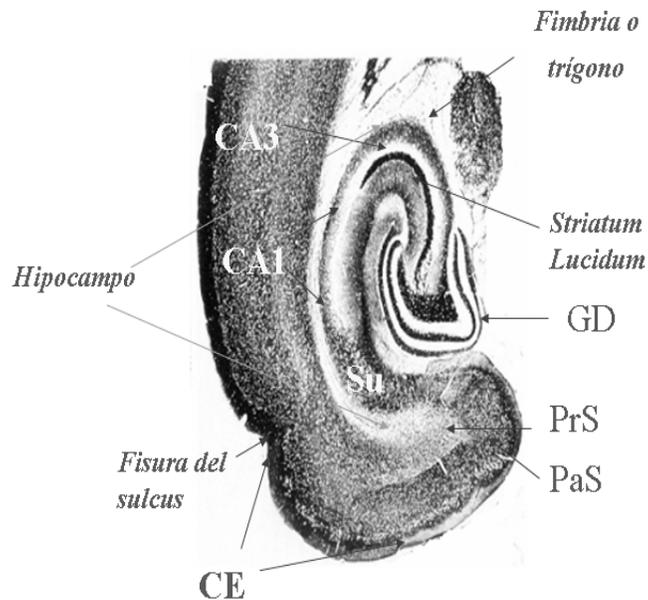


Figura 3. Se muestra un corte horizontal de la formación hipocámpica de la rata y sus divisiones. Se distinguen el complejo subicular (subiculum, Su; presubiculum, PrS y parasubiculum, PaS), la corteza entorrinal (CE), el hipocampo (CA1 y CA3) y el giro dentado (GD). Esquema modificado de Ottersen y Storm-Mathisen (1989).

La conectividad de las estructuras del hipocampo forma un intracircuito. Se inicia con la entrada de fibras por la vía perforante, que va de la corteza entorrinal hacia el giro dentado. Continúa con el relevo en las células piramidales de CA3 y de ahí, por las fibras recurrentes de Schaffer, hacia las células piramidales de CA1, cuya salida es de nuevo vía la corteza entorrinal (Witter y Amaral, 2004).

En detalle (Figura 4), el intracircuito empieza con las fibras de la vía perforante que provienen de las células estrelladas y piramidales en las capas II y IV, respectivamente, de la corteza entorrinal medial y lateral. Pasan a través del complejo subicular y de la fisura hipocámpica, entran a las capas moleculares del giro dentado (GD) y del CA3 terminando en los dos tercios externos. En las células granulares forman sinápsis excitatorias sobre las espinas dendríticas, constituyendo así el primer relevo sináptico (glutamatérgico) de la entrada de información al circuito hipocámpico. Las células granulares del GD envían sus axones, llamadas fibras musgosas (FM), hacia la región del hilus en las células en cesta y células musgosas, que envían señales inhibitorias al propio giro dentado. Después alcanzan el CA3, para hacer la mayoría de sus contactos sinápticos con interneuronas inhibitorias y el resto en las excrescencias

torneadas de las dendritas apicales de las neuronas piramidales (Jaffe y Gutiérrez, 2007).

Las neuronas de CA3, cuyos árboles dendríticos son mayores que los de CA1 (Ishizuka, Weber y Amaral, 1990), envían sus axones por dos vías: una hacia afuera del hipocampo a través de la fimbria (fibras comisurales) y la otra que forma la colateral mielinizada (colaterales de Schaffer) hacia la región CA1. Para cerrar el circuito, las neuronas de CA1 envían proyecciones a las neuronas piramidales del complejo subicular y a la parte profunda de la corteza entorrinal. Existe una proyección principal desde el subiculum a las capas profundas (V y VI) de la corteza entorrinal, que proyectan hacia las capas superficiales (II y III) que a su vez dan lugar a las fibras de la vía perforante (Amaral y Witter, 1989).

En el hipocampo las neuronas de proyección (Golgi tipo I) son las piramidales y las células granulares localizadas en CA1, CA3 y área dentada. También existen neuronas de proyección local (Golgi tipo II), presentes en cada área y en particular en la región del hilus donde presentan diversidad de formas, siendo especialmente abundantes las neuronas GABAérgicas (Amaral y Witter, 1989). La organización celular se da en capas laminares (*strata*) de fibras aferentes, que establecen conexiones diversas que van de la parte externa a la interna del hipocampo. Se denominan de la siguiente manera: el *stratum alveole* (ALV), *stratum oriens* (OR) o capa polimorfa, *stratum pyramidale* (P), *stratum radiatum* (RAD) ó capa radial y el *stratum lacunosum moleculare* (LAC-MOL) (Amaral y Witter, 1989).

El principal tipo de neurona en el hipocampo es la piramidal, la cual tiene un árbol dendrítico basal que se extiende hacia el *oriens* y uno apical hacia el *lucidum* (Amaral y Witter, 1995). En los *strata radiatum* y *oriens*, las colaterales de Schaffer forman sinápsis “*en passant*” sobre las dendritas apicales de las neuronas piramidales, pero también reciben fibras comisurales y de la vía perforante de la corteza entorrinal (ahora de las capas III y V).

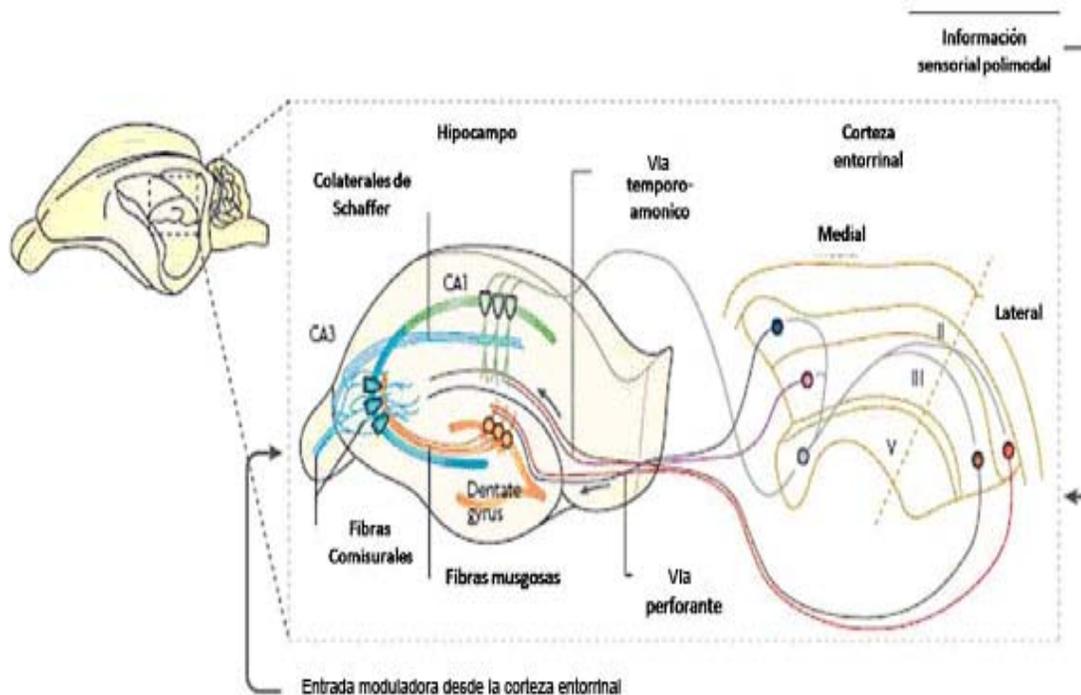


Figura 4. Circuito del hipocampo del roedor. Se observa la entrada de axones (patrón perforante) provenientes de las células de la capa II de la corteza entorrinal que conduce información sensorial polimodal y hacen sinápsis excitatorias con las neuronas granulares del giro dentado. Los axones de las células granulares (fibras musgosas) hacen sinápsis excitatorias en las dendritas apicales de las células piramidales del CA3. Estas a su vez contactan con las piramidales del CA1 de manera ipsilateral a través de las colaterales de Schaffer, o con el CA3 y CA1 contralateral a través de fibras comisurales. También existe una entrada moduladora directa al CA3 proveniente de la capa II de la corteza entorrinal. Las dendritas apicales del CA1 también reciben entradas directas pero de la capa III de la corteza entorrinal. El esquema no muestra la gran variedad de neuronas inhibitorias en los diferentes campos. Esquema modificado de Neves, Cooke y Bliss (2008).

En los registros de actividad de campo dentro del hipocampo, se han observado fluctuaciones de corriente eléctrica cíclicas en un rango de baja frecuencia denominada frecuencia theta (4-12 Hz). Este patrón de actividad es prominente en todos los mamíferos, incluyendo los seres humanos (Kahana et al. 1999). En la rata este tipo de actividad se presenta durante diferentes estados conductuales, como la exploración, que incluye a la locomoción, orientación, erguimiento y olfateo (Green y Arduini, 1954), así como durante el sueño paradójico (Monmaur, 1982).

#### 4. Las Células de Lugar

En lo que respecta al presente trabajo, el circuito de la formación hipocampal es de suma importancia, ya que los registros electrofisiológicos hechos en

células principales del hipocampo y áreas adyacentes han mostrado que realizan representaciones cognoscitivas del espacio. Esto se dedujo del descubrimiento de lo que se denominó células de lugar. Son neuronas que responden o presentan fuerte actividad electrofisiológica en respuesta a un lugar específico en el espacio (Nadel y Eichenbaum 1999), fueron descritas y caracterizadas electrofisiológicamente por O'Keefe (1976). Dentro de sus principales características (O'Keefe y Nadel 1978) se encuentran las siguientes:

- 1) Poseen un campo receptivo espacial, o campo de lugar ('place field').- este se define como la región espacial en donde una célula de lugar incrementa notablemente su tasa de disparo (Figura 5).
- 2) Estabilidad del campo receptivo espacial.- se refiere a la capacidad que tienen las células de lugar de mantener estable la tasa de disparo, en un mismo campo receptivo espacial cuando el animal explora el mismo ambiente.
- 3) Remapeo del campo receptivo espacial.- se refiere a la modificación del campo receptivo espacial como respuesta a la exploración de un ambiente diferente, novedoso o que ha sido modificado significativamente.

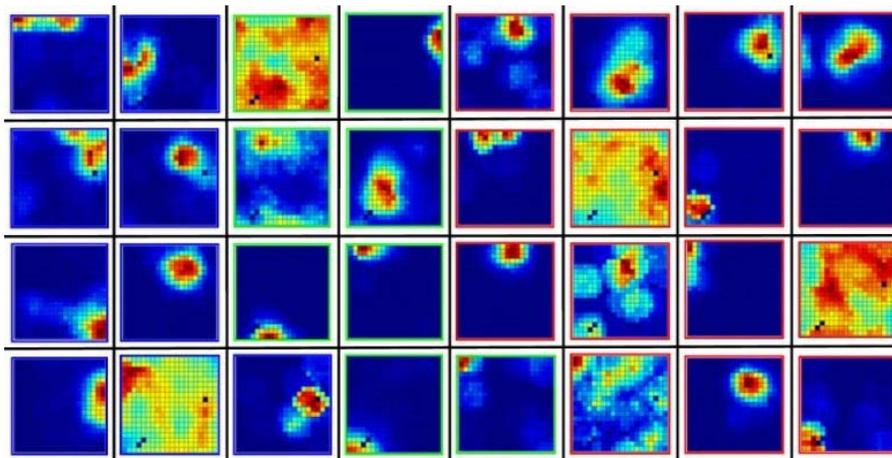


Figura 5. Se muestran los campos receptivos espaciales de distintas neuronas en un ambiente de exploración. Cada cuadrícula representa el ambiente de exploración, el color que predomina en cada uno representa el registro de la activación de una célula de lugar, del color rojo, como la mayor intensidad de disparo, hasta el azul oscuro, como la menor intensidad. Se puede observar que algunas neuronas responden a todo el ambiente de exploración, mientras que otras solo a una parte de este: a una esquina, al centro, a la zona inferior, etc. (modificado de Knierim, 2004).

El descubrimiento de las células de lugar dio soporte empírico a la propuesta teórica de Tolman, la cual plasmaron O'Keefe y Nadel (1978) al sugerir cómo

las células de lugar en el hipocampo generan una representación espacial de nuestro entorno. Estas células se localizan principalmente en el hipocampo, pero también se han observado respuestas semejantes en diversas regiones como la corteza entorrinal y el subiculum, entre otras.

En la región de CA1 en el hipocampo, aproximadamente 40% de las células que se caracterizan como células complejas o células excitatorias responden o presentan un campo receptivo espacial. Esto significa que 40% de las células piramidales de CA1 responden a un lugar específico en el espacio durante la tarea exploratoria. Si se somete a un animal dos veces a un mismo ambiente espacial, ese 40% de células en CA1 que se activa en lugares específicos en el espacio, responderá de manera semejante en ambas ocasiones;

- A esto se le llama estabilidad de la red o estabilidad del mapa cognoscitivo (Jeffery y Hayman, 2004; Muller, 1996).

Si por el contrario se somete a los animales a dos ambientes distintos, se observarán grupos independientes de células que responde a cada ambiente. Las células que respondieron al primer ambiente responderán de manera diferente, mostrando otro campo receptivo espacial o simplemente no respondiendo ante el segundo ambiente. Además de que aparecerán muchas células que responden sólo al segundo ambiente;

- Lo cual se conoce como re-mapeo de la red ('re-mapping') o re-estructuración del mapa cognoscitivo (Jeffery y Hayman, 2004; Muller, 1996).

Sin embargo, la actividad de las células de lugar nunca es totalmente idéntica, aun cuando el animal recorre un mismo ambiente ya explorado previamente siempre existe un grado de variabilidad en los campos receptivos de las células de lugar. Por lo tanto, determinar la estabilidad o el remapeo de la red implica un cálculo probabilístico. Las células de lugar del hipocampo, otras de "dirección de la cabeza" que presentan un disparo específico a la posición y los giros de la cabeza del animal, así como neuronas de regiones neocorticales relacionadas, forman parte de un sistema de navegación que integra la información espacial (McNaughton et al. 1996).

Se piensa que la formación hipocampal participa en la formación de una representación interna abstracta del contexto en el que se encuentra el individuo. Tal codificación espacial, funciona como la referencia general interna que permite al animal organizar su conducta de navegación (McNaughton et al. 1996). Por consiguiente, podemos decir que las células de lugar realizan las siguientes funciones principales:

- I. Son parte del procesamiento de la información espacial.
- II. Constituyen el sustrato neuronal para el reconocimiento de un entorno aprendido.
- III. Se integran junto con la información motora para la ejecución de una conducta de navegación eficiente.

De esta forma, el funcionamiento del hipocampo y las células de lugar que se encuentran en éste, son un ejemplo de una red neuronal encargada de una función cognoscitiva compleja bien delimitada. Alude a problemas de cómo el sistema nervioso representa la información del entorno y reconoce un ambiente particular. Cuestión importante si consideramos que lo aprendido es asociado con el contexto espacial, de tal forma que el recuerdo de la conducta se ve facilitado y es más preciso cuando se evoca en el contexto en el que se aprendió (Godden y Baddely, 1975).

#### ***4. La Codificación del Contexto Espacial***

Respecto a la forma en que se codifica el contexto espacial aun no es totalmente claro como se realiza, pues se ha observado que se define principalmente de acuerdo a diversas características, entre las cuales se encuentran las siguientes:

- 1) En términos de las pistas estáticas del fondo (O'Keefe y Dostrovsky, 1971).
- 2) Por la forma del ambiente (Leutgeb et al. 2007).

- 3) Por las demandas conductuales exigidas a los animales para conseguir el refuerzo (Skaggs y McNaughton, 1998; Wood, Dudchenko, Robitsek y Eichenbaum, 2000).

En un estudio reciente sobre la manera en que se codifica el contexto espacial (Leutgeb et al. 2007), se utilizó una caja de exploración a la cual se le iba haciendo modificaciones en la forma de su perímetro. Desde una forma totalmente cuadrada hasta una totalmente redonda, pasando por modificaciones con las propiedades intermedias entre estas dos características. Se registró electrofisiológicamente la actividad de células de lugar en la región hipocampal de CA3. Se encontró que éstas disminuyen su tasa de disparo paulatina y directamente proporcional a la magnitud de los cambios en el ambiente. Una célula que dispara con alta frecuencia en el ambiente cuadrado, reduce su tasa de disparo hasta quedar silente conforme el ambiente se va haciendo redondo; y viceversa (Figura 6). Así, parece que las células de CA3 codifican la información espacial y reconocen un ambiente como similar por la forma del mismo; lo cual se observó por la correlación entre la tasa de disparo y la magnitud de los cambios detectados en el ambiente de exploración. Asimismo, discriminan un ambiente como novedoso reclutando un nuevo grupo de células para representar las nuevas características espaciales. Las células del giro dentado, a diferencia de las de CA3, no modifican su tasa de disparo de manera directamente proporcional a los cambios en el ambiente, sino que, conforme el entorno cambia, responden generando nuevos campos de lugar (Figura 6) (Leutgeb et al. 2007).

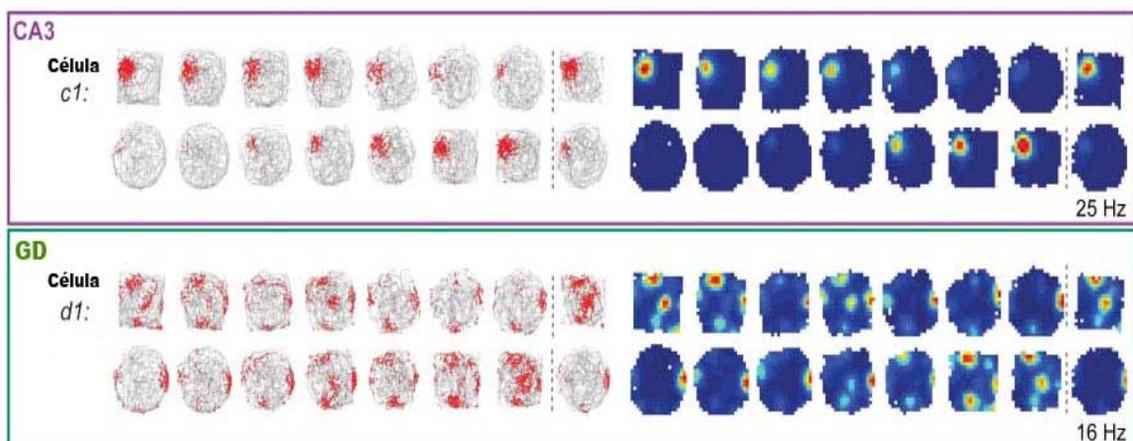


Figura 6. En la parte superior, se muestra la variación de la frecuencia de disparo de una neurona en el área de CA3 del hipocampo. Se observa que mantiene su campo receptivo espacial pero disminuye la magnitud de su respuesta directamente proporcional a los cambios en el ambiente de exploración; respondiendo máximamente al ambiente cuadrado y disminuyendo paulatinamente su tasa de disparo conforme el ambiente se torna redondo. En la zona inferior, se muestra la variación de la frecuencia de disparo de una neurona en el área del giro dentado. Nótese como esta célula, a diferencia de la de CA3, no varía su tasa de disparo, sino que modifica su campo receptivo espacial conforme el ambiente cambia de forma (modificado de Leutgeb et al. 2007).

Por otro lado, una investigación diseñada con un laberinto en cruz (Smith y Mizumori, 2006) definió dos contextos no por un cambio en el ambiente sino por la ubicación del reforzador. Cada contexto requería de los sujetos el recuerdo de una ruta diferente en el mismo laberinto, para localizar el lugar donde se encontraba el refuerzo. Por medio de una técnica electrofisiológica, se registraron neuronas del hipocampo mientras las ratas aprendieron a localizar un reforzador (en este caso agua) en dos lugares diferentes del mismo ambiente. Se hicieron registros comparando una sesión llamada de refuerzo al azar, en la que se definió la línea base de actividad neuronal; y otra sesión luego de que los animales alcanzaron un rendimiento asintótico en el entrenamiento, para dos recorridos definidos por la posición de inicio del ensayo y el lugar donde estaba el reforzador. Las sesiones estaban compuestas por dos bloques de ensayos, cada cual con solo uno de los recorridos. Los bloques se espaciaban por un periodo de 30 seg. en el que se sacaba al animal del laberinto y se lo colocaba en una plataforma en la oscuridad, lo cual era señal del cambio de recorrido. Se encontró que neuronas que presentaban un campo de lugar estable para ambos bloques de ensayos en la sesión de refuerzo al azar, modificaban sus campos de lugar según el animal tuviera que realizar uno u otro de los dos recorridos luego del entrenamiento (Figura 7).

Así, las neuronas piramidales del hipocampo desarrollaron un patrón de encendido espacial altamente diferenciado para los dos contextos (Smith y Mizumori, 2006). Tanto la dirección de viaje y el camino específico seguido por las ratas mostraron tener una influencia sobre el disparo espacial de las neuronas del hipocampo. Por tanto, estas neuronas exhiben un disparo específico al contexto espacial dependiendo de las demandas conductuales que los animales tiene que ejecutar para conseguir el refuerzo. Esto resulta acorde con otros descubrimientos, que han mostrado que una recompensa

puede servir como una pista saliente de orientación particular. Por lo cual mover el lugar donde se halla el refuerzo provoca que los campos de lugar se modifiquen, de acuerdo a la nueva posición donde se halla la recompensa (Kobayashi, Tran, Nishijo, Ono y Matsumoto, 2003)

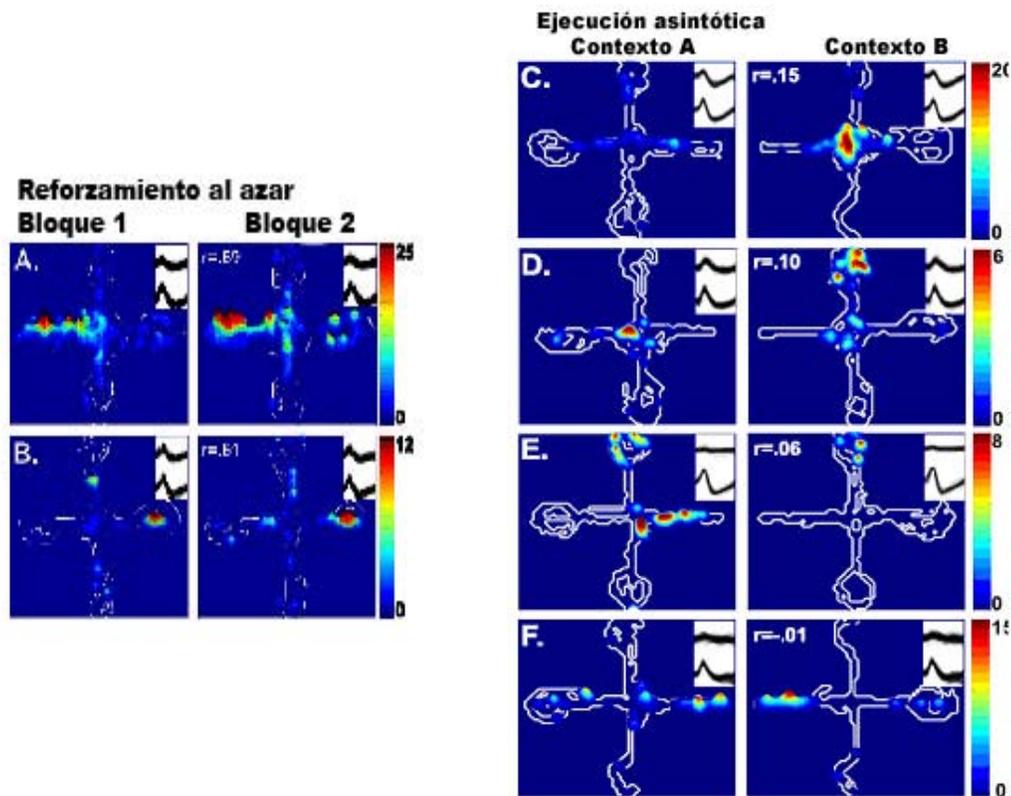


Figura 7. A y B ilustra el patrón de encendido de dos neuronas registradas durante la primera y la segunda mitad de la sesión de refuerzo al azar. (Bloque 1 y Bloque 2). Para cada ensayo, el refuerzo se colocó al final de los brazos designados al azar y la rata comenzó el recorrido en uno de los tres brazos no reforzados. De C a F se ilustran los patrones de encendido específicos al contexto, de las neuronas registrada durante la ejecución asintótica luego del entrenamiento. Se observa el disparo neuronal durante la primera mitad de la sesión (contexto A), cuando la recompensa estaba siempre colocada en el brazo este, así como durante la segunda mitad (contexto B), cuando la recompensa estaba siempre colocada en el brazo oeste. Nótese que los patrones de encendido fueron similares en los dos bloques de ensayos de la sesión de refuerzo al azar (A, B), pero fueron marcadamente diferentes en los dos bloques de ensayos (contextos) durante la ejecución asintótica (C-F) (modificado de Smith y Mizumori, 2006)

Considerando las anteriores investigaciones, es preciso distinguir dos aspectos de la codificación de la información espacial:

- I. El ambiente de exploración, que constituye las características físicas del lugar donde el animal explora. Tanto las características internas

referidas al área donde el animal puede explorar, como las externas o distales que alcanza a percibir

- II. El contexto espacial, que es la codificación o representación del ambiente de exploración de acuerdo a las demandas conductuales que el animal tiene que ejecutar para conseguir un refuerzo.

El hipocampo representa el entorno tanto por las pistas en el ambiente como por las demandas conductuales de la tarea (O'Keefe y Dostrovsky, 1971; Smith y Mizumori, 2006). La manera en cómo lo hace permanece aun poco conocida, justamente por ello nuestro trabajo pretende colaborar para aportar evidencia al respecto. Si embargo, se han propuesto algunas nociones de cómo el hipocampo procesa el contexto espacial:

- Comparando los patrones de actividad neuronal generados por la información entrante, con los producidos y almacenados por experiencias anteriores. Cuando el patrón generado por la información entrante es muy similar al que ya se tiene previamente, entonces el sistema completa las diferencias y reconoce la información como ya almacenada; cuando la información entrante es significativamente distinta, entonces el sistema separa los patrones y discrimina la información como diferente o novedosa (Marr, 1971).
- Se ha supuesto que los ensambles de CA3 cambian bajo las mismas circunstancias, de una modalidad que se especializa en completar patrones a una modalidad de separación conforme el ambiente se va transformando de una forma a otra (Guzowski et al. 2004). Sin embargo, existe evidencia contradictoria pues se ha visto que un cambio en las pistas distales a veces es suficiente para inducir un patrón de separación y a veces no.

### ***5. El Mapeo de la Actividad de Poblaciones Neuronales; CatFISH***

Aunque los estudios con técnicas electrofisiológicas han aportado evidencia relevante de cómo el hipocampo procesa la información (Leutgeb et al. 2007; Skaggs y McNaughton, 1998; Smith y Mizumori, 2006), es preciso complementar los datos aportados valiéndonos de técnicas que mapeen la

actividad de poblaciones neuronales más amplias. Las técnicas electrofisiológicas, aunque tienen la ventaja de identificar unidades celulares con la mejor resolución temporal, hacen muy difícil registros de grandes poblaciones de neuronas. Recientemente se ha desarrollado un método de imagenología denominado catFISH, o análisis compartamental de la actividad neuronal temporal basado en hibridación *in situ* e inmunohistoquímica fluorescente (Guzowski et al. 1999; Petrovich, Holland y Gallagher, 2004; Ramírez-Amaya et al. 2005; Vazdarjanova, McNaughton, Barnes, Worley y Guzowski, 2002).

La identificación del gen de expresión inmediata Arc o Arg 3.1 (Lyford et al. 1995; Link et al. 1995) permitió el desarrollo de catFISH (Guzowski et al. 1999). Arc es un gen con características muy peculiares. De ellas, lo importante para catFISH es que se expresa rápidamente a consecuencia de fuerte actividad neuronal (Lyford et al. 1995; Link et al. 1995). De tal forma que 5 minutos después de la actividad podemos ver acumulación del transcrito en el núcleo como dos puntos que representan los dos alelos del gen, luego tarda entre 20 y 30 min para translocarse y se puede ver en el citoplasma rodeando al núcleo de la célula (Figura 8). A consecuencia de estimulación máxima, como choques electroconvulsivos, se ha observado la expresión de Arc en prácticamente todo el cerebro, lo que en principio sugiere se puede realizar un mapeo de la actividad neuronal de todo el encéfalo. Esto permite comparar la actividad particular de distintas estructuras cerebrales activadas por un mismo evento de estimulación (Burke et al, 2005). Estas características permiten identificar grupos de células activadas por un evento inmediato, cuando Arc se localiza en el núcleo (Figura 8a) y células activadas por un evento que ocurrió 30 min. antes, cuando se ve Arc en el citoplasma (Figura 8b). Las células que presentan Arc tanto en el núcleo como en el citoplasma (Figura 8c) habrán sido activadas por ambos eventos.

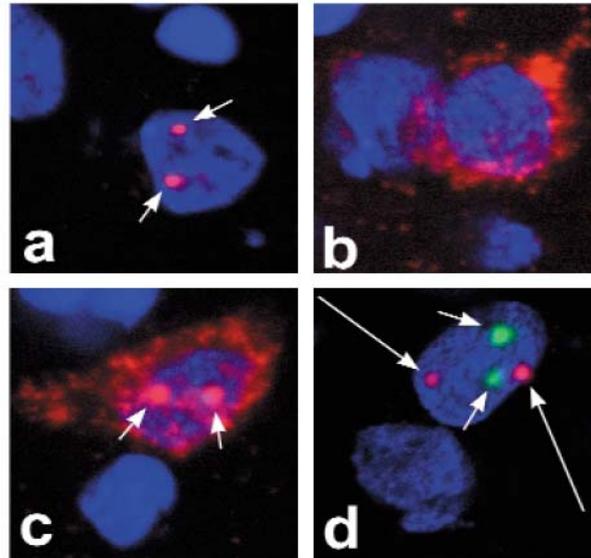


Figura 8. Hibridación in situ fluorescente para Arc (en Rojo) y Homer1a (en Verde), el núcleo de las células está teñido con DAPI (Azul). La presencia de Arc en el núcleo (a) se debe a expresión inducida aproximadamente 5 min. antes de colectar el tejido, mientras que la presencia de Arc en el citoplasma (b) se debe a actividad que ocurrió 30 min. antes. La co-localización de Arc en el núcleo y el citoplasma (c), u Homer 1a junto con Arc en el núcleo (d) se debe a que la célula se activó en ambas ocasiones; esto se debe a que el tiempo de transcripción de Homer 1a dura aproximadamente el mismo tiempo en que el transcrito de Arc tarda en llegar al citoplasma (modificado de Guzowski et al. 1999).

La misma proporción de células que presentan actividad electrofisiológica de células de lugar en un ambiente determinado, expresa Arc en las mismas condiciones conductuales (Barnes, McNaughton, Mizumori, Leonard y Lin, 1990; McNaughton et al. 1994; Qin, McNaughton, Skaggs y Barnes, 1997). Esto es, 40% de las células en CA1, 20% en CA3 y 50% en la corteza parietal expresa Arc a consecuencia de la exploración (Vazdarjanova et al. 2002; Ramírez-Amaya et al. 2005). El método de catFISH utiliza microscopía confocal para la obtención de las imágenes, de tal manera que el análisis se realiza en apilados de imágenes lo que permite una visualización en 3D de los grupos de células de interés. Gracias a ello, es posible realizar una cuantificación precisa de las células que expresan los genes minimizando errores o problemas estereológicos. Esto permite evaluar la estabilidad de la red neuronal cuando se trata de dos eventos semejantes, en donde se espera que el mismo conjunto de células se activen; o el grado de re-mapeo, en el que un conjunto de células es capaz de discriminar dos eventos diferentes (Guzowski et al. 1999; Vazdarjanova et al. 2002; Vazdarjanova y Guzowski, 2004) (Figura 9).

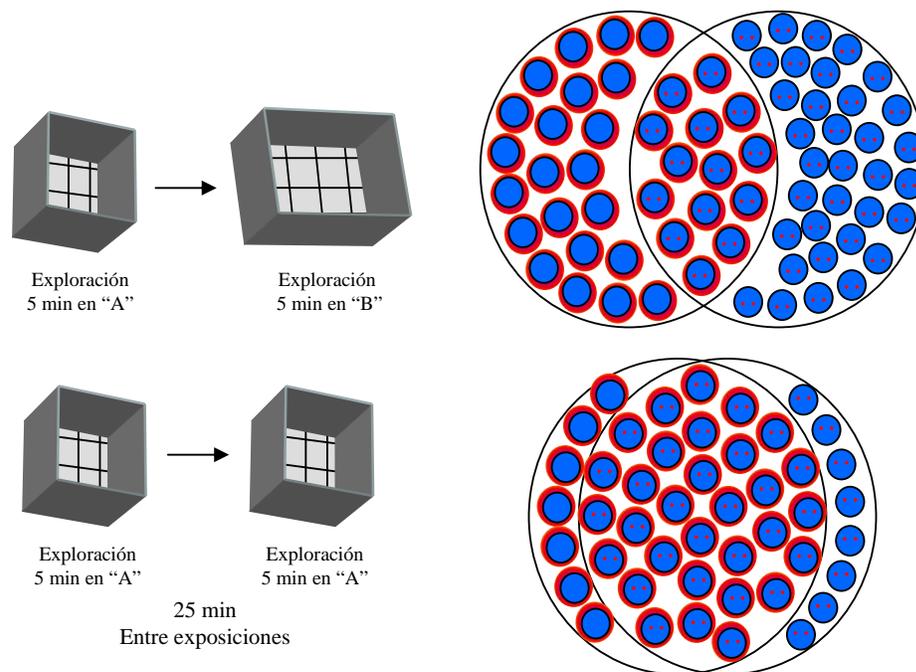


Figura 9. En la parte superior se observan conjuntos de células que responden de manera independiente a dos eventos de exploración diferentes (re-mapeo de la red). En la parte inferior se representa al conjunto de células que responde de manera estable a dos eventos de exploración semejantes (estabilidad de la red). Las células con marca dentro del núcleo representan las células que responden al segundo evento conductual, mientras que las células con marca en el citoplasma son células que respondieron al primer evento conductual. Las células con ambas marcas respondieron a ambos eventos.

## 6. *CatFISH y el Mapeo de la Codificación del Contexto Espacial .*

En un estudio que utilizó CatFISH para mapear la actividad neuronal, se sometió a ratas a dos exploraciones espaciales, de tal marea que entre la primera y segunda exploración se modificaban distintas características internas o externas del ambiente de exploración (Vazdarjanova y Guzowski, 2004). Todos los animales fueron expuestos al mismo ambiente en la primera exploración, el cual era una caja cuadrada con 5 objetos redondos en posiciones específicas y una pista visual externa de la habitación. El ambiente de la segunda exploración fue el mismo para un grupo, mientras que para otros grupos variaba. Desde ambientes relativamente similares al primero, hasta uno drásticamente distinto según las siguientes modificaciones: cambio de los objetos internos, variación del acomodo de los objetos internos, variación de las pistas externas y variación a la vez de pistas externas e internas (Figura 10).

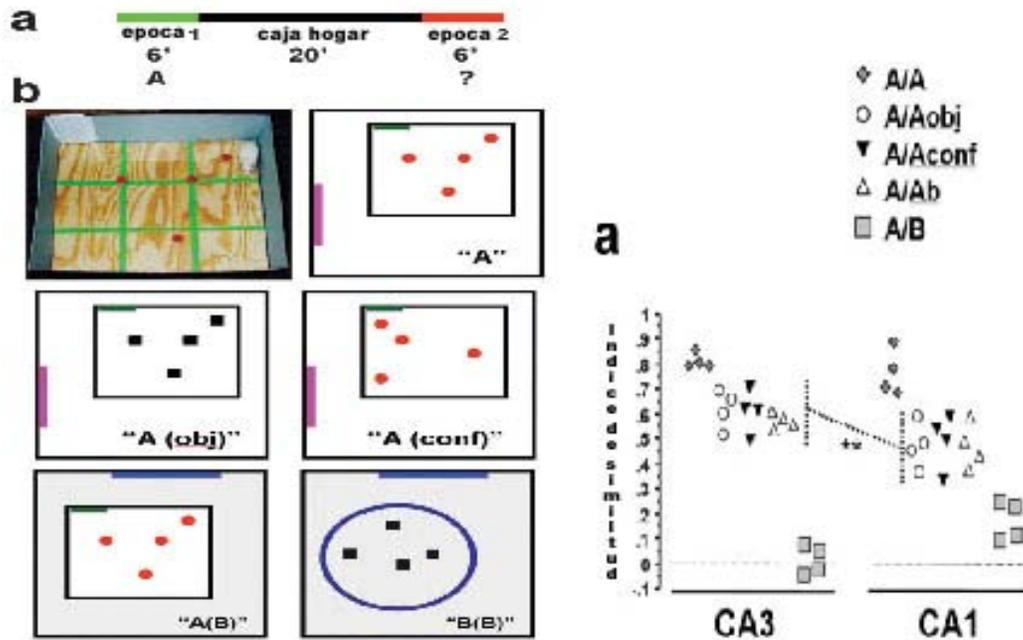


Figura 10.- Del lado izquierdo, en a, se muestra el tiempo que duró cada exploración y el tiempo de reposo entre ambas. En b, se muestra en imagen el primer ambiente de exploración y esquemas de los ambientes utilizados en la segunda exploración para los distintos grupos: el "A", que no presentaba ninguna modificación; el "A(obj)", en el que variaba la forma de los objetos internos; "A(conf)", variación del acomodo de los objetos internos; "A(B)", modificación del ambiente externo; y por último, "B(B)", variación de ambiente interno y externo. En el lado derecho una gráfica que muestra la comparación de los puntajes de similitud entre CA1 y CA3, un índice que indica qué tanto la red presenta estabilidad o remapeo (el valor de 1 indica el mayor grado de estabilidad de la red y un puntaje de 0 el mayor grado de remapeo). Parece que CA3 separa mejor cuando los ambientes son drásticamente distintos, en cambio CA1 genera remapeos parciales que parecen codificar las diferencias sutiles entre los ambientes de exploración (modificado de Vazdarjanova y Guzowski, 2004).

Los resultados obtenidos en poblaciones de neuronas del hipocampo, demostraron que estas participan en la discriminación de las características de los dos entornos. Las mismas células que responden a la primera exploración responden a la segunda si se trata del mismo ambiente (estabilidad de la red), mientras que si el ambiente cambia otro grupo de células es el que responde (remapeo de la red). También se encontró que CA3 establece un remapeo más notable que el que establece CA1 cuando las condiciones en el ambiente varían drásticamente (cuando se cambiaban las pistas internas y externas). CA1 parece discriminar mejor cuando los cambios en el ambiente son menos drásticos (Vazdarjanova y Guzowski, 2004) (Figura 10).

En otro estudio similar (Burke et al. 2005), sometieron a un grupo de ratas a dos exploraciones con un mismo recorrido espacial pero en dos ambientes diferentes. El ambiente era una misma caja de forma rectangular, pero en una habitación para la primera exploración y en otra habitación para la segunda. A otro grupo se les sometió igual a dos exploraciones en la misma caja, pero en una dirección de recorrido para la primera exploración y en la dirección inversa para la segunda (Figura 11). Se evaluó la actividad de las siguientes regiones del cerebro: la región de CA1 en el hipocampo, la corteza parietal posterior y la corteza gustativa. Se observaron diferencias entre las distintas regiones, por medio de un índice que permite cuantificar el grado de estabilidad y remapeo de la red (índice de similitud). Los resultados (Figura 11) mostraron que el área de CA1 discrimina mejor en las dos condiciones experimentales en comparación con las otras estructuras evaluadas. A su vez, las capas superficiales de la corteza parietal y de la corteza gustativa discriminan ambas condiciones experimentales, a diferencia de sus homólogas superficiales que no lo hacen. Excepto la capa profunda de la corteza parietal, que discrimina igual que la superficial solo en lo que se refiere a la condición de mismo contexto-diferente recorrido (Burke et al. 2005). Esta investigación resulta relevante para nuestro trabajo, pues evaluó la respuesta del hipocampo cuando el ambiente se mantiene estable pero cambia la ejecución conductual que el animal tiene que realizar para conseguir el refuerzo. No obstante, puesto que se realizó con una caja de exploración el recorrido exigido a los animales era relativamente simple. Se sabe que la respuesta de las células de lugar en contextos de este tipo, relativamente sencillos, tiende a ser unidireccional (O'Keefe, 1999).

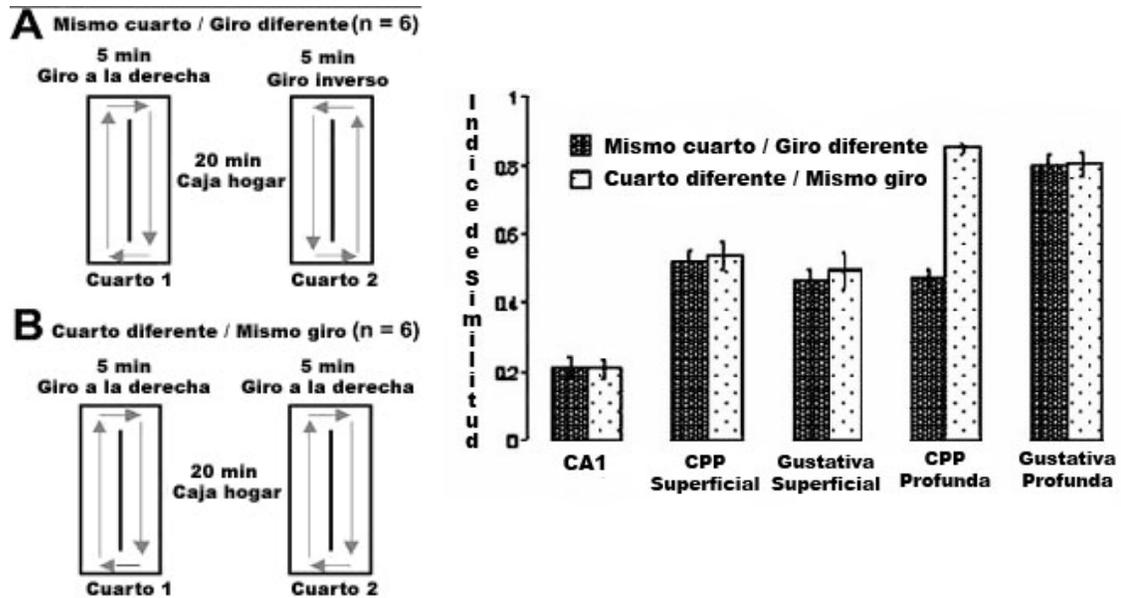


Figura 11. En el recuadro de la izquierda se muestra el diseño conductual de los dos grupos. En A al que se le introdujo al mismo ambiente de exploración en ambas ocasiones, pero con una dirección de recorrido para la primera y la dirección inversa para la segunda; en B al que se le sometió al mismo recorrido para ambas exploraciones pero en dos habitaciones diferentes. A la derecha, la comparación de los puntajes de similitud entre las distintas estructuras neuronales. Se observa que el área de CA1 discrimina mejor en las dos condiciones experimentales en comparación con las otras estructuras evaluadas. A su vez, las capas superficiales de la corteza parietal y de la corteza gustativa discriminan ambas condiciones experimentales, a diferencia de sus homologas superficiales que no lo hacen; excepto la capa profunda de la corteza parietal, que discrimina igual que la superficial solo en lo que se refiere a la condición de mismo contexto-diferente recorrido (modificado de Burke et al. 2005).

## 7. El Laberinto Radial y la Codificación del Contexto Espacial

Tomando en cuenta que el trabajo de Smith y Mizumori (2006) se realizó con un laberinto en cruz, parece válido suponer que los laberintos son instrumentos más aptos para establecer modelos conductuales que impliquen las demandas de la tarea como parte central de la codificación del contexto. Un tipo de estos laberintos es el laberinto radial. Es un dispositivo que consiste en un círculo o base central rodeado (o radiado) de múltiples brazos (hay de 3, 5, 8, etc.) o pasillos (Figura 12).

En el contexto del aprendizaje de discriminación con este laberinto, se han diseñado tareas en los que se entrena a ratas a discriminar entre distintos

recorridos, valiéndose de estímulos que indican al animal cuales son los brazos donde se halla el reforzador (el cual es, por lo regular, comida o agua).

En un experimento (McDonald y White, 1993), se entrenó a ratas para que aprendieran una asociación entre un estímulo particular (en este caso luz) y una respuesta motora (recorrido por pasillos específicos) que fue repetidamente reforzada con comida. Se encontró que este tipo de tarea requiere de un aprendizaje estímulo respuesta y se ha visto que la eficacia de la ejecución es dependiente del estriado dorsal, pero no de la amígdala o del hipocampo (McDonald y White, 1993). Así mismo, se ha demostrado que las ratas entrenadas en un ambiente adquieren incidentalmente una asociación inhibitoria específica al contexto. Si se les enseña a recorrer los brazos que están alumbrados, es muy difícil que en el mismo ambiente los animales logren revertir lo aprendido y ahora vayan a los brazos no alumbrados, aunque ahora sean estos los que se refuercen (McDonald, Ko, Hong, 2002). Esta asociación inhibitoria no es necesaria para el aprendizaje de discriminación visual, pero es un factor poderoso de inhibición para el aprendizaje reversivo en el contexto de entrenamiento original. Un dato importante es el hecho de que las ratas con lesiones en el hipocampo no adquieren la asociación inhibitoria específica al contexto (McDonald et al. 2006).

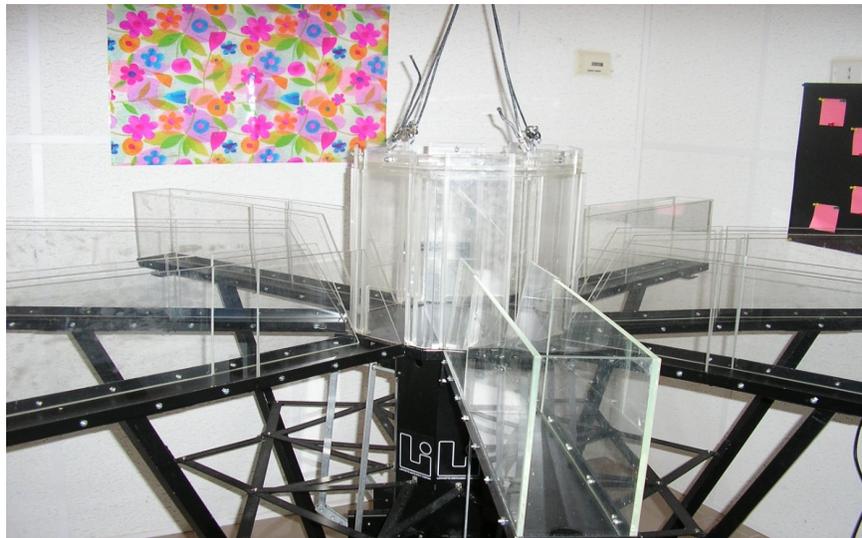


Figura 12. Imagen del laberinto radial usado en nuestro estudio. Se puede observar el sistema de puertas tipo guillotina conectadas a un sistema de amarres, por el cual se pueden abrir o cerrar para permitir el acceso a todos o a cualquiera de los 8 pasillos sin que el investigador tenga la necesidad de estar presente en la habitación. En el fondo de la imagen se pueden ver dos de los carteles que funcionan como pistas espaciales externas, que resultan, dada la homogeneidad del interior del

laberinto, los principales rasgos en el entorno que suministran información para que los animales se orienten en el conjunto de pasillos del laberinto.

El laberinto radial es un instrumento que permite diseñar distintas tareas de discriminación, en las que el contexto puede variar no solo si se modifican las pistas espaciales sino también de acuerdo a las demandas de la tarea. Sin embargo, en los estudios citados en los últimos párrafos (McDonald et al. 2002; McDonald et al. 2006) se valieron de técnicas de lesiones para explorar el procesamiento que llevan a cabo las estructuras neuronales. Esto tiene la desventaja de obtener información de manera indirecta (ya que a partir del daño y los efectos conductuales se infiere la función de la estructura neuronal) y no existe la una resolución anatómica celular.

Tomando en cuenta esta limitación, nuestro trabajo pretende resolverla de la siguiente manera:

- 1) Aprovechando las posibilidades que ofrece el laberinto radial para diseñar tareas de discriminación, que involucren estímulos discretos que sirvan de señal a los animales para ejecutar un recorrido reforzado.
- 2) Evitando las desventajas que conllevan las técnicas de lesión con ayuda de catFISH, que permite estudiar con muy buena resolución anatómica los grupos de neuronas que codifican la información del contexto espacial.

Así, pretendemos estudiar la manera en que los sistemas celulares en el hipocampo procesan los cambios en el contexto de acuerdo a las demandas de la tarea, cuando el ambiente se mantiene inalterado. Lo cual permitirá aportar evidencia de cómo los ensambles neuronales reconocen y discriminan un contexto como familiar o novedoso.

A su vez establecer un modelo conductual adecuado junto con una técnica de mapeo celular precisa, podría permitir el estudio a largo plazo diversas propiedades de los ensambles celulares. Por ejemplo, la propiedad de

completamiento dinámico (Sakurai, 1999) en la que la activación de un subconjunto del ensamble puede ser suficiente para activar a todo el ensamble. Si logramos que los animales asocien un recorrido con un tono específico, luego del entrenamiento la presentación del tono puede ser suficiente para evocar la activación del ensamble completo que representa el recorrido.

## **HIPÓTESIS**

Si la construcción de una representación neuronal del contexto espacial en el hipocampo integra la información conductual, esperamos que las poblaciones neuronales de CA1 y CA3 codifiquen cada uno de los dos programas de reforzamiento, aun cuando ambos se den en el mismo ambiente de exploración.

## **OBJETIVOS**

*General:*

Estudiar la actividad neuronal del hipocampo para discriminar entre diferentes programas de reforzamiento en un mismo ambiente espacial.

*Particulares:*

1.- Desarrollar una tarea de discriminación en el laberinto radial de 8 brazos, en la que las ratas aprendan a distinguir entre dos programas de reforzamiento ubicados bajo un mismo ambiente de exploración.

2.- Mediante el uso de CatFISH, identificar los grupos de células nerviosas que responden a cada una de los recorridos, en las regiones neuronales de CA1 y CA3 del hipocampo.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Habiendo establecido un entrenamiento para la discriminación de dos programas de reforzamiento en un mismo laberinto radial bajo el mismo ambiente espacial ¿Cómo codificarán las estructuras del hipocampo, en esta caso CA1 y CA3, la discriminación entre los dos programas de reforzamiento inducida por el entrenamiento conductual?

## **ANIMALES, MATERIALES Y METODOS**

Se utilizaron seis ratas macho con tres meses de edad de la cepa Wistar, confinados individualmente con agua libremente disponible y alimento restringido (de tal forma que se mantuvieran al 90% de su peso inicial). Los grupos de discriminación (A-B) y de reconocimiento (A-A) se conformaron por dos animales cada uno. Para la condición de control experimental y control-control se utilizó un individuo para cada una.

### *A) Aparato de Entrenamiento Conductual.*

El dispositivo de prueba es un laberinto radial de ocho brazos, cada uno de los cuales tiene un largo de 70 cm. con paredes de acrílico de una altura de 20 cm. elevado sobre el piso por 90 cm. con un centro de 30cm de diámetro y un sistema de puertas de acrílico tipo guillotina.

### *B) Aparato de Registro y Datos Conductuales de Interés.*

Para el análisis del comportamiento y su progresión en la consolidación del aprendizaje, se utilizó un sistema de video grabación a color en tiempo real (SMART). Este puede aportar datos de la velocidad del recorrido y de su graduación en el tiempo, es decir, si pasa de rápido a lento o viceversa, en que zona del laberinto se efectúa y otros caracteres (como el erguimiento, giros a la derecha, a la izquierda, giros de 180% etc.) que permiten hacer una caracterización conductual precisa del proceso de aprendizaje. Se realizó un registro cuantitativo del tiempo en que los animales obtuvieron los tres reforzadores en cada ensayo, así como de los errores (entradas a brazos no reforzados) que cometieron a lo largo de los días de entrenamiento. Además, se grabaron en dvd todas las sesiones, para tener la posibilidad de a futuro registrar otras características del entrenamiento que hayan pasado inadvertidas o no hayan sido consideradas de interés en el registro inicial.

### *Programas de Reforzamiento.*

A.- Emisión de un tono de 2000 Hz. asociado a la presencia del reforzador (que consiste en  $\frac{1}{4}$  de dona de cereal fruitloop®) en los brazos 1, 4 y 6 del laberinto radial.

B.- Emisión de un tono de 500 Hz. asociado a la presencia del reforzador en los brazos 3, 5 y 8 del laberinto radial.

### *C) Procedimiento general de la sesión de entrenamiento.*

Puesto que la tarea de discriminación es compleja, el entrenamiento se realizó por aproximaciones sucesivas, en las que los animales adquirieron progresivamente el aprendizaje necesario para discriminar los dos programas de reforzamiento. Todas las fases o aproximaciones del entrenamiento se basan en un procedimiento elemental del ensayo, al que se le añadieron o quitaron ciertas partes (las cuales se especificarán abajo) según fue avanzando el experimento. Una sesión de entrenamiento consistió en la repetición de varios ensayos. La cantidad de ensayos por sesión, así como el orden en que se presentaron el programa A o B de reforzamiento en los bloques por sesión, se especifica más adelante según la etapa del entrenamiento. El procedimiento general de la sesión fue el siguiente:

Se lleva a cada rata desde el cuarto de alojamiento hasta el cuarto de prueba y se introduce en el centro del laberinto cuando éste tiene las puertas cerradas. Se suena el tono e inmediatamente después se abren las puertas al tiempo que se activa el programa de registro (SMART). El ensayo termina cuando la rata obtuvo los tres reforzadores de los brazos en que se encontraron, momento en el cual se detiene el programa de registro. El registro en video se para hasta que el animal llega al centro del laberinto. Sin sacar a la rata del centro, se pone reforzador en los brazos que corresponda se vuelve a sonar el tono y se abren las puertas; así sucesivamente cuatro veces, lo que se considera un bloque de ensayos. Una vez dado el bloque, se saca al animal y se lo lleva a su

caja en la habitación de alojamiento. Entre cada individuo, se limpia la superficie del laberinto con una solución de agua con ácido acético al 4%.

#### *D) Aproximaciones del Entrenamiento Conductual.*

##### *1.- Manipulación previa.*

Las ratas se manipularon diariamente por 6 días antes de someterlas al entrenamiento conductual. La manipulación consiste en tomar al animal, envolverlo en una toalla blanca seca y acariciarlo por un intervalo de aproximadamente 5 minutos. El objeto de esta manipulación es que se acostumbren al contacto con el investigador, lo que ayuda a reducir el estrés y disminuir la expresión del gen Arc asociada al contacto del animal con el investigador.

##### *2.- Sesión de reconocimiento.*

La primera fase del entrenamiento consistió en introducir a las ratas en el laberinto radial habiendo puesto comida y permitido la entrada a todos los brazos. Con el objeto de que exploraran y reconocieran el ambiente, la disponibilidad del reforzador y a comer de los lugares donde se encontraba. Esto se hizo por cinco días consecutivos y cada día se hicieron dos bloques de entrenamiento para cada animal, tal como se explicó arriba. Se llevó a cabo una sesión por la mañana y otra por la tarde con las mismas características.

##### *3.- Sesión forzada de condicionamiento.*

Se colocó alimento solo en los brazos que corresponden con el tono que se presentó (según los programas de reforzamiento mencionados). La particularidad aquí es que cuando se abrieron las puertas del centro del laberinto, solo estuvieron abiertas aquellas que tenían reforzador, de tal manera que se forzó a los animales para aprender el recorrido correcto del programa. La sesión de entrenamiento constó de un bloque diario para cada programa por 6 días.

##### *4.- Sesión libre de condicionamiento.*

Aquí igual que en la sesión forzada solo se puso reforzador en los brazos designados por los programas de reforzamiento, solo que ahora se abrieron todas las puertas permitiendo el acceso a los ocho brazos del laberinto. La sesión de entrenamiento constó de un bloque de ensayos para cada programa diariamente por 20 días; aplicando primero el programa A y luego el B.

*5.- Sesión de cambio de turno para el programa de reforzamiento.*

En esta fase se cambió el momento de exposición a los programas de reforzamiento, si primero se les daba un bloque con el programa A y luego un bloque con el programa B, ahora se les invirtió el orden, primero dándoles el B y luego el A. La sesión de entrenamiento constó de un bloque de ensayos para cada programa diariamente por 6 días.

*6.- Sesión de condicionamiento al azar.*

Se sometió a los animales a presentaciones de un bloque para cada uno de los programas, seleccionando al azar el orden de sucesión de uno y otro (A-A, A-B, B-A, B-B) a lo largo de 8 días. con el propósito de que consoliden la asociación entre el recorrido y el tono, sin importar el orden de sucesión dado en días previos. Aunque se variaron al azar la presentación de los programas, cada bloque estaba constituido, como se venía haciendo, por ensayos con un solo programa.

*7.- Sesión de prueba.*

Se realizó una última sesión presentando dos bloques de ensayos (cada uno con un solo programa de reforzamiento), dejando al animal en su caja-habitación entre ambos por un periodo de 25 min. De tal forma que existiese el suficiente tiempo para que el ARNm de Arc pudiera trasladarse al citoplasma. Se les presentó a los animales los programas de reforzamiento divididos en dos grupos: grupo de reconocimiento (sucesión A-A) y grupo de discriminación (sucesión A-B).

*E) Diseño de los Grupos:*

Control-control

No entrenado y sacrificado sin exploración (n=1).

- Control-experimental      Entrenado y sacrificado sin exploración (n=1).
- Reconocimiento A-A      Exploración sucesiva con el programa A (n=2).
- Discriminación A-B      Exploración programa A seguida por programa B (n=2).

*F) Bloqueo de cerebros y criosección.*

Después del bloque de ensayos con el segundo programa de reforzamiento, se sacrificó inmediatamente a los animales por decapitación. Los cerebros se extrajeron rápidamente (en aproximadamente 2 min) y se congelaron en una solución de isopentano colocada en un baño María de etanol y hielo seco. Los cerebros se cortaron a la mitad por la línea media sagital, se cortaron a la altura del cerebelo y así mismo se removió la región frontal. Cada hemisferio se colocó en un molde de plástico, donde los hemisferios izquierdos de los animales de todos los grupos fueron incluidos para ser bloqueados con OCT. Los bloques luego se cortaron en un crióstato a  $-18^{\circ}\text{C}$  en secciones de 20  $\mu\text{m}$ . de grosor y montados en laminillas Súper Frost (VWR). Las laminillas con las secciones de cerebro se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta que fueron procesadas para la hibridación in situ del gen Arc.

*G) Hibridación in-situ con fluorescencia (FISH).*

Se seleccionaron cortes de la porción medial del hipocampo, se les aplicó un procedimiento de hibridación in situ para detectar el ARNm de Arc (Vazdarjanova y Guzowski, 2004). Este proceso constó, a groso modo, de los siguientes pasos: se fija y se trata el tejido con acetona, metanol y acético anhídrido. Después de un paso de prehibridación, se hibridiza con una sonda de ARN antisentido para el ARNm de Arc (100ng/laminilla) marcada con digoxigenina. Las sondas se diluyen en buffer de hibridación (Sigma. St Louis MO) y se mantienen durante 16-18 hrs. a una temperatura de  $56^{\circ}\text{C}$ . Después

de la hibridación se realizan una serie de enjuagues incluyendo un paso en el que se aplica ARNasa A, para destruir la sonda y el ARN no hibridizado. Luego la sonda hibridizada se detecta mediante un procedimiento de inmunohistoquímica en el que los tejidos se incuban a 4 °C por 2 hrs. con anticuerpos anti-digoxigenina y anti-fluoresceína (se realizan en secuencia) conjugados con peroxidasa (Roche Products, Hertfordshire, UK). Estos anticuerpos se revelan con el sistema de amplificación TSA usando Cy3. El núcleo se tiñó con DAPI.

#### *H) Adquisición de imágenes (microscopía confocal).*

Se realizaron apilados de imágenes en el plano Z mediante el uso de un microscopio confocal modelo Zeiss LSM 510 NLO-meta equipado con 4 láseres. Utilizamos un láser multifotónico sintonizado a 730 nm. y un láser de helio/neón de 543 nm. Los parámetros de intensidad y contraste se establecieron usando secciones laminares tomadas de una rata del grupo control y se mantuvieron constantes en el resto de las secciones de cada laminilla. Se adquirieron 6 imágenes de cada una de las regiones hipocámpales de CA1 y CA3. Los bloques en el plano Z se fotografiaron con un objetivo de 40x el cual abarca un grosor de más o menos 20 µm.

#### *I) Análisis de las imágenes y conteo celular.*

El conteo se realizó en ciego, pues se cuantificó las células activadas sin saber en qué orden estaban acomodados los cerebros en las laminillas. Se tomaron en cuenta, del total de planos obtenidos para cada imagen, solo los planos útiles, de los cuales se descartan los que se localizan en los límites superior e inferior del apilado que no tuvieran una buena resolución. Luego se divide entre dos el número de planos útiles para obtener el plano medio, a partir del cual solo se consideran tres planos por encima y por debajo para el conteo. Esto con el objeto de que las células detectables se incluyan en la mayor cantidad de planos posibles y así se logre discernir con mayor fiabilidad si contienen o

no la tinción que se busca detectar. Los criterios estándares (que es preciso decir se calculan visualmente) para considerar una tinción como marca de actividad son los siguientes:

Arc Citoplásmico.- Tinción alrededor del 60% del núcleo.

Arc Nuclear.- Tinción en los dos alelos del gen por al menos 4 planos.

Arc Ambos.- Cuando se cumplen juntos los dos criterios mencionados.

Arc negativo.-Sin ninguna de los anteriores criterios.

De esta manera, los resultados pueden expresar el porcentaje de células activadas en determinado lapso temporal (de acuerdo al compartimento donde se halla la tinción), con relación al total de núcleos neuronales analizados por apilado de imágenes.

J) Análisis estadístico.

En cuanto a los resultados de la ejecución conductual en el laberinto radial, se cuantificaron la velocidad y los errores dados a lo largo de los días, los cuales se analizaron mediante un ANOVA de medidas repetidas. También se realizaron pruebas estadísticas de chi cuadrada para evaluar el progreso general de la adquisición del aprendizaje, comparando el rendimiento a lo largo de distintas semanas y en distintas fases de la adquisición de la tarea.

Para evaluar la expresión de Arc, se obtuvo la proporción de células que expresaron la tinción del ARNm del gen por condición experimental y se compararon estos datos entre los diferentes grupos utilizando ANOVA de una vía; la cual mide si hay o no diferencias significativas entre todos los grupos. Se utilizó la prueba de Bonferroni como poshoc para ver entre cuales grupos existían diferencias significativas. Para evaluar las diferencias de las estructuras neuronales, en cuanto a las capacidades para discriminar entre los dos programas, se utilizó el cálculo de un índice de similitud (Vazdarjanova y Guzowski, 2004). Este arroja un valor de la proporción en que se halla la tinción en los diversos compartimentos celulares (tinción nuclear, citoplasmática y ambas a la vez), con relación al total de células contadas por estructura neural.

Este valor es, por tanto, un índice de la estabilidad o el remapeo de la red que luego puede ser comparado entre las distintas estructuras.

## RESULTADOS

### 1. Del entrenamiento conductual

En lo que respecta al promedio de errores (Figuras 13 y 14), la prueba de ANOVA de medidas repetidas mostró una reducción significativa a lo largo del entrenamiento durante la fase de condicionamiento libre, tanto para el programa de reforzamiento A como para el programa de reforzamiento B ( $F=8.600$ ,  $p<.0001$  y  $F =16.859$ ,  $p<.0001$ , respectivamente, todos con 4gl). Esta reducción de los errores representa un índice de la mejora en la adquisición de la tarea y la consecuente discriminación de los recorridos en el laberinto. En la Figura 13, donde se observa el promedio de errores por todas las ratas cometidos para el programa A de reforzamiento, se puede observar que en el día 20 se da un pico que señala un incremento significativo ( $p<.0001$  en la prueba poshoc de Bonferroni) de la cantidad de errores. Este día se inicio la fase de cambio de turno, en la cual se realizo una inversión de la presentación de los programas de reforzamiento.

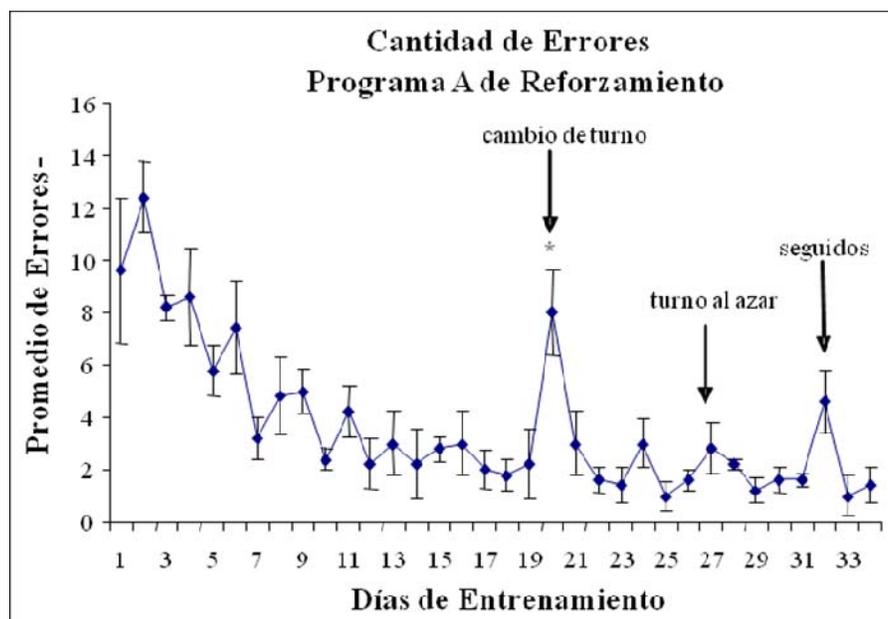


Figura 13. Muestra el promedio de errores por todas las ratas a lo largo del entrenamiento. Se señalan los días en que se modificó el entrenamiento. El día 20 corresponde al implemento de la fase de cambio de turno, en la que invirtió la presentación de los programas de A-B a B-A; para el día 27 se inició la fase de presentación al azar y se observa un incremento en los errores que es significativamente menor al

del día 20; en el día 32, se aplicaron los dos programas seguidos sin el tiempo habitual de reposo, se nota un incremento significativo de errores que es menor al del día 20 y mayor que el del día 27.

En la Figura 14 se muestra el promedio de errores para el programa B de reforzamiento, se pueden distinguir tres fases de adquisición de la tarea: una del día uno al cuatro, en la que se observa una disminución significativa de errores ( $p < 0.0001$ ); luego hay un periodo del día cuatro al once, en que la línea tiene subidas y bajadas pero se mantiene aproximadamente en un mismo nivel; para el día doce se observa otra disminución significativa ( $p < 0.0001$ ) que corresponde con el promedio que se da para el día veintisiete.

Si comparamos las dos gráficas de promedio de errores (la del programa A de reforzamiento con respecto al programa B) se puede notar que se comportan de manera distinta. En la del programa A se puede observar un decremento progresivo y continuo en el promedio de errores, que se ve interrumpido por un incremento significativo en el día 20, otro nimio para el día 27 (días de inversión los programas) y otro más notable, aunque menor que el del día 20, para el día 32, día en que se presentaron los programas seguidos sin el tiempo habitual de reposo entre ambos. A diferencia, en la gráfica del programa B no se dio una adquisición paulatina y continua de la tarea, sino en fases que no reflejan los cambios significativos del promedio de errores en los días en que se invirtieron los programas (el día 20 y el 27). La inversión de los programas no parece afectar la adquisición del programa B de reforzamiento, ya que la disminución de los errores continúa sin una alteración significativa.

En las Figuras 15 a la 18 se puede observar claramente, para ambos programas en la fase de condicionamiento libre, la elección diferencial de entrada a los brazos en la primera y la tercera semana de entrenamiento. En estas, se observa que la preferencia o probabilidad de entrada a los brazos del programa de reforzamiento presentado, es mayor que la probabilidad de entrada a los brazos reforzados del programa de reforzamiento no presente, y a su vez la probabilidad de entrada a estos últimos es mayor que la probabilidad de entrada a los brazos que nunca han sido reforzados.

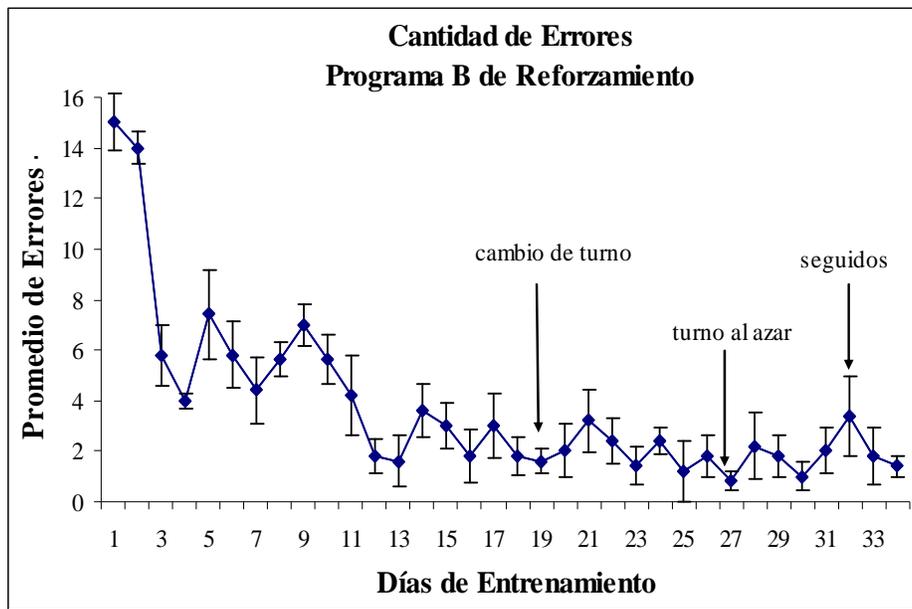


Figura 14. Muestra el promedio de errores por todas las ratas a lo largo del entrenamiento. Se señalan los días en que se modificó el entrenamiento. Se observan tres fases de adquisición de la tarea: una de los días 1 al 3 en los que se observa una disminución significativa; luego hay un periodo del día 3 al 11 en que la línea aproximadamente se mantiene en un nivel; para el día 12 se observa otra clara disminución que alcanza su nivel más bajo para el día 27. Nótese que no existe un incremento significativo de errores en los días en que se modificó el entrenamiento (días 20, 27 y 32), a diferencia de lo que sucedió para el programa A de reforzamiento.

Esta relación preferencial de entrada a los brazos, o probabilidad diferencial de elección de entrada, fue significativa tanto para la primera semana, en la que la prueba de chi cuadrada reportó valores calculados de 100.53 (programa A) y 76.09 (programa B), como para la tercera, con valores de 389.07 (programa A) y 342.18 (programa B). Todos estos valores son bastante mayores que el valor esperado de tablas (18.47) para condiciones normales, en las que no debería existir preferencia o mayor probabilidad de entrada a un brazo en especial. Se demuestra por consiguiente la probabilidad sesgada de entrada a los brazos, para la primera semana como efecto de la fase previa de condicionamiento forzado. Así como un incremento significativo de este sesgo en la tercera semana, como efecto de la fase de condicionamiento libre, para ambos programas de reforzamiento.

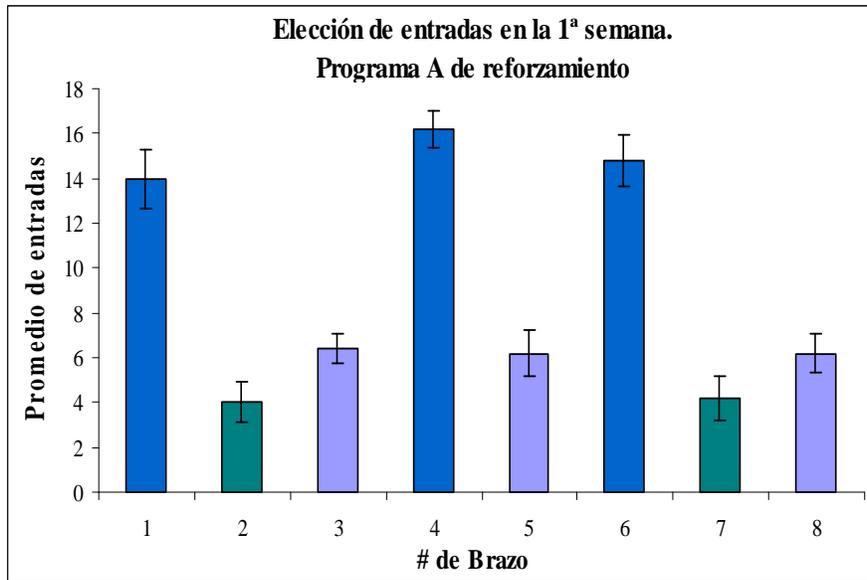


Figura 15. Muestra la elección diferencial de entrada a los brazos del laberinto por todas nuestras ratas, en la primera semana de entrenamiento para el programa A de reforzamiento en la fase de condicionamiento libre. Los brazos reforzados del programa presente (1, 4 y 6) se indican en barras azules, los brazos reforzados del otro programa (3, 5 y 8) se indican en barras moradas y los brazos nunca reforzados (2 y 7) están en barras verdes. La prueba de  $\chi^2$  arrojó un valor calculado de 100.53, el cual es mayor al valor esperado (18.47) y demuestra que existe una diferencia significativa en la probabilidad de entrada a los distintos brazos, producto de la fase previa de condicionamiento forzado.

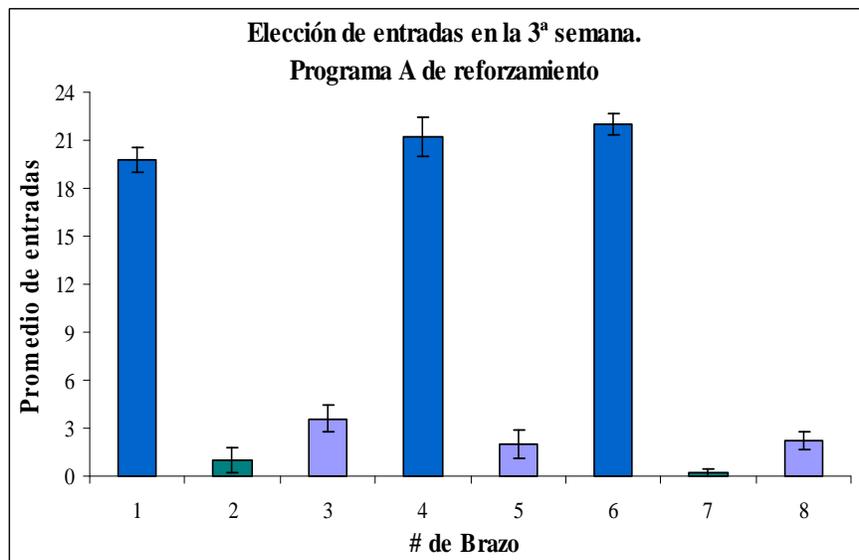


Figura 16. Muestra la elección diferencial de entrada a los brazos del laberinto por todas nuestras ratas, en la tercera semana de entrenamiento para el programa A de reforzamiento en la fase de condicionamiento libre. Los brazos reforzados del programa presente (1, 4 y 6) se indican en barras azules, los brazos reforzados del otro programa (3, 5 y 8) se indican en barras moradas y los brazos nunca reforzados (2 y 7) están en barras verdes. La prueba de  $\chi^2$  arrojó un valor calculado de 389.07, el cual es mayor al valor esperado (18.47) y demuestra que existe una diferencia significativa en la probabilidad de entrada a los distintos brazos producto de la fase de condicionamiento libre, diferencia más notable con respecto a la primera semana.

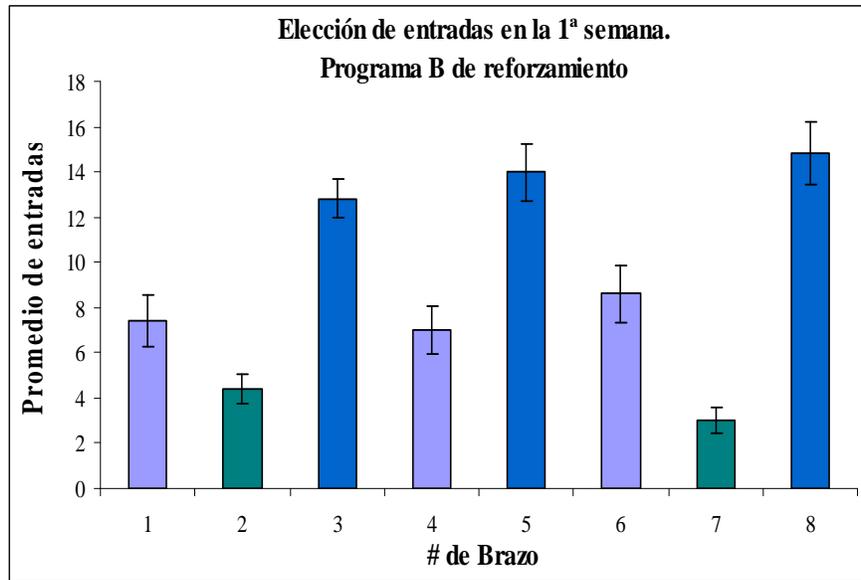


Figura 17. Muestra la elección diferencial de entrada a los brazos del laberinto por todas nuestras ratas, en la primera semana de entrenamiento para el programa B de reforzamiento en la fase de condicionamiento libre. Los brazos reforzados del programa presente (3, 5 y 8) se indican en barras azules, los brazos reforzados del otro programa (1, 4 y 6) se indican en barras moradas y los brazos nunca reforzados (2 y 7) están en barras verdes. La prueba de  $X^2$  arrojó un valor calculado de 76.09, el cual es mayor al valor esperado (18.47) y demuestra que existe una diferencia significativa en la probabilidad de entrada a los distintos brazos, producto de la fase previa de condicionamiento forzado.

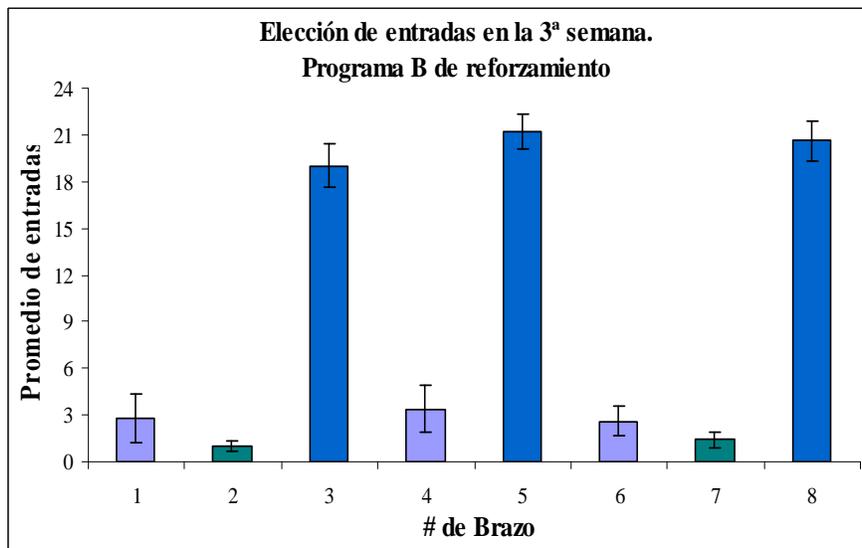


Figura 18. Muestra la elección diferencial de entrada a los brazos del laberinto por todas nuestras ratas, en la tercera semana de entrenamiento para el programa B de reforzamiento en la fase de condicionamiento libre. Los brazos reforzados del programa presente (3, 5 y 8) se indican en barras azules, los brazos reforzados del otro programa (1, 4 y 6) se indican en barras moradas y los brazos nunca reforzados (2 y 7) están en barras verdes. La prueba de  $X^2$  arrojó un valor calculado de 342.18, el cual es mayor al valor esperado (18.47) y demuestra que existe una diferencia significativa en la probabilidad de entrada a los distintos brazos, diferencia más notable con respecto a la que se dio en la primera semana.

Es preciso mencionar que si bien el entrenamiento fue eficaz para que los animales aprendieran los dos recorridos, de tal forma que se fueran asociando con el tono si importar la sucesión de los bloques en la sesión de entrenamiento, el grado de asociación tono-recorrido-reforzado permanece desconocida. Esto por la razón de que no se varió al azar la presentación de los programas dentro del mismo bloque de ensayos, que sería la forma de saber qué tanto las ratas atienden al tono como estímulo que señala el recorrido reforzado. No obstante, de lo que si podemos estar seguros es que los animales distinguen los dos recorridos reforzados (Figuras 15 a la 18) y lo más probable es que pasen de uno a otro según acierten o fallen en la elección de la entrada inicial.

La Tabla 1, que muestra la ejecución de los animales el día de la prueba, confirma lo anterior, ya que todos los animales tuvieron un rendimiento por encima del 90% de respuestas correctas. Lo anterior demuestra que el entrenamiento fue parcialmente exitoso y los animales aprendieron con un rendimiento óptimo, sino a discriminar podemos decir que si a distinguir los dos recorridos de los programas de reforzamiento.

***Ejecución Conductual del Día de la Prueba***

<b><i>Rata</i></b>	<b><i>Condición</i></b>	<b><i>Error/Entrada</i></b>	<b><i>% de ejecución</i></b>
<b><i>1</i></b>	<b><i>A-A</i></b>	<b><i>3 de 33</i></b>	<b><i>91%</i></b>
<b><i>2</i></b>	<b><i>A-A</i></b>	<b><i>3 de 33</i></b>	<b><i>91%</i></b>
<b><i>3</i></b>	<b><i>A-B</i></b>	<b><i>0 de 30</i></b>	<b><i>100%</i></b>
<b><i>4</i></b>	<b><i>A-B</i></b>	<b><i>3 de 33</i></b>	<b><i>91%</i></b>

Tabla 1. Muestra la ejecución de los animales en las condiciones de reconocimiento (A-A) y en la de discriminación (A-B). En la primera fila esta el número de rata; en la segunda la condición experimental;

en la tercera la cantidad de errores con respecto al total de las entradas que realizaron durante los 10 ensayos de ambos bloques; en la cuarta fila se muestra la relación de la tercera fila, solo que expresada en porcentaje.

## 2. De *CatFISH*

Se capturaron 6 imágenes por cada región del hipocampo (CA1 y CA3). Dado que en que en cada laminilla se encuentran los 6 cerebros de cada una de nuestras condiciones experimentales, los siguientes resultados se obtuvieron de 216 imágenes de microscopía confocal correspondientes a tres laminillas enteras. Para un conteo promedio de 540 células por animal para la región de CA1 y de 370 para la región de CA3. En la Figura 19 se muestran imágenes de la hibridación in situ para Arc en unidades celulares de nuestros tejidos.

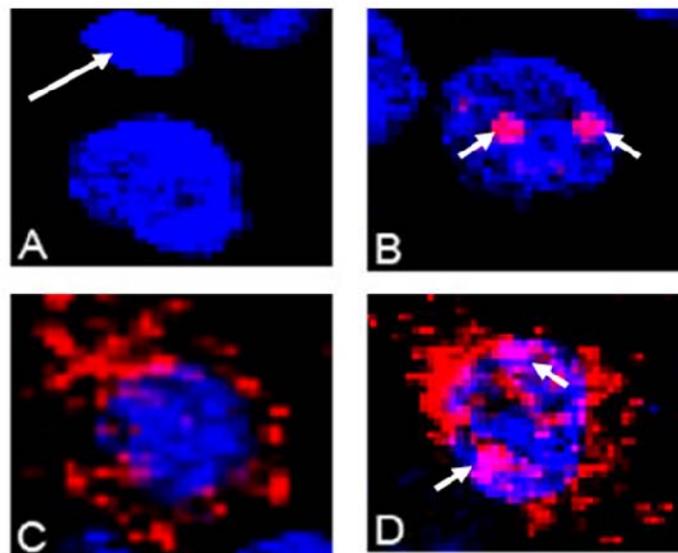


Figura 19. Imágenes de microscopía confocal, modificadas en metamorf, de la hibridación in situ fluorescente para Arc (en Rojo) en nuestros tejidos. El núcleo de las células está teñido con DAPI (Azul). En A se puede observar una célula glial, la cual muestra una forma más pequeña y de tinción más saturada con respecto a la neurona que se encuentra abajo, la cual se distingue por su mayor tamaño, su forma ovoide y la porosidad que presenta su tinción. En B se observa la presencia del transcrito de Arc en el núcleo, lo cual se debe a expresión inducida aproximadamente 5 min. antes de colectar el tejido. En C se observa la presencia de Arc en el citoplasma, que se debe a actividad que ocurrió 30 min. antes de la obtención del tejido. La co-localización de Arc en el núcleo y el citoplasma (D) se debe a que la célula se activó en ambas ocasiones.

La Figura 20 muestra imágenes de microscopía confocal de las regiones de CA1 y CA3 del hipocampo. Se observa que los animales sometidos a la condición de reconocimiento (A-A) presentan mayor cantidad de células con activación nuclear y citoplásmica junta (recuadros 1 y 4), con respecto a los animales que fueron sometidos a la condición de discriminación (A-B), en los

cuales se observa mayor cantidad de células que expresan la activación por separado (recuadros 2 y 5). En los animales controles la activación es casi nula (3 y 6).

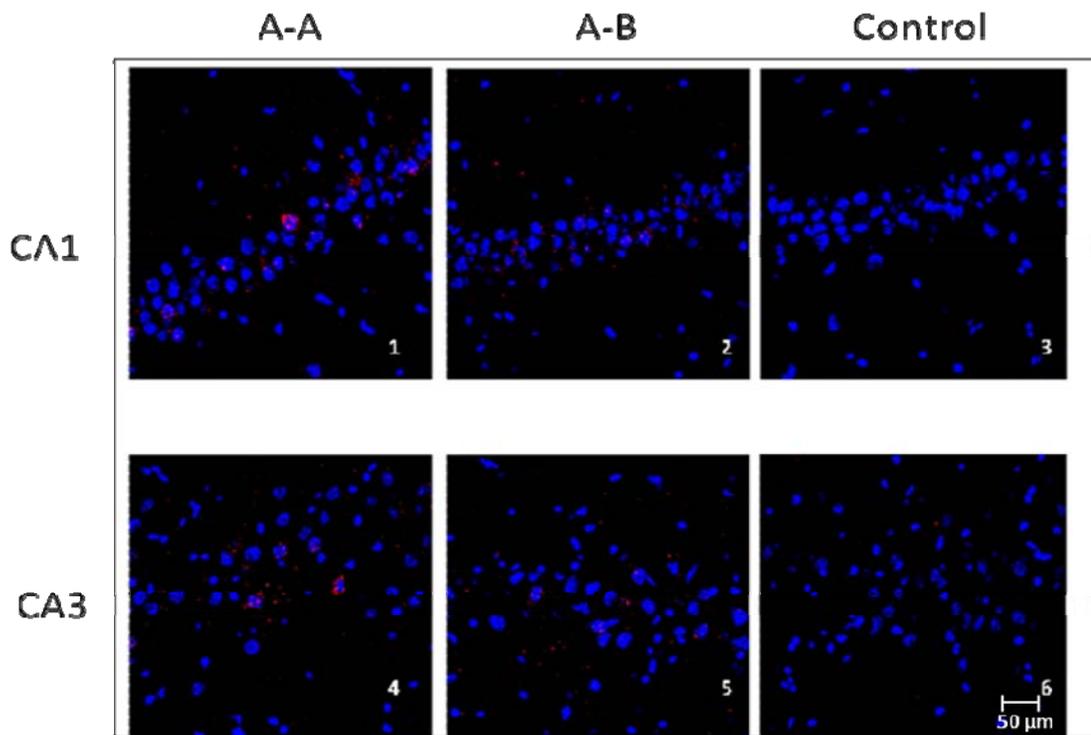


Figura 20. Imágenes de microscopía confocal de las regiones de CA1 y CA3 del hipocampo. Los recuadros superiores son de la región de CA1 y los inferiores de la región de CA3. En 1 y 4 se observan imágenes de animales que fueron sometidos a la condición de reconocimiento (A-A), se observan mayor cantidad de células con activación nuclear y citoplasmática junta con respecto a los animales que fueron sometidos a la condición de discriminación (A-B), en los cuales se observa mayor cantidad de células que expresan la activación por separado. En los recuadros 3 y 6 se pueden ver imágenes de animales controles por lo que la activación es casi nula.

La Figura 21 muestra que existen diferencias significativas en el porcentaje de células expresando Arc en la región de CA1 (según la prueba de ANOVA con  $F=27.586$   $p<.0001$  para la expresión nuclear;  $F=95.788$   $p<.0004$  para la expresión citoplasmática,  $F=118.0317$   $p<.0001$  para la expresión nuclear-citoplasmática, todas con  $gl=2$ ). La prueba poshoc de Bonferroni mostró que el porcentaje de expresión de Arc nuclear en el grupo A-B es significativamente mayor con relación al grupo de la condición A-A ( $p<.0001$ ), mientras que la expresión de éste es significativamente mayor que la del grupo control ( $p=.0015$ ). El porcentaje de expresión de Arc citoplásmico en el grupo A-B es significativamente mayor con relación al grupo de la condición A-A ( $p<.0001$ ),

mientras que la expresión de éste es significativamente mayor que la del grupo control ( $p < .0001$ ). Para la proporción de células que presentan activación en ambos compartimentos, esta es significativamente mayor en el grupo A-A con relación al grupo de la condición A-B ( $p < .0001$ ), mientras que la expresión del grupo A-B es mayor con respecto a la del grupo control ( $p = .0011$ ).

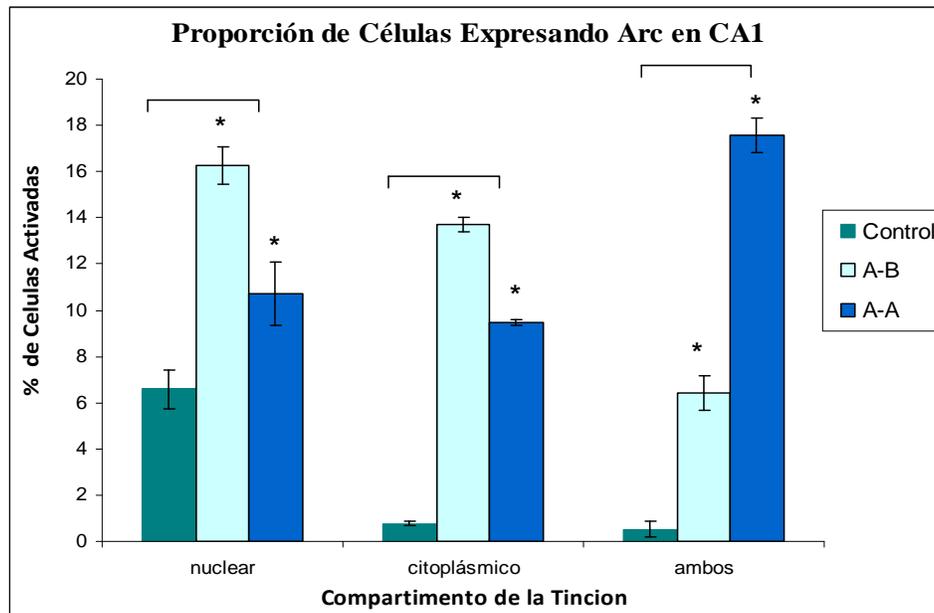


Figura 21. Muestra la proporción de células expresando Arc (nuclear, citoplasmático y ambas) en la región de CA1 del hipocampo para las tres condiciones de nuestro estudio: control (sin exploración), discriminación (A-B) y reconocimiento (A-A). El grupo de discriminación tiene una proporción significativamente mayor de células expresando la Arc por separado con respecto a las que lo expresan junto (remapeo de la red), mientras que en el grupo de reconocimiento sucede lo inverso (estabilidad de la red).

En la Figura 22, la prueba de ANOVA demostró que existen diferencias significativas en el porcentaje de células expresando Arc en la región de CA3 ( $F=8.775$   $p < .0004$  para la expresión nuclear,  $F=31.362$   $p < .0004$  para la tinción citoplasmática,  $F=79.747$   $p < .0001$  para la expresión nuclear-citoplasmática, todas con  $gl=2$ ). La prueba poshoc de Bonferroni, mostró que el porcentaje de expresión de Arc nuclear en el grupo A-B es significativamente mayor con relación al grupo control y al grupo de la condición A-A ( $p = .0002$  y  $p = .0036$ , respectivamente). El porcentaje de expresión de Arc citoplásmico en el grupo A-B es significativamente mayor con relación al grupo de la condición A-A ( $p = .0013$ ), mientras que la expresión del grupo A-A es significativamente mayor que la del grupo control ( $p < .0001$ ). Para la proporción de células que tienen

expresión de Arc en ambos compartimentos (nuclear-citoplasmática), esta es significativamente mayor en el grupo A-A con relación al grupo de la condición A-B ( $p < .0001$ ), mientras que la expresión del grupo A-B es significativamente mayor que la del grupo control ( $p = .0011$ ).

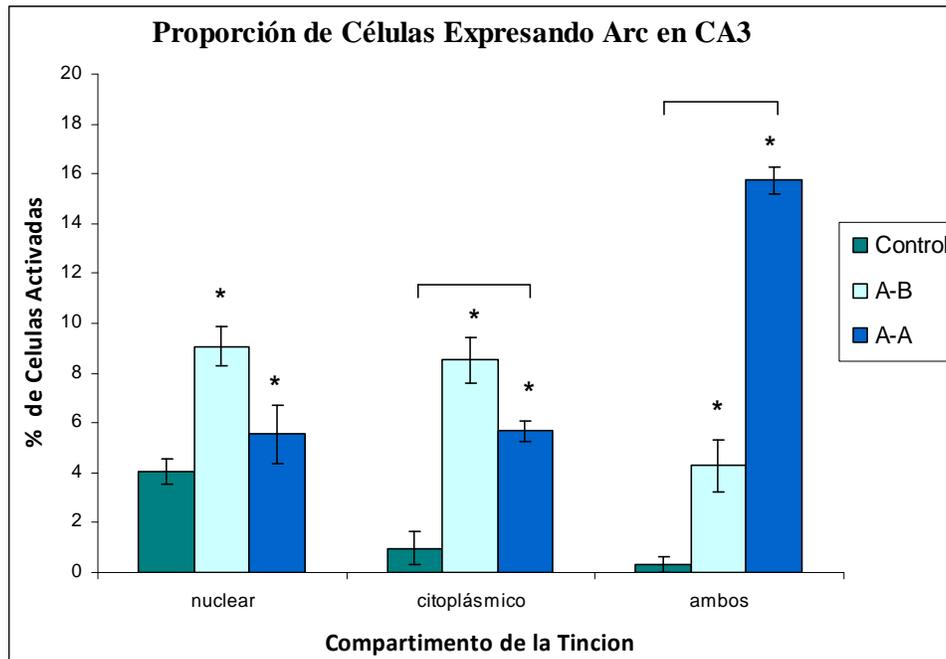


Figura 22. Muestra la proporción de células expresando Arc (nuclear, citoplasmático y ambas en la región de CA3 del hipocampo para las tres condiciones de nuestro estudio: control (sin exploración), discriminación (A-B) y reconocimiento (A-A). El grupo de discriminación tiene una proporción significativamente mayor de células expresando la Arc por separado con respecto a las que lo expresan junto (remapeo de la red), mientras que en el grupo de reconocimiento sucede lo inverso (estabilidad de la red).

Con base en los resultados, podemos afirmar que tanto para la región de CA1 como para la región de CA3 el porcentaje de células expresando Arc nuclear y citoplasmático por separado, en la condición de discriminación (A-B), es mayor que el porcentaje de células expresando Arc en los dos compartimentos a la vez. Inversamente, en la condición de reconocimiento (A-A) el porcentaje de células expresando Arc en los dos compartimentos a la vez (nuclear-citoplasmático), es mayor que el porcentaje de células que expresa Arc en alguno de estos por separado.

En la Figura 23, se muestra la proporción del total de células expresando Arc en la región de CA1 y CA3 del hipocampo, para nuestros grupos controles y

experimentales (los cuales se juntaron sin importar las condiciones A-A y A-B). Se observa que los grupos experimentales tienen una activación de alrededor de 25% y de 37% en la región de CA3 y CA1, respectivamente. Esta activación es significativamente mayor comparada con la de los grupos controles, que reportan un porcentaje de alrededor de 5% y 7% en CA3 y CA1, respectivamente.

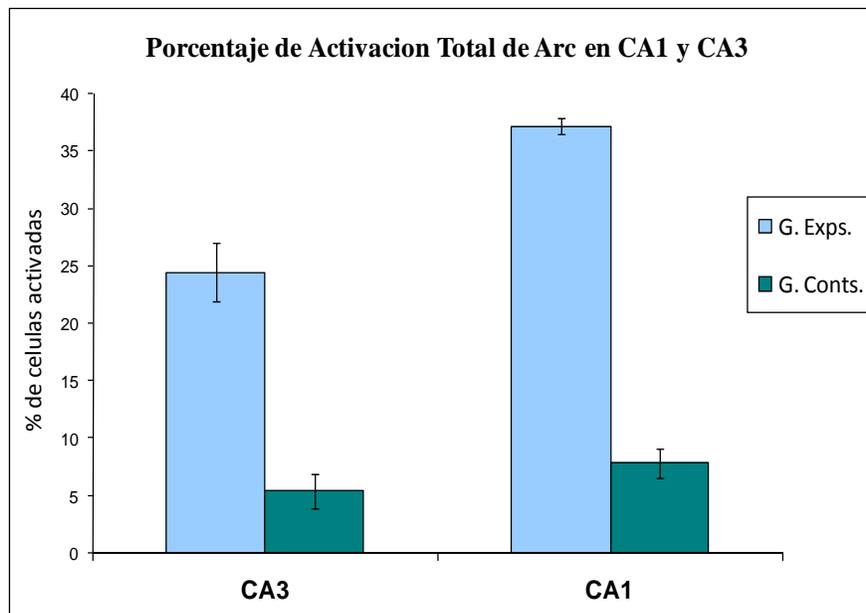


Figura 23. Muestra la proporción de células expresando Arc total (en cualquiera de los compartimentos) en la región de CA1 y CA3 del hipocampo, para nuestros grupos controles y experimentales (los cuales se juntaron sin importar las condiciones A-A y A-B). Se observa que los grupos experimentales (G. Exps.) tienen una activación de alrededor de 25% y de 37%, en la región de CA3 y CA1, respectivamente. Activación significativamente mayor a la de los grupos controles (G. Conts) que reportan un porcentaje de alrededor de 5% y 7% en CA3 y CA1, respectivamente.

Por último, en la Figura 24 se muestra los valores del índice de Similitud para la región de CA3 y CA1. El puntaje de similitud establece una relación proporcional de la detección de la señal entre los distintos compartimentos, aportando un valor de la relación entre los distintos ensambles involucrados en la primera, en la segunda y en ambas exploraciones. Por lo tanto, permite comparar el grado de remapeo o estabilidad de la red entre ambas estructuras para nuestras dos condiciones de exploración (A-A y A-B). Un valor de 0 indica el máximo grado de remapeo de la red (discriminación), mientras que un valor de uno señala el máximo grado de estabilidad de la red (reconocimiento) (Burke et al. 2005; Vazdarjanova y Guzowski, 2004). Se puede observar que CA3 presenta un grado un poco más alto de estabilidad de la red (con un valor de

.77) comparado con CA1 (que tiene un valor de .65) para nuestra condición experimental A-A. Respecto al remapeo de la red, CA3 y CA1 manifiestan un valor significativamente igual en el índice de similitud para nuestra condición experimental de discriminación (A-B).

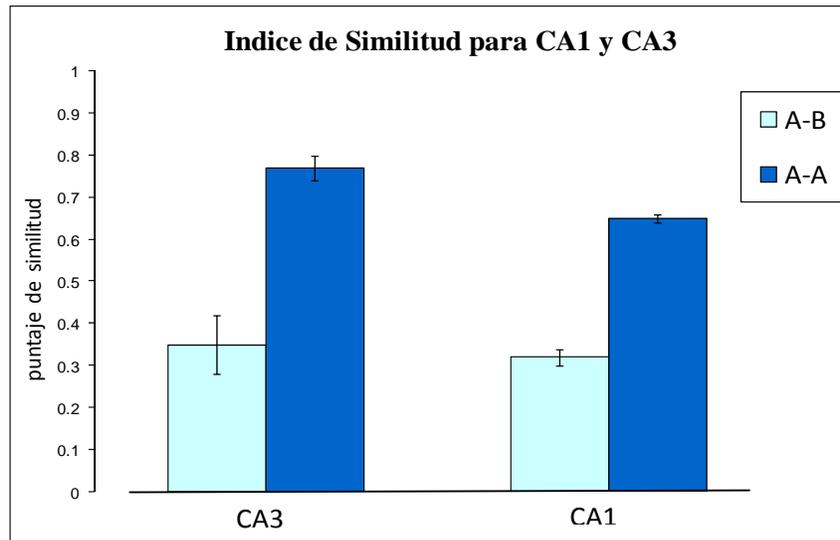


Figura 24. Índice de Similitud calculado para la región de CA3 y CA1. El puntaje de similitud establece una relación proporcional entre la activación detectada en los distintos compartimientos celulares (que indica los grupos celulares que respondieron al primero, al segundo y a los dos eventos de exploración). Permite comparar el grado de remapeo o estabilidad de la red entre ambas estructuras, para nuestras dos condiciones de exploración (A-A y A-B). Un valor de 0 indica el máximo grado de remapeo de la red (discriminación), mientras que un valor de uno señala el máximo grado de estabilidad de la red (reconocimiento).

## DISCUSIONES

### ***1. Del entrenamiento conductual.***

En general, podemos afirmar que los resultados del entrenamiento demuestran que los animales han aprendido a distinguir los recorridos de los dos programas de reforzamiento con una cantidad mínima de errores (Tabla 1). No podemos afirmar que los discriminen totalmente, pues este concepto implicaría que el tono hubiera quedado asociado como estímulo señal del recorrido reforzado. Lo cual no probamos pues no presentamos al azar los programas de reforzamiento dentro del mismo bloque de ensayos. Sin embargo, si podemos

decir que los distinguen, pues según la elección inicial, si encuentran refuerzo o no en ésta, cambian o no de recorrido. Pero no de manera aleatoria entre todos los brazos de ambos programas, sino de acuerdo a los recorridos; es decir, si no encuentran refuerzo en un brazo no van hacia los brazos de ese mismo programa, si no que se dirigen hacia cualquiera de los brazos del otro programa, lo cual demuestra que distinguen los dos programas de reforzamiento (Figuras 15 a la 18).

Si analizamos lo sucedido para el programa A de reforzamiento (Figura 13), se puede observar que el aumento más relevante del promedio de errores se dio en el día 20. Considerando que este fue el día donde se inició la fase de cambio de turno, podemos inferir que el primer aprendizaje de los animales está centrado en la sucesión de los programas, una vez que esta se invierte repercute en un menor rendimiento. La asociación tono-recorrido, está mezclada y se ve afectada por la asociación tono-recorrido-sucesión de los programas de reforzamiento en la sesión de entrenamiento. Esto coincide con lo reportado en la literatura, el sacar al animal del laberinto y colocarlo en otro ambiente con la luz apagada (como estaba en este caso la habitación donde se hallaban las cajas de alojamiento), puede funcionar como una estimulación señal del recorrido a realizar cuando el animal regresa al dispositivo de prueba (Smith y Mizumori, 2006).

En este sentido, es preciso mencionar que el aprendizaje de las ratas está basado en las relaciones espacio temporales asociadas directamente con la adquisición del reforzador, Hebb (1949) lo denomina "habito de lugar". Los elementos abstractos que el investigador introduce para indicar el recorrido reforzado son ignorados por los animales. El tono es un elemento no directamente vinculado al recorrido y a los reforzadores por lo cual no es inicialmente atendido. Cuando se cambia la sucesión de presentación de los programas, aun cuando el cambio de tono señale el cambio de recorrido, los animales tienen dificultades para ejecutar la tarea pues tienden a realizar la misma sucesión de la fase previa del entrenamiento.

Lo anterior se confirma por el incremento de errores reportado para el día 32, en que se sometió a los animales a los dos programas de reforzamiento

seguidos, dejando un tiempo breve entre la aplicación de uno y otro programa. Parece que el periodo más corto de lo habitual entre uno y otro bloque de ensayos, confunde al animal respecto a si estaba presente la señal de cambio de recorrido (en este caso el tiempo entre los bloques en que se lo llevaba a su caja de alojamiento) o si tenía que realizar el mismo programa. Esto puede explicarse por estudios previos, en los cuales se ha puesto a ratas a explorar dos ambientes visualmente idénticos conectados por un pasillo (Skaggs y McNaughton, 1998) o directamente conectados solo variando en la posición relativa de entrada (Tanila, 1999).

Se ha visto que las células del hipocampo pueden modificar sus campos de lugar conformen pasan de un ambiente a otro, pero en otras ocasiones lo mantienen estable o disparan en sitios equivalentes de ambos ambientes, dependiendo de que tanto han explorado y de que tanto ha pasado de un ambiente a otro. De este modo, los campos de lugar de las células del hipocampo se modifican de acuerdo a distintas condiciones relacionadas con la sucesión en que se exploran los dos ambientes (Tanila, 1999). En nuestro caso, el periodo alterado de descanso entre los programas pudo haber modificado la activación de las células de lugar del hipocampo, manteniendo sus patrones de disparo acordes con el recorrido realizado previamente y no con el subsiguiente, lo cual se reflejó en el aumento de errores.

Pese a esto, puesto que el incremento de errores del día 20 es mayor que el del día 32, podemos deducir que la asociación tono-recorrido se ha fortalecido y se ha ido disociando de su relación con la sucesión de presentación previa de los programas. Las variaciones en esta última, afectan menos la ejecución de los animales en fases del entrenamiento tardías (día 32) que en fases tempranas (día 20). Por lo tanto, podemos afirmar que las aproximaciones del entrenamiento van depurando paulatinamente (Figuras 15-18) la asociación tono-recorrido de los demás elementos incluidos en el contexto de experimentación. Aunque no logramos que se asociara totalmente el tono con los recorridos, nuestro trabajo representa un avance pues antes de éste no se había intentado diseñar una tarea de tal grado de complejidad en un laberinto radial para hacer un conteo de células con CatFISH.

## **2. Del correlato neuronal**

Por lo que respecta a los resultados de catFISH, es importante destacar que la activación total de las regiones hipocampales en nuestro estudio fue congruente con lo reportado en la literatura, esto es: 40% de las células en CA1 y 20% en CA3 (Ramírez-Amaya et al. 2005; Vazdarjanova et al. 2002). Nuestros datos concuerdan parcialmente pues CA1 tuvo una activación de 37% y CA3 de 25% (Figura 23), lo que indica una participación normal de las áreas hipocampales para nuestra tarea conductual.

En nuestro modelo, tanto las pistas distales como las inherentes al aparato de exploración se mantuvieron constantes, variando solo la actividad exploratoria que el animal tenía que realizar para conseguir el refuerzo. No obstante, con base en los resultados obtenidos, las regiones de CA1 y CA3 manifiestan estabilidad de la red (mayor proporción de células expresando activación en ambos compartimientos, con respecto a las que la presentan por separado) en la condición de reconocimiento (A-A); y remapeo (mayor proporción de células expresando activación por separado, con respecto a las que la presentan junta en ambos compartimientos) en la condición de discriminación (A-B) (Figura 21 y 22).

Si comparamos los puntajes de similitud (Figura 24) obtenidos en nuestro estudio (.77 y .65 en la condición de reconocimiento A-A, .35 y .32 en la condición de discriminación A-B, para CA3 y CA1 respectivamente) con relación a los reportados por Vazdarjanova y Guzowski (2004) (Figura 10) (~.85 y ~.75 en la condición de reconocimiento A-A, ~.05 y ~.15 en la condición de máxima discriminación A-B, para CA3 y CA1 respectivamente), se observa que en nuestro caso el hipocampo discrimina o remapea de forma menos drástica. Tal vez comparable a lo que en el estudio de Vazdarjanova se reporta como remapeos parciales, que codifican cambios en las pistas internas o externas, pero no cambios de ambas pistas a la vez. De igual forma, comparándolos con los valores reportados por Burke et al. (2005), en los que el índice de similitud, tanto para la condición de cambio de ambiente como para la de cambio

recorrido, es de .2 en la región de CA1 (Figura 11), nuestros datos parecen suponer un remapeo hipocampal menos eficiente para nuestra tarea.

Un estudio reciente (Jennifer, Siegel, Joshua, Neunuebel y Knierim, 2008) puede servirnos como base para explicar nuestros datos. En este, se entrenó a ratas en un campo abierto para que asociaran un sonido y una modificación del mismo con la presencia y la entrega del reforzador, respectivamente, en una posición específica del espacio de exploración. Luego del entrenamiento, sometían a los animales a pruebas con un cambio de posición de la caja de exploración respecto al cuarto; por lo tanto a un cambio de la meta o lugar del reforzador con respecto a las pistas externas.

Con ayuda de técnicas de electrofisiología, encontraron células que mueven su campo receptivo espacial con respecto a la caja, otras que lo hacen respecto al cuarto, otras que son ambiguas (que modifican parcialmente su campo receptivo o muestran separación de campos receptivos) y las que remapean completamente (Jennifer et al. 2008). Para el caso de nuestro estudio, este dato nos da sustento para suponer que el remapeo menor de CA1 y CA3 para la discriminación de nuestra tarea, con respecto al reportado por Vazdarjanova y Guzowski (2004), puede deberse a que algunas células de los ensambles están codificando el cambio de recorrido, mientras que otras la constancia de las pistas externas con respecto al laberinto. Así, la separación de patrones que se requiere para que el animal discrimine nuestros dos recorridos, se ve afectada por la ambigüedad de la tarea que implica un cambio de contexto u orientación de las pistas distales con relación al cambio de recorrido; y por otro, el contexto se mantiene estable con relación a todo el laberinto.

La exigencia para que los animales alternen entre dos recorridos en un mismo dispositivo, supone un proceso de aprendizaje reversivo que es afectado por el hecho de que ambos se den en el mismo ambiente de exploración. Tal dificultad puede explicar el remapeo menos drástico observado en nuestros datos con respecto a los reportados en los estudios mencionados (Vazdarjanova y Guzowski 2004). Esta hipótesis a su vez se ve apoyada por el fenómeno de la inhibición específica al contexto (McDonald et al. 2002), por el

cual se conoce que es más difícil revertir un aprendizaje en un mismo ambiente espacial que en uno diferente. Lo cual hace más sentido tratándose de nuestro datos, pues se sabe que la inhibición específica al contexto depende del hipocampo (McDonald et al, 2002)

Con respecto a los datos de Burke et al. (2005), el mejor remapeo observado en CA1 (Figura 11) para una condición en que se invertía un recorrido en un mismo ambiente, con respecto a nuestros datos (Figura 24), podría explicarse por el hecho mismo de la actividad exploratoria sencilla que el animal tenía que realizar en una caja de exploración sin múltiples pasillos.

Se sabe que el hipocampo genera una representación del espacio sin importar la actividad exploratoria (Vazdarjanova y Guzowski, 2004), solo cuando la exploración no implique un grado de aprendizaje por el que el animal tenga que realizar un recorrido específico. Esta hipótesis está fundamentada por estudios como el de Skaggs y McNaughton (1998), en el que no se observó un disparo distintivo de células de lugar en el hipocampo ante dos ambientes visualmente idénticos conectados por un pasillo. Como los dos ambientes de exploración eran iguales y en ambos el animal recibía refuerzo, pudiendo pasar libremente de un ambiente a otro sin restricciones temporales, las células de lugar generaban campos de lugar similares en ambos. Parece que el hipocampo, tomando en cuenta que las demandas de la tarea eran casi nulas e idénticas en ambos ambientes, los representaba como contextos equivalentes aun cuando no dejaron de ser dos ambientes distintos, por más similares que fueran visualmente. Así, se ha supuesto que el hipocampo modifica la forma de codificación del contexto, según la relación entre las diferencias en el ambiente y la complejidad de las demandas conductuales que el animal tiene que ejecutar para conseguir el refuerzo (Tanila, 1999).

Este supuesto ha sido apoyado por evidencia de un diseño experimental donde se limitó a un periodo el paso de los animales entre dos ambientes visualmente idénticos (Tanila, 1999). Se descubrió que las células de lugar del hipocampo modifican su tasa de disparo de manera específica a los dos contextos, aun

cuando los dos ambientes hayan sido iguales en cuanto a características visuales. Por lo anterior, podemos decir que cuando la exploración y el acceso al reforzador están delimitados por un periodo o recorrido específicos (es decir, cuando las demandas de la tarea se hacen más complejas), entonces el hipocampo involucra a estas dentro de la codificación del contexto (Tanila, 1999). Con base en esto, es plausible una explicación de cómo el hipocampo codifica el contexto espacial: solo por los cambios en el ambiente, sin importar la conducta exploratoria; o por las demandas que involucre la ejecución conductual (sin importar que el ambiente en que se den no varíe) según se hagan éstas más complejas. Esto ya se había explorado con éxito gracias a técnicas electrofisiológicas (Skaggs y McNaughton, 1998; Smith y Mizumori, 2006; Tanila, 1999), que permiten una buena resolución anatómica y una resolución temporal inigualable, pero que, por dificultades técnicas, por lo regular se realizan en conjuntos relativamente pequeños de células.

El modo en que las poblaciones neuronales codifican el contexto en un mismo ambiente ha sido poco explorado, aunque algunos estudios lo han hecho (Burke et al. 2005), nuestros resultados los complementan por tratarse, en nuestro caso, de una tarea de mayor complejidad y no solo de una inversión del recorrido en una caja de exploración.

El remapeo y la estabilidad de la red observadas en nuestro grupo de discriminación y de reconocimiento, respectivamente, constituyen parte de los mecanismos neuronales que se producen cuando los individuos tienen que distinguir contextos similares. Dado que la activación de los ensambles en CA1 y CA3 estuvo definida por la posición del reforzador, se puede inferir que la codificación por parte del hipocampo formó parte de una función de procesamiento de contexto más amplia, que no se reduce a la representación de las modificaciones en el ambiente.

La explicación que se desprende es que cuando los animales vuelven a un ambiente conocido, el código de contexto dado en el hipocampo se expresa. Lo que a su vez podría modular la actividad en otras estructuras como el cuerpo estriado y la neocorteza, a fin de que la expresión de las conductas aprendidas y los elementos perceptivos relacionados se vean reforzados. El hipocampo,

por lo tanto, parece sesgar de acuerdo a la experiencia los sistemas de expresión de la conducta en el cerebro (Mizumori, Yeshenko, Gill y Davis, 2004).

Por último, nuestro modelo permite explorar los problemas de la relación de las distintas áreas hipocampales para la codificación del contexto espacial. Así, la mayor estabilidad de la red presentada por CA3 (puntaje de similitud de .77) con respecto a CA1 (puntaje de similitud de .65) para nuestra condición de reconocimiento (A-A), puede deberse a una división de funciones en el hipocampo. Mientras que CA3 podría estar codificando el ambiente espacial inalterado con respecto a todo el laberinto, CA1 podría estar codificando el cambio de recorrido. Los hallazgos divergentes de completamiento de patrones y de separación de patrones (Leutgeb et al. 2004) apoyan esta idea. Estos han sido interpretados como una competencia entre estas funciones, lo cual fue sustentado por Vazdarjanova y Guzowski (2004) que sugirieron que los ensamblajes celulares de CA3 realizan separación de patrones y completamiento de patrones según distintas condiciones.

Otra posibilidad, dado que nuestros datos muestran una activación muy similar de ambas estructuras, es que CA3, la cual presenta puntajes en el índice de similitud un poco más lejanos entre sí (.77 en A-A y .35 en A-B) que CA1 (.65 en A-A y .32 en A-B), pueda estar discriminando mejor los dos recorridos. Esto se apoyaría en los estudios previos (Vazdarjanova y Guzowski, 2004), en los que se ha visto que CA3 presenta un grado de remapeo más drástico, pues se infiere destaca las diferencias en el medio, a diferencia de CA1 que tiene un grado de remapeo de la red gradual ante los cambios del entorno.

En todo caso, se requiere de mayor investigación para resolver los problemas que se desprenden de la complejidad de la función hipocampal. El aporte de nuestro trabajo, aunque es un primer paso, se dirige hacia ese esfuerzo a largo plazo para diseñar nuevos modelos que permitan solucionar distintos aspectos de la integración de la información espacial y la codificación hipocampal del contexto.

## **CONCLUSIONES**

Si bien no logramos asociar por completo el tono como estímulo señal del recorrido reforzado, si conseguimos diseñar un modelo conductual en el que las ratas distinguen dos recorridos en un laberinto radial bajo un mismo ambiente espacial.

Evaluamos la respuesta de poblaciones neuronales en el hipocampo (en las regiones de CA1 y CA3) ante esta tarea conductual con la técnica de CatFISH, lo cual no había sido reportado anteriormente en la literatura. Encontramos que poblaciones de neuronas en el hipocampo presentaron estabilidad de la red en la condición de reconocimiento (AA) y remapeo de la red en la condición de discriminación (AB). Con ello, aportamos evidencia novedosa de la forma en que los ensambles hipocampales (en las regiones de CA1 y CA3) procesan la información del contexto espacial, cuando el ambiente de exploración se mantiene invariante y solo se modifican las demandas de la tarea.

Por lo tanto, nuestros datos resultan un valioso complemento de los estudios de células de lugar registradas con técnicas electrofisiológicas (Leutgeb et al, 2007; Smith y Mizumori, 2006; Tanila 1999). Concuerdan con el supuesto de que el procesamiento de contexto, por parte del hipocampo, no se limita a los estímulos de fondo, sino que varía según las modificaciones del ambiente y/o la complejidad de las exigencias conductuales que éste impone al animal para conseguir el refuerzo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Amaral, D. G. y Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neurosci.* 31, 571-591.
- Amaral, D. G., Ishizuka, N., Claiborne, B. (1990). Neurons, numbers and the hippocampal network. *Prog. Brain. Res.* 83,1-11.
- Amaral, D. G. y Witter, M. P. (1995). Hippocampal formation. En Paxinos G y Watson CH (Eds), 1982. *The rat Brain in Sterotaxic Coordinates*. New York: Academic Press.
- Bailey, C.H. y Kandel, E. R. (1993). Structural changes accompanying memory storage. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 397-426.
- Barnes, C. A., McNaughton, B. L., Mizumori, S.J., Leonard, B.W. y Lin, L.H. (1990). Comparison of spatial and temporal characteristics of neuronal activity in sequential stages of hippocampal processing. *Prog. Brain. Res.* 83, 287-300
- Bliss, T. V. y Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physio..* 232, 331-356.
- Bortolotto, Z. A. y Collingridge, G. L. (1993). Characterisation of LTP induced by the activation of glutamate metabotropic receptors in area CA1 of the hippocampus. *Neuropharmacology.* 32, 1-9.
- Bramham, C. R. y Messaoudi, E. (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog. Neurobiol.* 76, 99-125.
- Burke, S.N., Chawla, M. K., Penner, M.R., Crowell, B.E., Worley, P.F., Barnes, C.A., McNaughton, B. L. (2005). Differential encoding of behavior and

spatial context in deep and superficial layers of the neocortex. *Neuron*. 45, 667-674.

Carlson, N. (2000). *Fisiología de la Conducta*. Barcelona: Ariel

Fields, R. D., Lee, P. R. y Cohen, J. E. (2005). Temporal integration of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling networks in regulating gene expression by action potentials. *Cell Calcium*. 37, 433-442.

Godden, D. y Baddely, A. (1975). Context-dependent memory in two natural environments: on land and underwater. *Br. J. Psychol.* 66, 325–331.

Green, J. D. y Arduini, A. A. (1954). Hippocampal electrical activity in arousal. *J. Neurophysiol.* 17, 533-557

Guzowski, J. F., McNaughton, B. L., Barnes. C. A. y Worley, P. F. (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci.* 2,1120-1124.

Guzowski, J. F., Knierim, J. J. y Moser E. I. (2004) Ensemble dynamics of hippocampal regions CA3 and CA1. *Neuron*. 44, 581-584.

Guzowski, J. F., Lyford, G. L., Stevenson, G. D., Houston, F. P., McGaugh, J. L., Worley, P. F. y Barnes, C. A. (2000). Inhibition of activity-dependent *Arc* protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J. Neurosci.* 20, 3993-4001.

Hebb, D. (1964). *The organization of behavior; A neuropsychological theory*. New York: J. Wiley

Holscher, C. (2003). Time, space and hippocampal functions. *Rev. Neurosc.* 14, 253-284.

- Ishizuka, N., Weber, J. y Amaral, D. G. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J. Comp. Neurol.* 295, 580-623.
- Jaffe, D. B. y Gutierrez, R. (2007). Mossy fiber synaptic transmission: communication from the dentate gyrus to area CA3. *Prog. Brain Res.* 163, 109-132.
- Jeffery, K. J. y Hayman, R. 2004. Plasticity of the hippocampal place cell representation. *Rev Neurosci.* 15, 309-331.
- Kahana, M. J., Sekuler, R., Caplan, J. B., Kirschen, M. y Madsen, J. R. (1999). Human theta oscillations exhibit task dependence during virtual maze. *J. Neurosci.* 399, 781-784
- Kandel, E., Schwartz, J. y Jessell, T., 1999. *Neurociencia y Conducta*. Madrid: Prentice Hall
- Kobayashi, T., Tran, A. H., Nishijo, H., Ono, T. y Matsumoto G. (2003). Contribution of hippocampal place cell activity to learning and formation of goal directed navigation in rats. *Neurosci.* 117, 1025–1035.
- Lashley, K. S. (1931) Mass action in cerebral function. *Science.* 6(73), 245-254.
- Leutgeb, J.K., Leutgeb, S., Moser, M. B. y Moser, E. I. (2007). Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science.* 315, 961-6.
- Leutgeb, S., Leutgeb, J.K., Treves, A., Moser, M.B. y Moser, E. I. (2004). Distinct ensemble codes in hippocampal areas CA3 and CA1. *Science.* 305, 1295-1298.
- Link, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey. U. y Kuhl, D. (1995). Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92, 5734-5738.

- Lorenz, K. (1976). Consideraciones sobre la conducta animal y humana. Barcelona: Plaza and Janes
- Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., Sanders, L.K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Lanahan, A. A. y Worley, P.F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*. 14, 433-445.
- Malenka, R.C. y Nicolli, R.A. (1999). Long-term potentiation-apecade of progress? *Science*. 285, 1870-1874.
- Marr, D. (1971) Simple memory: a theory for archicortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. 262, 23-81.
- McNaughton, B.L., Barnes, C.A., Gerrard, J.L., Gothard, K., Jung, N.W., Knierim, J. J., Kudrimoti, H., Qin, Y., Skaggs, W. E., Suster, M. y Weaver, K.L. (1996). Deciphering the hippocampal polyglot: the hippocampus as a path integration system. *J. Exp. Biol.*199, 173-185.
- McNaughton, B.L., Mizumori, S.J., Barnes, C.A., Leonard, B.J., Marquis, M. y Green, E.J. (1994). Cortical representation of motion during unrestrained spatial navigation in the rat. *Cereb. Cortex*. 4, 27-39.
- Milner, B. (1966). Amnesia following operation on the temporal lobes. En Whitty CWM, Zanwill OL, (eds), *Amnesia* (pp. 109-133), London: Buterworths.
- Mizumori, S. J., Ragozzino, K. E., Cooper, B. G. y Leutgeb, S. (1999). Hippocampal representational organization and spatial context. *Hippocampus*. 9, 444–451.

- Mizumori, S. J., Yeshenko, O., Gill, K. M. y Davis, D. M. (2004). Parallel processing across neural systems: implications for a multiple memory system hypothesis. *Neurobiol. Learning.. Mem.* 82, 278 –298.
- Monmaur, P. (1982). Hippocampal theta rhythms from CA1 and dentate generators during paradoxical sleep of the rat: differential alterations after septal lesion. *Physiol Behav.* 28, 467-71
- Morris R.G., Anderson, E., Lynch, G.S. y Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature.* 319, 774-776.
- Muller, R. (1996). A Quarter of a Century of Place Cells. *Neuron.* 17, 979–990.
- Nadel, L., Eichenbaum, H. (1999 ) Introduction to the special issue on place cells. *Hippocampus.* 9, 341-5.
- Neves G, Cooke SF, Bliss TV. 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci.* 9, 65-75
- O'Keefe, J. (1976) Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol* 51:78-109.
- O'Keefe, J. y Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain. Res.* 34, 171-5.
- O'Keefe, J. y Nadel, L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map.* Oxford: Clarendon Press.
- O'Keefe, J. (1999). Do hippocampal pyramidal cells signal non-spatial as well as spatial information?. *Hippocampus.* 9, 352-364.

- Ottersen O. P., Torp R y Storm-Mathisen J. (1989). New aspects of the pathogenesis of pathogenesis of ischemic brain damage. Possible involvement of excitatory amino acids. *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* 109, 2674-2677.
- Paxinos, G. y Watson, C. (1997). *The rat brain in stereotaxic coordinates.* San Diego: Academic Press.
- Petrovich, G. D., Peter, C., Gallagher, H. y Gallgher, M. (2004). Amygdalar and Prefrontal Pathways to the Lateral. Hypothalamus Are Activated by a Learned Cue That Stimulates Eating. *Journal of Neuroscience*, 25, 8295–8302.
- Plath, N., Ohana, O., Dammerman, B., Errington, M. L., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., Kobalz, U. y Husi, H. (2005). Arg3.1/Arc associates with the NMDA receptor and is essential for LTP and memory consolidation. *Cell Submitted.*
- Qin, Y. L., McNaughton, B. L., Skaggs, W. E. y Barnes C. A. (1997). Memory reprocessing in corticocortical and hippocampocortical neuronal ensembles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 352, 1525–1533.
- Ramírez-Amaya, V., Vazdarjanova, A., Mikhael, D., Rosi, S., Worley, P. F. y Barnes, C. A. (2005). Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *J. Neurosci.* 25, 1761-68.
- Sakurai, Y. (1999) How do cell assemblies encode information in the brain?. *Neurosci Biobehav Rev.* 23, 785-796.
- Skaggs, W.E. y McNaughton, B. L. (1998). Spatial firing properties of hippocampalCA1 populations in an environment containing two visually identical regions. *J. Neurosci.* 18, 8455– 8466.

- Siegel, J. J., Neunuebel, J. P. y Knierim, J. J. (2008). Dominance of the Proximal Coordinate Frame in Determining the Locations of Hippocampal Place Cell Activity During Navigation. *Neurophysiol.* 99, 60–76.
- Silva, A., Stevens, C., Tonegawa, S. y Wang, Y. (1992). Deficient Hippocampal long-term potentiation in  $\alpha$ -calcium-calmodulin Kinase II mutant mice. *Science.* 257, 201-206.
- Smith, D. M. y Mizumori, S. (2006). Learning-related development of context-specific neuronal responses to places and events: The hippocampal role in context processing. *J Neurosci.* 26, 3154–3163.
- Tanila, H. (1999). Hippocampal place cells can develop distinct representations of two visually identical environments. *Hippocampus.* 9, 235-46
- Thompson, L. T. y Best, P. J. (1990). Long-term stability of the place-field activity of single units recorded from the dorsal hippocampus of freely behaving rats. *Brain Res.* 509, 299-308.
- Thompson, R. F. y Jeansok, K. (1996). Memory systems in the brain and localization of a memory. 93, 13438-13444.
- Vazdarjanova, A., McNaughton, B. L., Barnes, C.A., Worley, P. F. y Guzowski, J. F. (2002). Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes *arc* and *Homer 1a* in hippocampal and neocortical neuronal networks. *J. Neurosci.* 22,10067-10071.
- Vazdarjanova, A. y Guzowski, J. F. (2004). Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: evidences for distinct, yet complementary, functions of CA3 and CA1 ensembles. *J Neurosci* 24, 6489-6496.

Weisz, D. J., Clark, G. A. y Thompson, R. F. (1984). Increased responsivity of dentate granule cells during nictitating membrane response conditioning in rabbit. *Behav. Brain Res.* 12, 145-154.

Wood, E. R., Dudchenko, P. A, Robitsek, R. J. y Eichenbaum, H. (2000) Hippocampal neurons encode information about different types of memory episodes occurring in the same location. *Neuron.* 27, 623– 633.

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	<b>Página</b>
Figura 1- El ensamble.....	4
Figura 2- Mecanismos moleculares del LTP.....	8
Figura 3- Hipocampo de rata.....	9
Figura 4- Circuito hipocampal.....	11
Figura 5- Campos receptivos espaciales.....	12
Figura 6- Células de lugar y codificación del contexto.....	15
Figura 7- Codificación del contexto por demandas de la tarea.....	17
Figura 8- CatFISH.....	19
Figura 9- Estabilidad y Remapeo de la red.....	20
Figura 10- CatFISH en CA1 y CA3.....	21
Figura 11- CatFISH en CA1, PCxS, PCxD, GCxS y GCxD.....	23
Figura 12- El laberinto radial.....	24
Figura 13- Gráfica de errores Prog. A de reforz.....	34
Figura 14- Gráfica de errores Prog. B de reforz.....	36
Figura 15- Elección de entrada 1ª semana Prog. A de reforz.....	37
Figura 16- Elección de entrada 1ª semana Prog. B de reforz.....	37
Figura 17- Elección de entrada 3ª semana Prog. A de reforz .....	38
Figura 18- Elección de entrada 3ª semana Prog. B de reforz.....	38
Figura 19- Imágenes de la hibridación in situ.....	40
Figura 20- Imágenes de CA1 y CA3 con microscopía confoca.....	41
Figura 21- Proporción de células expresando Arc en CA1.....	42
Figura 22- Proporción de células expresando Arc en CA3.....	43
Figura 23- % de activación total de Arc de nuestros grupos.....	44

Figura 24- Índice de similitud de CA1 y CA3.....	45
Tabla 1- Ejecución en la prueba conductual.....	39